



© J ORTHOP TRAUMA SURG REL RES 1 (17) 2010

Review article/Artykuł poglądowy

# Influence of vitamins on the bone homeostasis

## Wpływ witamin na homeostazę tkanki kostnej

ŁUKASZ TEISTER<sup>1</sup>, TADEUSZ GAŹDZIK<sup>2</sup>, BEATA ŁĄCKA-GAŹDZIK<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Wojewódzki Szpital Specjalistyczny nr 5 im. św. Barbary, Sosnowiec

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Fizjoterapii Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice

<sup>3</sup> Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych Diabetologii i Nefrologii  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, Zabrze

Address for correspondence/Adres do korespondencji:

Łukasz Teister

ul. Tysiąclecia 15/50, 40-873 Katowice, Poland

tel. 504-122-281; e-mail: tosterro@wp.pl

### Statistic/Statystyka

Word count/Liczba słów 5028/5123

Tables/Tabele 0

Figures/Ryciny 0

References/Piśmiennictwo 56

Received: 05.11.2009

Accepted: 11.01.2010

Published: 10.02.2010

### Summary

Bone tissue is a metabolically active system, constantly influenced by series of endogenic and external factors.

Homeostasis of the bone tissue, as being dependent on the balance between bone resorption and osteogenesis as well as calcium homeostasis in the organism are correlated processes. It is controlled by various hormones like active forms of vitamin D<sub>3</sub> and A (retinoid acids), parathormone, calcitonine, sex hormones, glucocorticosteroids, thyroid hormones and growth factors. Locally active growth and/or differentiation factors, and other cytokines are also involved in the bone homeostasis control. Vitamins also play a major role in this process, among which vitamin D<sub>3</sub>, its active metabolites, vitamin A and its derivatives (acidic metabolites and synthetic analogues), vitamin E, K, C and some of B group can be found.

A most significant influence on bone homeostasis is of vitamin D<sub>3</sub> and its hydroxyl derivatives: 25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, vitamin A and its metabolites – retinoid acids. Vitamin D<sub>3</sub> is responsible for correct bone development and mineralization. It takes a major part in calcium-phosphate metabolism regulation. Increases their intestinal absorption and balances eventual incorrect Ca/P ratio. Vitamin D<sub>3</sub> is required for ossification and production of bone components.

The influence of physiologic concentration of retinol in the blood on bone remodulation is poorly known, nevertheless disadvantageous effect of both excessive concentration and deficiency of retinol on bones are known.

Clinical applications of retinoids in skin diseases and oncological therapy is linked with an until recently underestimated toxic influence on bone tissue.

Vitamin C also takes part in bone remodulation, through hydroxylation of proline and lysine, and facilitates formation of type I collagen.

Osteoprotective action of vitamin E on bone matrix proteins is realized in anti-oxidative activity and inhibition of pro-inflammatory cytokines.

Of all the group B vitamins, a major role in bone metabolism belongs to thiamin (B<sub>1</sub>), riboflavin (B<sub>2</sub>), pyridoxine (B<sub>6</sub>), cobalamine (B<sub>12</sub>) and folic acid. These vitamins act on bones metabolism in an indirect manner, through regulation of homocysteine level.

The term "vitamin K" covers both natural (K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>) and synthetic (K<sub>3</sub>, K<sub>4</sub>) derivatives of naphthoquinone, all of similar biological, mainly anti-hemorrhagic activity. Clinical studies proved a connection between low vitamin K consumption and low BMD and higher risk of bone fractures.

**Key words:** bones, homeostasis, vitamins, osteoresorption, osteogenesis

### Streszczenie

Tkanka kostna jest układem aktywnym metabolicznie i pozostaje pod stałym wpływem szeregu bodźców endogennych i czynników zewnętrznych.

Homeostaza tkanki kostnej, która zależy od równowagi procesów resorpcji i kościotworzenia oraz homeostaza wapnia w ustroju są współzależnymi procesami kontrolowanymi przez liczne hormony, między

innymi: hormonalnie czynne metabolity witaminy D<sub>3</sub> i A (kwas retinowy), parathormon, kalcytoninę, a także hormony płciowe, glikokortykosteroidy, hormony tarczycy i hormon wzrostu. W utrzymaniu homeostazy tkanki kostnej uczestniczą również działające miejscowo czynniki wzrostu i różnicowania oraz inne cytokiny. Znaczący udział w regulacji procesów przebudowy kości wykazują witaminy. Do witamin wpływających na procesy metaboliczne w kościach zaliczmy: wit. D<sub>3</sub> oraz jej aktywne metabolity, witaminę A i jej pochodne (kwasowe metabolity i syntetyczne analogi), witaminę E, K, C oraz niektóre witaminy z grupy B.

Największy wpływ na homeostazę tkanki kostnej wywiera witamina D<sub>3</sub> i jej hydroksylowe pochodne: 25(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub> oraz witamina A i jej metabolity – kwasy retinowe. Witamina D<sub>3</sub> jest odpowiedzialna za prawidłowy rozwój i mineralizację kości. Pełni ona istotną funkcję w regulacji gospodarki wapniowo-fosforowej ustroju. Zwiększa wchłanianie tych pierwiastków z przewodu pokarmowego oraz wyrównuje ewentualny nieprawidłowy stosunek wapnia do fosforu. Niezbędna jest w procesach kostnienia i w powstaniu związków potrzebnych do budowy kości.

Wpływ fizjologicznego poziomu retinolu we krwi na procesy przebudowy kości jest mało poznany, ale istnieją doniesienia wskazujące na niekorzystny wpływ na tkankę kostną, zarówno nadmiaru jak i niedoboru witaminy A.

Kliniczne zastosowanie retinoidów w leczeniu chorób skóry i nowotworów złośliwych wiąże się z występowaniem, do tej pory niedocenianym toksycznym ich działaniem na układ kostny.

W procesie przebudowy kości bierze udział także witamina C, uczestnicząc w hydroksylacji lizyny i proliny, warunkuje wytwarzanie kolagenu typu I.

Witamina E poprzez wpływ na białka macierzy kostnej, hamowanie działania cytokin prozapalnych oraz aktywność antyoksydacyjną wykazuje działanie osteoprotekcyjne.

Z witamin grupy B istotny wpływ na metabolizm kości wywierają: tiamina (B<sub>1</sub>), ryboflawina (B<sub>2</sub>), pirydoksyna (B<sub>6</sub>), kobalamina (B<sub>12</sub>) a także kwas foliowy. Witaminy te oddziałują na procesy metaboliczne kości pośrednio, poprzez wpływ na poziom homocysteiny.

Pod nazwą witamina K występują naturalne (K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>) i syntetyczne (K<sub>3</sub>, K<sub>4</sub>) pochodne naftochinonu, które wykazują podobną aktywność biologiczną, głównie działanie przeciwkrwotoczne. Badania kliniczne wykazały związek pomiędzy niską podażą witaminy K a niską gęstością mineralną kości (BMD) i większym ryzykiem złamań.

**Słowa kluczowe:** kości, homeostaza, witaminy, kościore sorbja, kościotworzenie

Homeostasis of the bone tissue, as being dependent on the balance between bone resorption and osteogenesis as well as calcium homeostasis in the organism are correlated processes. It is controlled by various hormones like active forms of vitamin D<sub>3</sub> and A (retinoid acids), parathormone, calcitonine, sex hormones, glyocorticosteroids, thyroid hormones and growth factors [1]. Locally active growth and/or differentiation factors, and other cytokines are also involved in the bone homeostasis control [2,3]. Hormonal regulation is realized via ligand-cellular specific receptor binding. Depending on the structure of the hormone the receptors can be either of membrane or intracellular, exactly nuclear, location [4,5].

Bone tissue of the humans and other mammals is either of mesenchymal origin, i.e. directly from osteoprogenitory cells into osteoclasts transformation (skull, clavicle), or of cartilagenous origin (remaining bones), formed from primarily cartilagenous mould. Chondrous ossification can start either on the surface of the cartilage (perichondral ossification) or deep in the cartilage (endochondral ossification). In the first case perichondral mem-

Homeostaza tkanki kostnej, która zależy od równowagi procesów resorpcji i kościotworzenia oraz homeostaza wapnia w ustroju są współzależnymi procesami kontrolowanymi przez liczne hormony między innymi: hormonalnie czynne metabolity witaminy D<sub>3</sub> i A (kwas retinowy), parathormon, kalcytoninę, a także hormony płciowe, glikokortykosteroidy, hormony tarczycy i hormon wzrostu.[1] W kontroli homeostazy tkanki kostnej uczestniczą również działające miejscowo czynniki wzrostu i różnicowania oraz inne cytokiny.[2,3] Oddziaływanie hormonów na komórki docelowe odbywa się poprzez wiązanie ze specyficznymi receptorami. W zależności od budowy hormonu mogą to być obecne w błonie komórkowej receptory śródbłonowe lub też receptory wewnątrzkomórkowe zlokalizowane w jądrze komórki docelowej.[4,5]

Tkanka kostna powstaje w organizmie człowieka i innych ssaków albo na podłożu mezenchymatycznym, poprzez bezpośrednie przekształcanie się komórek osteoprogenitorowych w osteoblasty (kości pokrywę czaszki, kości twarzy, obojczyk), albo na podłożu chrzęstnym (wszystkie inne kości), poprzez tworzenie w miejscu

brane converts into periosteum and the continued ossification is then called periosteal. Endochondral model of ossification however is not a simple tissue conversion, since it starts with initial chondroclasia, secondarily osteoblasts following the blood vessels form primary ossification centers, which grow towards both perichondral and endochondral directions. The remained layer of the cartilage, left after epiphysis' ossification, dividing it from the shaft is a so called epiphysial cartilage, which allows for shaft's longitudinal growth. Additionally, appositional bone growth on the cambium layer of periosteum thickens the bone shaft [8].

The regulatory mechanisms of bone formation in a developing organism do not wane in adult one. They appear in the fracture healing process and formation of bony scar, i.e. callus. In the healing of a long bone's fracture initially a cartilage is formed in the fracture – just like in chondrous ossification, which then transforms into bone [9].

Bone is a dynamic tissue, continuously created and rebuilt to fit its form to changing mechanical loads and to ensure calcium homeostasis in the body fluids. Yearly turnover of the bones in adults is about 8%, which means a complete restoration of skeleton in every 12 years, average. However remodulation rate of the bones varies. Cortical bone remodulation takes 25 years, while trabeculae of the spongy bone are rebuilt every 4 years [10].

Remodulation of the bones, cortical and spongy, occurs in minimal locations called osteons or Howship's lacunae respectively; these are the places where bone tissue is simply dissolved and replaced by a newly created one. Various cells are involved in the process, like osteoblasts, osteoclasts, osteocytes, mastocytes, lymphoid cells, all together gathered in so called Basic Multicellular Units [11].

The bone remodulation cycle begins with the activation of osteoclasts induced by osteoblast-derived cytokines and other factors, like IL-1, IL-6, TNF, GM-CSF, Sargramostim [12]. Osteoclasts created through fusion of osteoclast precursors migrate to resorption points and adhere to the mineral component of the bone after prior degradation of the non-mineral layer of organic matrix by osteoblastic collagenase [13].

przyszłej kości zawiązka chrzęstnego [6,7]. Kostnienie na podłożu chrzęstnym może rozpoczynać się od powierzchni chrząstki (kostnienie odchrzęstne), lub w głębi chrząstki (kostnienie śródchrzęstne). W pierwszym przypadku ochrzęstna zmienia się w okostną i dalej postępujące kostnienie nazywa się odokostnowym. W przypadku modelu śródchrzęstnego, chrząstka nie jest bezpośrednio przekształcana w kość lecz w pierwszej kolejności ulega zniszczeniu. Następnie podążające za naczyniami osteoblasty tworzą pierwotne centra kostnienia, które rozrastają się w obydwu kierunkach kostnienia – odchrzęstnego i śródchrzęstnego. Przetrwiała po skostnieniu nasaady i granicząca z trzonem warstwa chrząstki nosi nazwę chrząstki nasadowej i jest miejscem wzrostu kości na długość. Z kolei apofizyjny wzrost od strony warstwy rozrodowej okostnej prowadzi do zwiększenia grubości kości tworzącej trzon [8].

Mechanizmy regulujące powstawanie kości w trakcie rozwoju organizmu nie zanikają w ustroju dojrzałym. Ujawniają się one w procesie gojenia złamań kości i powstawania blizny kostnej czyli kostniny. W procesie gojenia się kości długiej dochodzi do powstania tkanki chrzęstnej, która w podobny sposób jak to się dzieje w procesie kostnienia na podłożu chrzęstnym, zostaje zastąpiona przez tkankę kostną.[9]

Kość jest tkanką dynamiczną, stale powstającą i stale przebudowywaną w celu dostosowania swej budowy do zmieniających się obciążeń mechanicznych oraz zapewnienia homeostazy wapnia w płynach ustrojowych. U osób dorosłych następuje przebudowa około 8% szkieletu, co oznacza że średnio każdy fragment szkieletu zostaje odnowiony co 12 lat. Szybkość remodulacji kości jest jednak różna. Kość korowa ulega remodulacji co 25 lat podczas gdy beleczki kości gąbczastej przebudowywane są co 4 lata. [10]

Przebudowa kości gąbczastej i kości zbitej zachodzi na niewielkich obszarach kości, zwanych jednostkami przebudowy kości i jest procesem, w którym stara kość ulega rozpuczeniu i zastępowana jest nową. W procesie tym bierze udział wiele komórek (osteoblasty, osteoklasty, osteocyty, komórki tuczne, limfoidalne), które określa się jako jednostki wielokomórkowe BMU (Basic Multicellular Unit). [11] Jednostkom tym odpowiada w kości zbitej osteon, a w kości gąbczastej – zatoka erozyjna na powierzchni beleczko kostnej.[11]

Cykl przebudowy tkanki kostnej rozpoczyna się aktywacją osteoklastów przez cytokiny i inne czynniki wydzielane przez osteoblasty m.in.: IL-1, IL-6 (Interleukin-1, Interleukin-6), TNF (Tumor Necrosis Factor), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Sargramostim). [12] Powstałe z fuzji prekursorów osteoklastów komórki kościogubne migrują do miejsc resorpcji i ulegają adhezji do mineralizowanej części kości, po uprzedniej degradacji warstewki niezmineralizowanej macierzy organicznej pod wpływem kolagenazy syntetyzowanej przez osteoblasty.[13]

Przywiązanie osteoklastów do mineralizowanej kości jest podstawową częścią procesu resorbcyjnego, a pośred-

Adhesion of the osteoclasts to the mineral bone is a part of resorption process, mediated by adhesion molecules called integrins, presented on the cell surfaces and binding with bone matrix through a specific RGD sequence (Arg-Gly-Asp) [14]. The binding proteins are osteopontin, fibronectin, type-I collagen [14,15]. After a relatively short process of osteoclasts precursors activation, a few weeks lasting resorption phase proceeds, when osteoclasts enter to dissolve the bone with cellular processes. A funnel-shaped bone defect (osteoclastic lacuna) of rough surface is thus created [16].

In the next phase mononuclear phagocytes smooth the rough surface of the funnel-shaped defect, creating a cement line in the lacuna. Primitive reticular cells settle then on the surface, proliferate and transform into osteoblasts. The osteoblasts secrete osteoid, of which collagen fibers create a reticular form, in a vitamin C-mediated process [17]. mineralization of such a reinforced osteoid then occurs and is regulated by  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  [18]. Being embedded in the bone matrix, part of the osteoblasts become osteocytes, while the rest of them create a thin covering layer on the new bone tissue [19].

Bone remodeling is a harmonic cooperation between osteoclasts precursors and osteoblasts resulting in degeneration of old bone followed by its restoration in a new shape. This cooperation is performed with the use of membranaceous glycoproteins of bone cells [20]. As discovered in the studies, osteoclasts precursors (proosteoclasts) present on cell surface transmembranaceous RANK receptors (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa  $\beta$ ), which transduce to the nuclei of the precursor cells initiating signals for genes expression cascades responsible for osteoclastic differentiation of the cells [21]. Ligands for the RANK receptors (RANKL) are glycoproteins secreted by osteoblasts, lymphocytes and stromal cells. At the same time osteoblasts and stromal cells produce Osteoprotegerin (OPG), a soluble protein competing with RANKL for the binding center of RANK [21]. Fusion of RANKL with RANK facilitates contact of the osteoblast with early precursor of osteoclast, while OPG blocking RANK stops differentiation of proosteoclasts into osteoclasts. Receptors for M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) are also found on the osteoclasts precursors' surfaces; this cytokine is produced by bone marrow stromal cells and mature osteoclasts. Binding of the RANKL with RANK in the presence of M-CSF activates osteoclastogenesis [5].

niczą w tym procesie cząsteczki adhezyjne zwane integrynami, obecne na powierzchni błon cytoplazmatycznych, wiążące się z macierzą kostną przez specyficzne sekwencje RGD (Arg-Gly-Asp) [14]. Białkami wiążącymi są: osteopontyna, fibronektyna, kolagen typu I.[14,15] Po stosunkowo krótkim procesie aktywacji prekursorów osteoklastów następuje trwająca kilka tygodni faza resorpcji, w której osteoklasty wnikają wypustkami do kości i powodują jej rozpuszczenie. W miejscu tym dochodzi do powstania lejkowatych ubytków kości o nierównej powierzchni.[16]

W następnej fazie jednojądrzaste fagocyty wygładzają nierówną powierzchnię lejkowatego ubytku kości, prowadząc do powstania w zatoce, gładkiej powierzchni zwanej linią cementową. Na powierzchni linii cementowej osiadają niezróżnicowane komórki zrębu siateczki, które namnażają się i przekształcają w osteoblasty. Osteoblasty wydzielają osteoid, którego włókna kolagenowe ulegają usieciowaniu, w którym bierze udział witamina C. [17] Tak wzmocniony osteoid ulega mineralizacji a proces ten regulowany jest przez  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . [18] Po zasklepieniu w macierzy część osteoblastów staje się osteocytami a część pozostaje na powierzchni nowo utworzonej kości, tworząc cienką warstwę komórek pokrywających. [19]

Przebudowa kości jest wynikiem harmonijnego współdziałania prekursorów osteoklastów z osteoblastami, w wyniku czego dochodzi do niszczenia a następnie odbudowy kości w nowym kształcie. Współdziałanie to odbywa się z pośrednictwem błonowych glikoprotein komórek kostnych.[20] Badania wykazały, że na komórkach prekursorów osteoklastów (proosteoklasty) występują transbłonowe receptory RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa  $\beta$ ) służące do aktywacji czynnika kappab, który przekazuje do jądra komórek prekursorowych sygnał uruchamiający kaskadę ekspresji genowych powodujących różnicowanie się tych komórek w osteoklasty [21]. Receptory RANK pobudzone są przez glikoproteiny RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa  $\beta$  Ligand), wydzielane przez osteoblasty, a także limfocyty i komórki zrębu. Jednocześnie osteoblasty i komórki zrębu wytwarzają rozpuszczalne białko OPG (Osteoprotegerin), które konkuruje z RANKL o miejsce wiązania z RANK. [21] Połączenie się RANKL z RANK umożliwia skontaktowanie się osteoblastu z wczesnym prekursorem osteoklastu, natomiast zablokowanie receptora RANKL przez OPG hamuje proces różnicowania się proosteoklastów w osteoklasty. Na powierzchni prekursorów osteoklastów występują również receptory cytokiny M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), która jest czynnikiem stymulującym kolonie makrofagów, produkowanym przez szpikowe komórki zrębu i dojrzałe osteoblasty. Połączenie się RANKL z RANK przy równoczesnym kontakcie czynnika M-CSF prowadzi do aktywacji procesu osteoklastogenezy.[5]

Uważa się że na inicjację osteogenezy szczególnie wpływa mają uwalniane z resorbowanej macierzy białka



Bone Morphogenetic Proteins (BMP) released from the dissolved bone matrix, as the protein osteogenic factors are thought to be strongly influencing the initiation of osteogenesis. Seven BMPs have been discovered recently, of which six belong to the TGF $\beta$ -superfamily. Their potential for transformation of non-differentiated mesenchymal cells into precursors of osteogenic cells and initiation of osteogenesis is suggested. Many other proteins of osteogenesis initiating activity cooperate with BMPs, aside many other TGF $\beta$ -family proteins [22,23].

Repair and regeneration of fractured or defected bone tissue, building-in of bone transplants and calcium-phosphate homeostasis are possible only due to bone remodeling.

Efficiency of bone regeneration is determined by various factors acting through endocrine (i.e. systemic hormones, like parathormone, calcitonin, estrogens, glyccorticosteroids, growth hormone, vitamin D<sub>3</sub> metabolites), paracrine (locally secreted by one cell agents acting on neighboring ones) or autocrine route. The autocrine and paracrine agents are divided into either stimulating bone resorption: TNF (Tumor Necrosis Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), PDF (Prostate-Derived Factor), FIF (Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-Interacting-Factor), LIF (Leukemia Inhibitory Factor), M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Sargramostim), or inhibitors of bone resorption: osteoprotegerin (OPG) (osteoclastogenesis inhibitory factor), inhibitor osteoprotegerin-ligand (OPG-L), IL-4 (Interleukin-4), or simulators of osteogenesis: IGF (Insulin-like Growth Factors), TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta), FGF (Fibroblast Growth Factor), BMPs (Bone Morphogenic Proteins) [23,24].

A significant role in regulation of bone remodeling belongs to certain vitamins [27-56]. Metabolic influence on bones is found in vitamin D<sub>3</sub> and its active derivatives, vitamin A and its derivatives (acidic metabolites and synthetic analogs), also vitamin E, K, C, some of B-group vitamins.

### Vitamin D<sub>3</sub>

Vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) is produced in humans from 7-dehydrocholesterol in the skin exposed to UV light. Mean concentration of 7-dehydrocholesterol in human skin per area is 1mg/cm<sup>2</sup>. The amount of synthesized D<sub>3</sub> vitamin in human skin in mezoclimate covers 20-80% of daily requirement. Complete daily requirement thus must be supplemented with food.

morfogenetyczne kości BMP (Bone Morphogenetic Protein), zwane białkowymi czynnikami kościotworzenia. Do chwili obecnej zidentyfikowano siedem białek morfogenetycznych, z których sześć należy do nadrodziny czynników transformujących  $\beta$  (TGF  $\beta$ ). Sądzi się, że są one odpowiedzialne za przekształcanie niezróżnicowanych komórek mezenchymalnych w prekursorów komórek osteogennych i zapoczątkowanie osteogenezy. Z białkami BMP współdziała wiele innych białek wykazujących aktywność inicjowania tworzenia się tkanki kostnej, równoległe do wielu innych czynników należących do rodziny TGF  $\beta$  [22,23].

Dzięki przebudowie kości (remodulacji) możliwa jest naprawa i regeneracja tkanki kostnej, która uległa złamaniom czy ubytkom, przyjmowanie przeszczepów kostnych oraz zachowanie homeostazy wapniowo-fosforanowej.

Sprawność przebudowy tkanki kostnej zależy od wielu czynników i podlega regulacji zarówno endokrynej (hormony ogólnoustrojowe takie jak parathormon, kalcytonina, estrogeny, glikokortykosteroidy, testosteron, hormon wzrostu, metabolity wit.D<sub>3</sub>), parakrynej (związki wydzielane przez jedną komórkę działające na komórkę z najbliższego otoczenia) jak i autokrynej. Czynniki autokryjne i parakryjne regulujące metabolizm kości dzielą się na stymulatory resorpcji kości: TNF (Tumor Necrosis Factor), EGF (Epidermal Growth Factor), PDF (Prostate-Derived Factor), FIF (Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-Interacting-Factor), LIF (Leukemia Inhibitory Factor), M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Sargramostim), inhibitory resorpcji kości: osteoprotegerin (OPG) (osteoclastogenesis inhibitory factor), inhibitor osteoprotegerin-ligand (OPG-L), IL-4 (Interleukin-4) i stymulatory kościotworzenia: IGF (Insulin-like Growth Factors), TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor beta), FGF (Fibroblast Growth Factor), BMPs (Bone Morphogenic Proteins). [23,24]

Znaczny udział w regulacji procesów przebudowy kości wykazują witaminy. [27-56]

Do witamin wpływających na procesy metaboliczne w kościach zaliczmy: wit. D<sub>3</sub> oraz jej aktywne metabolity, witaminę A i jej pochodne (kwasowe metabolity i syntetyczne analogi), witaminę E, K, C oraz niektóre witaminy z grupy B.

### Witamina D<sub>3</sub>

Witamina D<sub>3</sub> (cholekalcyferol) jest wytwarzana u ludzi z 7-dehydrocholesterolu w obrębie skóry pod wpływem światła ultrafioletowego. Średnia zawartość 7-dehydrocholesterolu w skórze u ludzi wynosi 1 $\mu$ g/cm<sup>2</sup> skóry. Ilość witaminy D<sub>3</sub> która jest wytwarzana w skórze człowieka w klimacie umiarkowanym pokrywa od 20-80% niezbędnej dla organizmu ilości tej witaminy. W celu pełnego zaopatrzenia organizmu w wit. D<sub>3</sub> niezbędne jest jej dostarczanie w produktach spożywczych.

Podstawową rolę witaminy D<sub>3</sub> w organizmie jest regulacja przemiany wapniowo-fosforanowej. Witamina

Basic role of vitamin D<sub>3</sub> in the organism is regulation of calcium-phosphate metabolism. Biological activity of natural vitamin D<sub>3</sub> is low and is enhanced in a sequence of hydroxylations, thus creating active D<sub>3</sub> metabolites. The first stage of vitamin D<sub>3</sub> activation is localized in hepatocytes with their 25-hydroxylase, which converts vitamin D<sub>3</sub> into 25-hydroxycholecalciferol (25(OH)D<sub>3</sub>). Rate of this metabolic pathway is reduced in preterm neonates and in liver insufficiency. Second activation pathway of vitamin D<sub>3</sub> is in kidneys, where conversion of 25(OH)D<sub>3</sub> to 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> by 1 $\alpha$ -hydroxylase of 25-hydroxycholecalciferol is done. Activity of the latter enzyme is controlled in both endocrine and metabolic route. Parathormone, prolactin, somatotropin, sex hormones, insulin, PGE<sub>2</sub> rise its activity, while cortison, thyroxine, ethanol, higher serum Ca and P concentration reduce the activity. Process of 25(OH)D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylation is also possible in bone cells, placenta, lymphatic cells, sarcoid granulation and tuberculoma. 24-hydroxylase of 25(OH)D<sub>3</sub> is also found in kidneys, transforming 25(OH)D<sub>3</sub> to 24,25-dihydroxycholecalciferol. Together 1 $\alpha$ -hydroxylase and 24-hydroxylase may even convert 25(OH)D<sub>3</sub> to a tri-hydroxyl compound like 1,24,25-trihydroxycholecalciferol, which biological activity has not been yet exactly discovered [25].

Vitamin D<sub>3</sub> and its active metabolites are transported in blood by transcalferrin, called also Vitamin D Binding Protein (DBP). It is a 52kDa  $\alpha$ -globulin, which makes 6% of total plasma  $\alpha$ -globulin fraction. Once transferred to target cells, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> binds with a specific receptor – Vitamin D Receptor (VDR) on a nuclear membrane and probably in cytoplasm as well [26]. Receptors for 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> belong to a superfamily of nuclear receptors, acting as transcript factors [27]. It is discovered, that one hour after binding 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> with VDR, synthesis of new proteins modifying activity of the target cell develops.

Basic biological activity of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is regulation of calcium and phosphate concentrations in the blood. Active vitamin D<sub>3</sub> increases absorption of calcium and phosphates in intestines through induction of certain protein's synthesis in the enterocytes, thus enhancing enteral calcium binding ability and its hematogenic transport. The vitamin also increases reabsorption of calcium and phosphates in kidneys. In the bones it rises osteoclastic osteolysis. In the cases of overproduction of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hypercalcemia develops with a possibility of calcium deposition in the soft tissues and hypercalciuria leading to nephrolithiasis. Vitamin 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stimulates also osteoclasts, although it does not seem to be a direct stimulus; rather through facilitation of stem cells differentiation to osteoclasts and enhancing secretion of Osteoclast Activating Factor (OAF) by lymphocytes T [28].

D<sub>3</sub> jest mało aktywna biologicznie i uzyskuje zwiększoną aktywność dopiero po kolejnych etapach jej hydroksylacji (powstają hormonalnie czynne hydroksymetabolity tej witaminy). Pierwszy etap aktywacji wit. D<sub>3</sub> zachodzi w komórkach wątroby przy udziale 25-hydroksylazy, która przekształca ją w 25-hydroksycholekalcyferol – 25(OH)D<sub>3</sub>. Szybkość przekształcania wit. D<sub>3</sub> do 25(OH)D<sub>3</sub> jest zmniejszona u wcześniaków i u osób z uszkodzoną wątrobą. Drugi szlak aktywacji wit. D<sub>3</sub> następuje w nerkach i polega na przemianie 25(OH)D<sub>3</sub> do 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> pod wpływem 1 $\alpha$ -hydroksylazy 25-hydroksycholekalcyferolowej. Aktywność tego enzymu w nerkach jest regulowana na drodze hormonalnej i metabolicznej. Wzrost aktywności tego enzymu powodują: PTH (Parathyroid Hormone), prolaktyna, somatotropina, hormony płciowe, insulina oraz PGE<sub>2</sub>. Zmniejszają zaś jego aktywność: kortyzon, tyroksyna, etanol, wzrost stężenia we krwi wapnia i fosforanów. Proces 1 $\alpha$ -hydroksylacji 25(OH)D<sub>3</sub> może również zachodzić w komórkach kości, łożysku, komórkach układu limfatycznego, w ziarninie sarkoidalnej i gruźlkach gruźliczych. W nerce występuje również 24-hydroksylaza wit. 25(OH)D<sub>3</sub>, która przekształca tę postać w 24,25-dihydroksywitaminę D<sub>3</sub> tj. w 24,25-dihydroksycholekalcyferol. Pod wpływem 1 $\alpha$ -hydroksylazy i 24-hydroksylazy mogą również powstawać trihydroksylowe pochodne wit. D<sub>3</sub> takie jak: 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, których rola w organizmie nie jest jeszcze dostatecznie poznana. [25]

Witamina D<sub>3</sub> i jej aktywne metabolity są transportowane we krwi przez transkalcyferinę nazywaną również białkiem DBP (vitamin D binding protein), która jest  $\alpha$ -globuliną o m.c. 52 tys.kD i stanowi ok. 6% całkowitej ilości frakcji  $\alpha$ -globulin. Przetransportowana do komórek docelowych wit. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wiąże się w nich ze swoistym receptorem VDR (Vitamin D Receptor), występującym na powierzchni jądra komórkowego, prawdopodobnie także w cytoplazmie. [26] Receptory dla 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> należą do nadrodziny receptorów jądrowych i pełnią rolę czynników transkrypcyjnych. [27] Badania wykazały, że w ciągu 1 godziny po związaniu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> z receptorem, w komórce zachodzi synteza nowych białek mogących modyfikować czynność tej komórki.

Podstawową właściwością 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> jest regulacja stężenia wapnia i fosforanów we krwi. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> zwiększa wchłanianie wapnia i fosforanów w jelicie poprzez pobudzenie wytwarzania w nabłonku jelita swoistego białka, które ułatwia wiązanie wapnia w komórkach nabłonka jelitowego a następnie jego transport we krwi. Powoduje również zwiększenie wchłaniania wapnia i fosforanów w obrębie nerek. W kościach zwiększa osteolizę osteoklastyczną. Przy nadmiernym wytwarzaniu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> może wystąpić hiperkalcemia, wzmożone odkładanie wapnia w tkankach miękkich a także zwiększone wydalenie wapnia z moczem, usposabiające do wystąpienia kamicy nerkowej. Witamina 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> pobudza aktywność osteoklastów. Działanie to nie jest spowodowane bezpośrednim oddziaływa-

The action of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  on osteoblasts is not yet completely studied. It is thought, that  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  regulates synthesis of either osteoid or its components in osteoblasts. In the cartilage  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  increases mineralization [18]. Induction of macrophages differentiation by  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  is also known. Through stimulation of lymphocytes T active vitamin D3 can influence immunologic reactions.

The role of  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  is unclear until now. It shows a similar, though reduced activity of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . In the cartilage it increases chondrocytes' maturation [29].

Daily vitamin D3 requirement is 20  $\mu\text{g}$  in infants (safety level 10  $\mu\text{g}$ ), children 1-9y.o. 15  $\mu\text{g}$  (safety level 10  $\mu\text{g}$ ), youth and elderly over 60y.o. 10  $\mu\text{g}$  (safety level 5  $\mu\text{g}$ ).

Deficiency of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  results in rachitis when occurs during growth, or in osteomalacia in the adults. In rachitis an overgrowth of cartilages develops due to impaired mineralization of the bone tissue. It then results in bone deformities like thickenings of the rib cartilages at their bone and cartilage junction, deformed epiphyses of the long bones and of the skull, the latter being named *caput quadratum*. As a result of decalcification deformity of skeleton develops, known as either knock-knee, or bowleg, reduced measures of pelvis and chest. A typical rachitic Harrison's groove on thorax appears as a result of pulled-in, decalcified, i.e. softer, ribs by diaphragm along its insertions. Deficiency of vitamin D3 in children retards their development, disturbs dentition, increases respiratory tract infections' rate and occasionally results in tetany. In rachitis resulting from decreased blood vitamin D3 concentration reduced concentrations of  $25(\text{OH})\text{D}_3$  and  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  are being stated, while in tissue insensitivity for  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  an increase of  $25(\text{OH})\text{D}_3$  and  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  concentrations is observed. In osteomalacia disturbed mineralization of bones occurs, an excess of non-mineralized osteoid in bone trabeculae is observed. Such impaired mineralization may lead to skeletal deformities [30].

Treating vitamin D3 deficiency a supplementation of 1000-2000I.U./d is usually applied and after the symptoms are gone a prophylactic dose of 4000I.U./d is used. In Vitamin D3- dependent rachitis a dose of 10000I.U.-60000/d, while in vitamin D3 resistant form 12000-150000I.U./d. Hypoparathyroidism demands supplementation of 50-150000I.U./d. Treatment of iatrogenic osteomalacia in anticonvulsive requires 1000-4000I.U./d, while nephrogenic osteodystrophy initial dose of 2000I.U./d is given, followed by individual dose between 10000-30000/d. A dose of 4000I.U. equals 10mg of vitamin D3.

niem  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na osteoklasty, lecz polega na przyspieszeniu różnicowania komórek macierzystych do osteoklastów oraz pobudzaniu limfocytów T do wytwarzania czynnika aktywującego osteoklasty – OAF (Osteoclast Activating Factor). [28]

Wpływ  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na osteoblasty nie został dobrze poznany. Przypuszcza się, że w osteoblastach  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  może regulować wytwarzanie osteoidu lub jego składników. W obrębie chrząstki przyspiesza proces mineralizacji. [18] Wykazano również pobudzający wpływ  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  na różnicowanie się makrofagów. Poprzez pobudzanie limfocytów  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  może wpływać na reakcje immunologiczne.

Działanie  $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  nie zostało dokładnie poznane. Wykazuje ona podobne lecz słabsze działanie na wchłanianie wapnia niż  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . W obrębie chrząstek powoduje przyspieszenie dojrzewania chondrocytów. [29]

Dziennie zapotrzebowanie na wit. D<sub>3</sub> wynosi odpowiednio: u niemowląt – 20  $\mu\text{g}$ , (poziom bezpieczny 10  $\mu\text{g}$ ), u dzieci (1-9 r.ż) – 15  $\mu\text{g}$ , (poziom bezpieczny 10  $\mu\text{g}$ ), u młodzieży i osób po 60 r.ż. – 10  $\mu\text{g}$  (poziom bezpieczny 5  $\mu\text{g}$ ).

Przy niedoborze  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  u osób w okresie wzrostu rozwija się krzywica, a u osób dorosłych powstaje osteomalacja. W krzywicy występuje nadmierny rozrost chrząstki na skutek zaburzenia jej uwapnienia a także zaburzenia mineralizacji tkanki kostnej. W wyniku tych zmian dochodzi do deformacji kości, objawiających się występowaniem zgrubień w obrębie żeber, na granicy kostno-chrzęstnej a także do zniekształcenia kości w obrębie nasad oraz zniekształcenia czaszki określanej jako czaszka kwadratowa. Na skutek odwapnienia dochodzi do deformacji układu kostnego w postaci występowania kolan szpotawych lub koślawych, zwężenia wymiarów miednicy i klatki piersiowej. Na klatce piersiowej występuje charakterystyczna dla krzywicy bruzda Harrisona, spowodowana wciągnięciem odwapnionych żeber przez przyczepy przepony. Niedobór wit. D<sub>3</sub> u dzieci opóźnia rozwój, powoduje zaburzenie ząbkowania, zwiększoną zapadalność na nieżyty dróg oddechowych a niekiedy napady tężyczki. W krzywicy powstałej powodu niedoboru wit. D<sub>3</sub> we krwi występuje zmniejszenie stężenia  $25(\text{OH})\text{D}_3$  i  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a w krzywicy spowodowanej niewrażliwością tkanek na  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  występuje zwiększenie stężenia  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  i  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . W osteomalacji występuje zaburzenie mineralizacji kości, w obrębie beleczek kostnych stwierdza się nadmierną ilość niezmineralizowanego osteoidu. Zaburzenie mineralizacji może prowadzić także do zniekształceń w układzie kostnym. [30]

Przy niedoborze wit. D<sub>3</sub> podaje się od 1000-2000 j.m./d, a po ustąpieniu zmian, profilaktycznie – 4000 j.m./d W krzywicy zależnej od wit. D<sub>3</sub> - 10000-60000 j.m./d, w krzywicy odpornej na działanie wit. D<sub>3</sub> - 12000-150000 j.m./d, w niedoczynności gruczołów przytarczycowych 50-150000 j.m./d. Przy osteomalacji spowodowanej przyjmowaniem leków przeciwdrgawkowych od 1000-

Overdosing of vitamin D<sub>3</sub> or increased metabolism to 25(OH)D<sub>3</sub> and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> increases intestinal absorption of calcium, facilitates bone resorption thus increasing its concentration in blood and urine. After a prolonged overdosing of vitamin D<sub>3</sub> nephrolithiasis and kidney defect develop, initially marked by poliuria than impairs renal filtration. In the blood vessels of the soft tissues deposits of calcium salts develop. Increased bone resorption with time leads to osteopenia. If calcium blood concentration increases significantly above 13mg/100ml fatigue, somnolence, arrhythmia, psychosis or even coma appear [31].

### Vitamin A (retinol) and retinoids

Retinol (vitamin A, all-trans retinol) is a cyclic polyene alcohol, built of  $\beta$ -ionone ring with a 11-carbon side chain with 4 coupled double-bonds. An all-trans form has all substituents in double-bonds in trans- position. Coupled double bonds in the side chain make the compound a chromophore, giving it a red, orange or yellow colour. In the organism vitamin A is made of  $\beta$ -carotene, called a pro-vitamin. In the intestinal mucosa an enzyme called dioxygenase (carotenase) converts  $\beta$ -carotene to cyclic peroxide, which breaks into 2 trans-retinal molecules, which is then reduced by dehydrogenase to retinoid alcohol (retinol), the very vitamin A. A minimal amount of vitamin A can become oxygenated to retinoid acids called the retinoids [32].

The role of vitamin A in human organism is important for many physiologic and metabolic processes, of which most significant are: vision (retinal forms with a protein called opsin a covalent bond – rhodopsin in rod-cells; through a change in three-dimensional structure between 11-cis/trans rhodopsin mediates impulses from photoreceptors to optic nerve), skin physiology – differentiation and functioning of the epithelial layer in the skin and mucosae. Vitamin A is an antioxidant agent, binds with free radicals, thus protecting cells. It also plays a role in metabolism of proteins, carbohydrates and steroid hormones [32].

Retinol is used in osteogenesis and ossification [33]. The influence of physiologic concentration of retinol in the blood on bone remodulation is poorly known, nevertheless disadvantageous effect of both excessive concentration and deficiency of retinol on bones are known. Excess of retinol in bones remodulation is already better studied than deficiency [30-41].

4000 j.m./d, przy nerkowej osteodystrofii początkowo-2000 j.m a następnie w zależności od potrzeby: od 10000-30000 j.m./d. ( 400 j.m odpowiada 10 mg witD<sub>3</sub> ).

Nadmierna podaż wit. D<sub>3</sub> lub zwiększenie jej przemiany do 25(OH)D<sub>3</sub> i 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> powoduje zwiększenie wchłaniania wapnia w przewodzie pokarmowym, zwiększenie uwalniania wapnia z kości, co prowadzi do zwiększenia stężenia wapnia we krwi i zwiększonego wydalania wapnia z moczem. Przy dłuższym okresie przedawkowania wit. D<sub>3</sub> występuje kamica nerkowa i uszkodzenie nerek objawiające się początkowo poliurią a następnie upośledzeniem filtracji. W naczyniach krwionośnych w tkankach miękkich odkładają się złogi soli wapniowych. W wyniku zwiększonej resorpcji wapnia w obrębie układu kostnego dochodzi do powstania osteopenii. Przy znacznym zwiększeniu stężenia wapnia we krwi powyżej 13mg/100ml występuje zmęczenie, senność, zaburzenie pracy serca, psychozy i niekiedy śpiączka. [31]

### Witamina A (retinol) i retinoidy

Retinol (wit A, all-trans retinol) jest polienowym alkoholem cyklicznym zbudowanym z pierścienia  $\beta$ -jononu, który zawiera 11-węglowy łańcuch boczny z czterema sprzężonymi wiązaniami podwójnymi. Forma all-trans ma wszystkie podstawniki przy wiązaniach podwójnych w położeniu trans. Występujące w łańcuchu bocznym sprzężone podwójne wiązania sprawiają, że związek ten jest chromoforem i odpowiadają za jego czerwoną, pomarańczową lub żółtą barwę. W organizmie wit. A powstaje z  $\beta$ -karotenu, który nazywany jest prowitaminą. W błonie śluzowej jelit,  $\beta$ -karoten pod wpływem enzymu dioksygenazy (karotenazy) przekształca się w cykliczny nadtlenek, który rozpada się na 2 cząsteczki trans-retinalu. Następnie dehydrogenaza redukuje retinal do alkoholu retinowego (retinolu) czyli witaminy A. Nie wielka ilość wit. A może ulec utlenieniu do kwasów retinowych (które nazywamy retinoidami). [32]

Witamina A odgrywa istotną rolę w wielu zachodzących w organizmie człowieka procesach fizjologicznych i metabolicznych, z których najważniejszymi są: widzenie (retinal związany kowalencyjnie z białkiem opsyną tworząc rodopsynę występującą w pręcikach, poprzez zmianę struktury przestrzennej [11-cis/all-trans] uczestniczy w przekazywaniu sygnałów z fotoreceptorów do nerwu wzrokowego), fizjologia skóry – różnicowanie i czynność tkanki naskórkowej skóry i błon śluzowych. Wit. A działa antyoksydacyjnie, wiążąc się z wolnymi rodnikami, wywiera działanie ochronne na komórki. Bierze udział w metabolizmie białek, węglowodanów i hormonów steroidowych. [32]

Retinol bierze także udział w tworzeniu struktury kości i w kostnieniu [33]. Wpływ fizjologicznego poziomu retinolu we krwi na procesy przebudowy kości jest mało poznany, ale istnieją doniesienia wskazujące na niekorzystny wpływ na tkankę kostną, zarówno nadmiaru jak i niedoboru witaminy A. Lepiej poznany jest wpływ nadmiaru niż niedoboru retinolu na procesy przebudowy kości. [30-41]



Intensive supplementation of retinol evokes side effects in skeletons of the experimental animals. In young male rats supplemented with 50000 I.U./d of vitamin A for 4 days, then with a reduced dose of 25000 I.U./d impaired gait (limping) is observed after 8 days of experiment. Within 20 days all these animals presented bone fractures in their extremities [34]. Young rats exposed to 25000-75000 I.U./d for 17 days developed major skeletal lesions, like atrophy of pelvic bones, fibulas and scapulae [34,35]. The conversions of the different measures of vitamin A are: 11 I.U. equals 0,6 µg of beta-caroten, 1 mg of retinol acetate equals some 2900 I.U.

In histomorphometric studies a dose-dependent increase of osteoclasts and reduction of osteoid area in the bones is stated. Intrarticular application of 500-50000 I.U. of vitamin A to rats' knee joints caused not only granulocytar and eosinophilic infiltration but also osteoclasts migration from the articular cartilage to synovial membrane. Bone erosion developed as well [36].

In the study on chronic exposure to vitamin A of the cultured murine chondroblasts, the cells excessive synthesis of osteocalcin and type I collagen were discovered [34,35]. However a main disadvantageous effect of excess of retinol in organism is forced bone resorption. According to Frankel et al., application of 15 mg of retinol three times per day for 6 weeks in rats increases count of osteoclasts. Navia and Harris stated in their experiment, that high doses of retinol increase bone resorption through stimulation of lysosomal enzymes secretion in osteoclasts and through increased secretion of parathormone [33].

The changes observed in animals after excessive exposure to retinol are also seen in humans. Epidemiological study done in Sweden in postmenopausal women showed, that a prolonged consumption of 1,5 mg retinol daily caused reduction of bone mineral density (BMD) and a rise of femoral cervix fracture [37]. A case study of a 59 y.o. woman consuming 30000 I.U./d for 6 years is known. Aside significant hyperlipidaemia, after exclusion of other than hypervitaminosis, radiologic examination revealed hip joint hyperostosis and knee joint defect. Michaelson et al., based on their study concluded, that excessive retinol dosage is a cause of osteoporosis in humans. They found out, that a consumption of more than 1,5 mg of vitamin A daily reduced BMD in femur by 10%, lumbar vertebrae by 14%, total bone mass by 6% while risk of femoral neck fracture doubles. A reduction of bone mass and increase of vitamin A hypervitaminosis in women aged 55-80 is observed [37]. Vitamin A hypervitaminosis may also appear as osteodynia [35]. Retinol, when overdosed increases the amount of osteoid with multiple intermolecular bonds between collagen fibers. It also disturbs chondrocytes differentiation, thus inhibiting bone growth. Hypertrophy of ligaments and tendons with their mineralization develop [35].

Duża podaż witaminy A powoduje skutki uboczne w układzie szkieletowym u zwierząt laboratoryjnych. U młodych szczurów płci męskiej, którym podawano 50 000 j.m. wit. A przez 4 dni a następnie dawkę zredukowano do 25 000 j.m./d, już po 8 dniach od rozpoczęcia podawania zaobserwowano upośledzenie chodzenia (utykanie). U wszystkich badanych zwierząt, w ciągu 20 dni od rozpoczęcia suplementacji wystąpiły złamania kości kończyn. [34] U młodych szczurów, którym podawano przez 17 kolejnych dni retinol w dawce od 25000-75000 j.m./d. zaobserwowano istotne uszkodzenia układu kostnego, m.in. zanik kości miednicy, kości strzałkowej i łopatki z równoczesnym ich zcieńczeniem. [34,35]

[1 j.m. witaminy A równa jest 0,6 µg (mikrogram) beta-karotenu. 1 mg octanu retinolu odpowiada około 2900 j.m.]

W badaniach histomorfometrycznych zaobserwowano zależne od dawki zwiększenie liczby osteoklastów i zmniejszenie powierzchni osteoidu w tkance kostnej. Zastosowanie u szczurów retinolu w dawce od 500 – 50 000 j.m. bezpośrednio do stawu kolanowego powodowało naciekanie, oprócz granulocytów i eozynofili również i osteoklastów z chrząstki stawowej w kierunku błony maziowej. Obserwowano również zmiany erozyjne w tkance kostnej. [36]

W badaniach przeprowadzonych na hodowli chondrocytów uzyskanych od myszy wykazano, że podczas przewlekłego stosowania wit. A, komórki te produkują w nadmiarze osteokalcynę i kolagen typu I [34,35]. Jednak podstawowym niekorzystnym objawem nadmiarem retinolu w organizmie jest nasilenie procesów resorpcji tkanki kostnej. Jak wykazały badania przeprowadzone przez Frankela i wsp. [36] zastosowanie u szczurów 15 mg retinolu 3x dziennie przez 6 tygodni powoduje wzrost liczby osteoklastów. Badania wykonane przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazały, że retinol może regulować ilość i rozmieszczenie podosomów w osteoblastach co powoduje nasilenie aktywności resorpcyjnej osteoklastów. Navia i Harris stwierdzili w swoich badaniach, że wysokie dawki retinolu powodują zwiększoną resorpcję kości poprzez stymulowanie wydzielania enzymów lizosomalnych przez osteoklasty oraz poprzez wzrost wydzielania parathormonu. [33]

Występujące pod wpływem nadmiaru retinolu zmiany w tkance kostnej u zwierząt są również obserwowane u ludzi. Badania epidemiologiczne wykonane w Szwecji u kobiet w wieku pomenopauzalnym wykazały, że nadmierne spożywanie przez dłuższy okres czasu retinolu, powyżej 1,5 mg/d., powodowało zmniejszenie gęstości mineralnej kości i zwiększenie ryzyka złamań kości udowej [37]. Opisano przypadek 59-letniej kobiety, która przez 6 lat przyjmowała 30000 j.m. retinolu dziennie. Oprócz znacznej hiperlipidemii i po wykluczeniu innych przyczyn niż hiperwitaminoza w badaniach radiologicznych stwierdzono: hiperostozę biodra i niesprawność stawu kolanowego. Michaelson i wsp. [37] na podstawie swoich badań sformułowali wniosek, że zwiększona podaż retinolu jest przyczyną powstawania osteoporozy

As a result of vitamin A deficiency bone remodulation retards, osteoclasts' activity is reduced, mainly in periosteal region causing bone hypertrophy. This phenomenon can lead in young people to narrowing of natural canals and apertures, containing nerves and cause neuropathies and deafness [38]. Deficit of vitamin A in cartilages impairs chondrocytes' differentiation, decreases synthesis of glucoaminoglycates in chondrocytes and stops bone growth. Due to inhibition of bone resorption it also leads to bone deformations [38].

The retinoids (acidic derivatives of vitamin A) were introduced to therapy as epidermal proliferation and keratinisation normalizing agents in acne and psoriasis. They are also used in chemotherapy of malignant tumors like neuroblastoma, cutaneous T-cell lymphoma and acute promyelocytic leukemia.

A study run on murine females showed that a 3 months of application of 75-300 mg/d of all-trans-retinoid acid caused hyperostosis [39].

Clinical applications of retinoids in skin diseases and oncological therapy is linked with an until recently underestimated toxic influence on skeleton. However no negative effect on bone growth was discovered in teenagers with acne treated with oral isotretinoin (13cis-retinoid acid), 15 % of these patients reported osteodynia and myalgia. Some studies suggest no effect of synthetic retinoids on bones, while in other a toxic effect on skeleton was discovered, like periosteal thinning, calcified ligaments, osteophytes, premature epiphysial ossification, osteoporosis. Of all 90 patients treated with etretinate for minimum 2 years, 15% had a 10-15% lower total bone mass compared to age, body weight and sex adjusted control group. Isotretinoin therapy reduced levels of bone turnover markers in 11 patients, while in 18 reduced femoral BMD in Ward's area. Etretinate therapy lasting 3,7 years average was linked with reduction of bone mass in lumbar vertebrae in 15 of 90 patients, causing osteoporosis in 7 cases. Toxicity of retinoids on bone tissue applied in oncological therapy is known. All-trans-retinoid acid in therapy for acute promyelocytic leukemia causes similar to vitamin A hypervitaminosis effects (headaches, rash, osteodynia) including hypercalcemia and low PTH levels. Periostitis like vitamin A hypervitaminosis, can be evoked during treatment with 13cis-retinoid acid for neuroblastoma, while another synthetic retinoid – fenitidine- forces bone resorption. These data prove toxicity of therapy with retinoids against bone tissue in skin and malignant diseases [39,40].

u ludzi. Stwierdzili oni, że spożywanie wit. A powyżej 1,5 mg./dz. powoduje zmniejszenie gęstości mineralnej kości udowej o 10%, kręgow łędźwiowych o 14%, a całkowitej masy kostnej o 6%, natomiast ryzyko złamań kości biodrowej zwiększa się dwukrotnie. U kobiet z hipervitaminozą A w wieku od 55-80 lat, zaobserwowano spadek masy kostnej i zwiększone ryzyko złamań [37]. Hipervitaminaza A u ludzi może objawiać się również bólami kostnymi [35]. W przypadku nadmiernej podaży retinolu zwiększa się ilość osteoidu, w którym włókna kolagenu mają liczne wiązania międzycząsteczkowe. Nadmiar witaminy A powoduje zaburzenia różnicowania się chondrocytów, co prowadzi do zatrzymania wzrostu kości. Dochodzi również do nadmiernego wzrostu więzadeł i ścięgien oraz ich mineralizacji [35].

W niedoborze wit. A proces przebudowy kości ulega zwolnieniu, zmniejsza się aktywność osteoklastów, głównie od strony okostnej, co powoduje przerost kości. Przerost kości od strony okostnej może u młodych osób zwać otwory przez które przechodzą włókna nerwowe, co prowadzi do uszkodzenia nerwów i utraty słuchu [38]. Niedobór witaminy A powoduje w obrębie chrząstki zwolnienie różnicowania się chondrocytów, zmniejsza w chondrocytach syntezę glikozaminoglikanów i hamuje wzrost kości. Ze względu na hamowanie procesów resorpcji powoduje powstawanie zniekształceń kości.[38]

Retinoidy (pochodne kwasowe witaminy A), zostały wprowadzone do leczenia jako środki normalizujące proliferację i keratynizację komórek naskórka (w leczeniu trądzika, łuszczycy) Są one również stosowne w terapii nowotworów złośliwych m.in. nerwiaka niedojrzałego, chłoniaka T-komórkowego skóry oraz ostrej białaczki promielocytowej.

W badaniach przeprowadzonych na samicach myszy wykazano, że stosowanie przez 3 miesiące kwasu all-trans retinowego w dawce 75-300 mg/d. powodowało hiperostozę [39].

Kliniczne zastosowanie retinoidów w leczeniu chorób skóry i nowotworów złośliwych wiąże się z występowaniem, do tej pory niedocenianym toksycznym działaniem na układ kostny. Stwierdzono ostatnio, że izotretinoina (kwas 13-cis-retinowy) stosowana w leczeniu trądziku u nastolatków nie powoduje działań ubocznych na wzrost kości, jakkolwiek aż u ok. 15% pacjentów leczonych izotretinoiną podawaną doustnie występowały bóle stawów i mięśni. Niektóre badania sugerują, że terapia syntetycznymi retinoidami nie ma wpływu na kości, natomiast w innych badaniach stwierdza się ich toksyczny wpływ na układ szkieletowy, objawiający się m.in. zciężeniem odokostnowym, zwapnieniem więzadeł, tworzeniem się osteofitów, przedwczesnym zamykaniem nasad i osteoporozą. U 15 % pacjentów (z 90), leczonych co najmniej przez 2 lata etretinatem masa kostna była o około 10-15% niższa niż w grupie kontrolnej o tej samej płci, wieku i masie ciała. Terapia izotretinoiną powodowała obniżenie markerów obrotu kostnego u 11 pacjentów, a u 18 pacjentów wiązała się z obniżeniem gęstości kości udowej (mierzonej w polu Wardsa). Tera-

The mechanism of retinoids' activity relies on regulation of gene transcription through nuclear receptors RAR and RXR, which bind with specific DNA loci as either homo- (RXR/RXR) or heterodimer (RAR/RXR). The RXR receptors play a role in a wide spectrum of hormonal systems' reactions through their ability of association with other nuclear receptors and formation of heterodimer, like for instance with VDR; this may explain described in bibliography interaction of vitamins A and D on the development and mineralization of bones [41].

### Vitamin C (ascorbic acid)

Ascorbic acid thanks to its reversal oxidation-reduction potential to dehydroascorbic acid, acts in many oxidation-reduction reactions like conversion of folic acid to tetrahydrofolic, dopamine hydroxylation to norepinephrine, proline and lysine hydroxylations. It is necessary for serotonin synthesis, steroid hormones and collagen production.

In bone remodulation vitamin C takes part in proline and lysine hydroxylation, thus conditioning creation of type I collagen. Vitamin C is required for cross-linking in collagen formation into stable fibrillae and in formation of the tertiary helical structure of collagen, so provisional callus can be formed in fracture healing [17]. In the bone matrix follicles vitamin C stimulates Bone Alkaline Phosphatase (B-ALP), a marker of osteoblastic activity or osteogenesis [32].

Osteoblasts possess a stereo-selective membrane transportation system – L-ascorbic acid is permitted only, D-ascorbic is not. This transport to the osteoblasts is Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ions -dependent. Decrease of sodium ions or increase of potassium in extracellular space inhibits permeability of vitamin C. Ascorbic acid once entered cytoplasm is uptaken mainly by endoplasmatic reticulum and becomes a co-factor in post-translation modification of pro-collagen. It also takes part in non-collagen proteins creation in bone healing and plays an important role in the development of mesenchymal cells, chondroblasts and other osteogenetic cells [42].

pia etretinatem, trwająca średnio ok. 3,7 r. wiązała się z obniżeniem masy kostnej kręgów lędźwiowych u 15 z 90 pacjentów, a u pacjentów 7 powodowała osteoporozę. Stwierdzono również toksyczne działanie na kości, retinoidów stosowanych w leczeniu nowotworów złośliwych. Kwas all-trans retinowy, stosowany w leczeniu ostrej białaczki promielocytowej wywoływał działania niepożądane podobne do hiperwitaminozy A (ból głowy, wysypka, ból kości) łącznie z hiperkalcemią i niskim stężeniem PTH. Stwierdzono również, że kwas 13-cis retinowy, stosowany w terapii neuroblastoma (nerwiaka niedojrzałego) powoduje zapalenie okostnej podobnie jak nadmiar wit. A, a podawanie syntetycznej pochodnej kwasu retinowego – fenretinidyny - prowadzi do zwiększonej resorpcji kości. Te dane potwierdzają, że retinoidy stosowane w leczeniu chorób skóry i nowotworów działają toksycznie na układ kostny. [39,40]

Mechanizm działania retinoidów wiąże się z regulacją transkrypcji genów, poprzez receptory jądrowe RAR i RXR, które w postaci homo (RXR/RXR) i heterodimerów (RAR/RXR) łączą się ze swoistymi miejscami odpowiedzi w DNA. Receptory RXR uczestniczą w szerokim wachlarzu systemów odpowiedzi hormonalnej, poprzez możliwość asocjacji z innymi receptorami jądrowym i tworzenie heterodimerów, na przykład z receptorem VDR dla witaminy D, co tłumaczy opisywaną w literaturze interakcję wit A i D na rozwój i mineralizację kości [41].

### Witamina C (kwas askorbowy)

Kwas askorbowy dzięki możliwości odwracalnego utleniania do kwasu dehydroaskorbowego uczestniczy w licznych procesach oksydo-redukcyjnych m.in. w redukcji kwasu foliowego do tetrahydrofoliowego, hydroksylacji dopaminy do noradrenaliny oraz hydroksylacji proliny i lizyny. Jest niezbędny w syntezie serotoniny i hormonów steroidowych oraz kolagenu.

W procesie przebudowy kości witamina C uczestnicząc w hydroksylacji lizyny i proliny, warunkuje wytwarzanie kolagenu typu I. Jest potrzebna do tworzenia wiązań sieciujących (cross-links) przy organizowaniu się kolagenu w stabilne fibrylle oraz przy tworzeniu się trzeciorzędowej struktury helikalnej kolagenu, co jest niezbędne przy tworzeniu niedojrzałej kostniny w procesie gojenia złamań kości. [17] Witamina C w pęcherzykach macierzy kostnej stymuluje alkaliczną fosfatazę (B-ALP - Bone Alkaline Phosphatase) która jest markerem kościotworzenia (aktywności osteoblastycznej) [32].

Osteoblasty posiadają stereoselektywny system transportu przez błony kwasu askorbowego – penetruje tylko kwas L-askorbowy (nie D-askorbowy). Transport kwasu askorbowego do wnętrza osteoblastów zależy od jonów Na<sup>+</sup> i K<sup>+</sup>. Zmniejszenie stężenia jonów sodu lub wzrost stężenia jonów potasu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej hamuje wnikanie witaminy C do osteoblastów. Kwas askorbowy po wniknięciu do osteoblastów jest wychwytywany głównie przez siateczkę śródplazmatyczną i odgrywa rolę kofaktora w potranslacyjnej modyfikacji pro-

Ascorbic acid as a reducing agent is extremely important. Since fracture is accompanied by inflammatory reaction and creation of free radicals, reducing agents - like vitamin C - can neutralize harmful molecules. Some authors reported beneficial activity of vitamin C, while others warn against it, since reducing compounds like ascorbic acid in presence of metals like iron can generate even more free radicals in Fenton's reaction.

Deficit of vitamin C is a rare finding in developed countries, except specific sub-populations like elderly, alcoholics and smokers, usually having lower vitamin C concentrations than healthy people (subclinical deficiency). Major deficits of vitamin C may significantly impair fracture healing, however the influence of subclinical deficit on bone fragility remains unknown. Deficiency of ascorbic acid leads to osteoid depletion, impaired bone matrix formation, indirectly affects ossification. Lack of vitamin C also impairs collagen formation in other tissues, like blood vessels. Vessels of periosteum become highly frangible and even minor trauma leads to subperiosteal hematomas. The latter often calcify, so the surface of the bone becomes rough and pleated.

In the external space, at periosteum, vitamin C reduces count of the cells potentially convertible to osteoblasts, reduces rate of osteogenesis near periosteum.

Vitamin C hypovitaminosis does not affect osteoclasts' function. The proceeding resorption of cortical bone at endosteum side (due to reduced osteoblasts' activity) leads to thinning of the cortical bone. In vitamin C deficiency remodulation of trabecular bone is also impaired. As a result of reduced collagen synthesis by osteoblasts, mineralization is affected, trabeculae become thinner and weaker. Bone remodeling in ascorbic acid depletion is disturbed and leads to osteopenia [43,44]. In young people defects appear also in epiphysial cartilages. Deficit of vitamin C lowers differentiation rate of the cartilage cells and bone growth is stopped [45]. Vitamin C inhibits activity of lysosomal enzymes in articular cartilages. Deficiency of the vitamin results in increased activity of these enzymes in the cartilages and finally to arthrosis.

In the children vitamin C hypovitaminosis leads to Moller-Barlow's disease, with bone density reduction and painful thickenings of the bone epiphyses, mainly in distal ends of femur and proximal epiphysis in the crus. Susceptibility to fractures is marked. Anaemia and bone marrow fibrosis develop. Fracture healing in such conditions is much slower. Supplementation of vitamin C allows for rapid improvement and withdrawal of the symptoms [46].

kolagenu. Witamina C uczestniczy również w tworzeniu niekolagenowych białek w procesie gojenia kości oraz odgrywa ważną rolę w rozwoju komórek mezenchymalnych, chondroblastów oraz innych typów komórek kościotwórczych [42].

Kwas askorbowy jest ważnym reduktorem. Ponieważ złamaniu towarzyszy stan zapalny i tworzenie wolnych rodników, redukujące substancje takie jak witamina C mogą neutralizować te szkodliwe elementy. Niektórzy autorzy opisywali korzystne działanie, inni ostrzegali, że w obecności takich metali jak żelazo, redukujące substancje, m.in. witamina C, mogą generować jeszcze więcej wolnych rodników drogą reakcji Fentona.

Niedobór witaminy C występuje niezwykle rzadko w krajach rozwiniętych, wyjątkiem są niektóre grupy społeczne takie jak: ludzie starzy, alkoholicy i palacze tytoniu, u których poziom witaminy C jest niższy niż u zdrowych osobników (subkliniczny niedobór). Duże niedobory witaminy C mogą poważnie upośledzać gojenie się złamań, jednak wpływ subklinicznej hipowitaminozy na łamliwość kości jest do tej pory nie znany. Niedobór kwasu askorbowego prowadzi do niedoboru osteoidu, niewłaściwego wykształcania macierzy kostnej, co pośrednio upośledza procesy kostnienia. Przy niedoborze wit. C upośledzona jest również synteza kolagenu w innych tkankach m.in. w naczyniach krwionośnych. Naczynia krwionośne okostnej stają się szczególnie wrażliwe i nawet drobne urazy powodują powstawanie krwiaków podokostnowych. Krwiaki te ulegają następnie wapnieniu i kość staje się nierówna, pofałdowana.

W przestrzeni zewnętrznej od strony okostnej witamina C zmniejsza liczbę komórek, które mogą być przekształcane w osteoblasty, zwalniając proces tworzenia kości od strony okostnej.

Niedobór witaminy C nie zaburza czynności osteoklastów. Postępująca resorpcja kości korowej od strony endosteum (na skutek zmniejszania się aktywności osteoblastów) powoduje zmniejszenie grubości kości korowej. Przy niedoborze wit. C zaburzeniu ulega również proces przebudowy beleczek kostnych. Na skutek zmniejszonego wytwarzania kolagenu przez osteoblasty, występuje zaburzenie mineralizacji, beleczki kostne stają się cienkie i mało wytrzymałe. Zaburzenia procesu przebudowy kości przy niedoborze witaminy C prowadzą do wystąpienia osteopenii [43,44]. Przy niedoborze witaminy C u młodych osób występują również zaburzenia w obrębie chrząstek wzrostowych nasad kości. Niedobór witaminy C zwalnia proces różnicowania się komórek chrząstki i wzrost kości zostaje zatrzymany [45]. Witamina C hamuje również aktywność enzymów lizosomalnych w chrząstce stawowej. Niedobór witaminy C zwiększa aktywność tych enzymów w chrząstce i prowadzi do zmian zwyrodnieniowych w obrębie stawów.

U dzieci niedobór witaminy C powoduje chorobę Moller-Barlowa, która charakteryzuje się rozrzedzeniem tkanki kostnej oraz bolesnymi zgrubieniami w okolicy nasad kości, głównie dalszych nasad kości udowych i bliższych nasad kości podudzia. Wstępuje podatność



The Recommended Daily Allowance (RDA) of vitamin C currently is 75mg/d for women and 90mg/d for men. This remains a minimum preventing from hypovitaminosis, still not being protective in chronic diseases. Consumption of higher than RDA doses of vitamin C improves bone quality. In postmenopausal women higher BMD is connected with higher consumption of ascorbic acid (up to 1000mg/d) [47].

### Vitamin E (tocopherols)

Term "vitamin E" means a group of various tocopherols -  $\alpha, \beta, \gamma$ . They are the main antioxidants of the cell membranes, stabilizing duplex lipid layer, which ensures optimal conditions for functioning of the receptors, transportation systems, enzymatic structures in cellular membranes. Enzymes of the monooxygenase system enable biosynthesis of important endogenic compounds (steroid hormones, polyunsaturated lipid acids, hormonally active forms of vitamin D3 and A), on the other hand they condition detoxication of xenobiotics. The same important is protective antioxidant potential of tocopherols for -SH groups in proteins (in respiratory cycle proteins, cellular membranes transporting proteins). Extremely important function of tocopherols is regulation of RNA biosynthesis as well as synthesis of haem stem in haem-containing proteins. One cannot overrate this phenomenon, since haem is not only linked with oxygen transportation, but also with many other important biochemical functions in cytochrome P-450-dependent system. Thus complete activity of tocopherols includes functioning of cardiovascular, endocrine, muscular, haematopoietic and skeletal system.

It is suggested in recent studies that  $\alpha$ -tocopherol, the most common dietary form of vitamin E influences metabolism in the bones of adult animals and prevents from loss of bone mass in rats [48]. Earlier animal based experimental models (animals with loss of bone mass like ovariectomized rats and old 24 months mice) revealed a protective potential of vitamin E. Its supplementation improved biomechanical features in the bones without gaining BMD and increased synthesis of mRNA for osteocalcin,  $\alpha$ -collagen type I and IGF-1 (Insuline Growth Factor -1) [49]. These findings suggest that vitamin E has an osteoprotective potential through influencing the proteins of bone matrix [48,49]. *In vitro* experiments proved, that proinflammatory factors, like IL-1 and TNF- $\alpha$  stimulate production of free radicals resulting in stimulation of osteoclasts.

kości na złamanie. Oprócz niedokrwistości występują zmiany włókniste w szpiku. W przypadku niedoboru witaminy C gojenie się złamań kości jest znacznie zwolnione. Podanie kwasu askorbowego powoduje szybkie cofanie się zmian w kościach wywołanych niedoborem witaminy [46].

Zalecana dawka dzienna (RDA – Recommended Dietary Allowance) witaminy C wynosi obecnie: 75 mg/d dla kobiet i 90 mg/d dla mężczyzn. Jest to jednak ciągle minimum niezbędne w zapobieganiu niedoborom, a nie ochrona przed przewlekłą chorobą. Przyjmowanie wyższych dawek niż RDA wit C wiąże się z polepszeniem zdrowia kości. U kobiet postmenopauzalnych większa gęstość mineralna kości (BMD) wiąże się z przyjmowaniem wyższych dawek witaminy C (aż do 1000 mg/d). [47]

### Witamina E (tokoferole)

Witamina E obejmuje różnego typu tokoferole ( $\alpha, \beta, \gamma$ ). Są one głównymi antyoksydantami błon komórkowych, stabilizującymi podwójną warstwę lipidową, co zapewnia optymalne warunki funkcjonowania receptorów, systemów transportu i struktur enzymatycznych błon komórkowych. Enzymy systemu monooksygenazowego, umożliwiają z jednej strony biosyntezę ważnych endogennych związków (hormonów steroidowych, wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, hormonalnie czynnych postaci witaminy D<sub>3</sub> i A), a z drugiej strony warunkują detoksykację ksenobiotyków. Niemniej ważne znaczenie mają tokoferole jako antyutleniacze chroniące grupy SH w białkach (m.in. w białkach systemu oddechowego, transportowego błon komórkowych). Wyjątkowo ważną funkcją tokoferoli jest regulowanie biosyntezy RNA a także syntezy jądra hemu w białkach mających grupę hemową. Znaczenie tego efektu trudno przecenić, ponieważ z hemem wiąże się nie tylko zapotrzebowanie organizmu na tlen, ale i przebieg ważnych biochemicznych funkcji poprzez system P-450 – cytochromo-zależny, w związku z czym tokoferole mają istotny wpływ na czynność różnych układów organizmu: sercowo-naczyniowego, gruczołów wydzielania dokrewnego, tkanki mięśniowej, układu krwiotwórczego a także kostnego.

Przeprowadzone ostatnio badania sugerują, że  $\alpha$ -tokoferol, który jest najczęściej przyjmowaną z dietą formą witaminy E, wpływa na metabolizm kości u dorosłych zwierząt i zapobiega utracie masy kostnej kończyn u szczurów.[48] Wcześniej prowadzone badania na modelach zwierzęcych (zwierzęta z utratą masy kości – ovariectomizowane szczury i stare 24-miesięczne myszy) wykazały osteoprotekcyjne działanie witaminy E. Suplementacja witaminy E poprawiała własności biomechaniczne kości, bez zwiększania ich gęstości mineralnej oraz zwiększała syntezę mRNA dla osteokalcyny,  $\alpha$ -kolagenu typu I i IGF-1 (Insuline Growth Factor I).[49]. Te odkrycia sugerują, że witamina E poprzez wpływ na białka macierzy kostnej wykazuje działanie osteoprotekcyjne. [48,49] W badaniach *in vitro* wykazano, że mediatory prozapalne takie jak IL-1 i TNF- $\alpha$  po-

High concentrations of free radicals inhibit proliferation and differentiation of osteoblasts, facilitate synthesis of NO and collagenase. These processes can be impeded by vitamin E [50]. In the *in vivo* studies, vitamin E improved bone histomorphometric factors like Mineral Apposition Rate (MAR), Bone Formation Rate (BFR) – marker of ossification and correct bone growth maintenance in chicken, probably through inhibition of free radicals' creation, which impair osteogenesis.

Vitamin E is known to affect secretion of proinflammatory cytokines, like IL-6 through inhibition of 5-lipoxygenation pathway and stimulation of T-lymphocytes response via inhibition of inductive form of COX-2, thus reducing synthesis of PGF-2 by macrophages. According to Smith et al studies [49], high doses of tocopherol reduced levels of COX-2 in proximal epiphyseal cartilage of tibia and confirmed inhibitory activity of vitamin E on synthesis of PGE-2 in the bones. *In vitro* PGE-2 stimulates differentiation of osteoblasts and osteoclasts, as well as brakes activity of osteoblasts and collagen synthesis. *In vivo* studies revealed, that application of PGE-2 stimulates anabolism in the bones. Detailed explanation of the mechanisms of vitamin E action on bone tissue demands further investigations.

### Group B vitamins

Of all the group B vitamins, a major role in bone metabolism belongs to thiamin (B1), riboflavin (B2), pyridoxine (B6), cobalamine (B12) and folic acid. These vitamins act on bones metabolism in an indirect manner, through regulation of homocysteine level. In most of the cells dominant way of homocysteine conversion to methionine is by a B12-dependent methionine synthase transfer of methyl- groups from 5-methyl-tetrafolate to homocysteine. Alternative conversion of homocysteine is possible to cystathionin with cystathionin b-synthase and vitamin B6 (trans-sulphuration pathway). Riboflavin (B2) participates in folic acid metabolism, thus mediates homocysteine biotransformation [51].

Homocysteine is thought to be an independent risk factor of atherosclerotic lesions (i.e. brain stroke, myocardial infarct) and thrombosis. It is proved, that increased concentration of homocysteine in bones is a potential risk factor of osteoporotic age-related fractures. Homocysteine can accumulate in bones through binding with collagen and affecting in that way formation/cross-linking of collagen. It is also known as stimulator of osteoclasts' proliferation and activation through stimulation of p38 Mitogen Activated Protein Kinase (p38 MAPK) and integrins- $\beta_3$  [52].

budzą tworzenie wolnych rodników i w rezultacie prowadzą do pobudzenia wzrostu osteoklastów.

Wysokie stężenia wolnych rodników hamują wzrost i różnicowanie osteoblastów, oraz pobudzają produkcję NO i kolagenazy. Procesy te są hamowane przez witaminę E. [50]. W badaniach *in vivo* wykazano, że witamina E poprawia wskaźniki histomorfometryczne kości takie jak: MAR (Mineral Apposition Rate) – szybkość przywarstwiania kości i BFR (Bone Formation Rate) – wskaźnik kostnienia i podtrzymuje prawidłowy rozwój kości u młodych kurcząt, prawdopodobnie poprzez hamowanie tworzenia wolnych rodników, które hamują kościotworzenie.

Wykazano również, że witamina E hamuje wydzielanie cytokin prozapalnych m.in. IL-6 poprzez hamowanie szlaku 5-lipoksygenazy i pobudza odpowiedź limfocytów T poprzez hamowanie aktywności indukowalnej formy COX-2, a tym samym zmniejsza produkcję PGF-2 przez makrofagi. W prowadzonych przez Smith i współ. badaniach [49] stwierdzono, że wysokie dawki witaminy E zmniejszały poziom COX-2 w płytce wzrostowej nasady bliższej piszczeli i potwierdziły hamujący wpływ witaminy E na syntezę PGE-2 w kościach. *In vitro* PGE-2 stymuluje różnicowanie osteoblastów i osteoklastów oraz hamuje aktywność dojrzałych osteoblastów i syntezę kolagenu. W badaniach *in vivo* stwierdzono, że podawanie PGE-2 wiąże się z pobudzaniem procesów anabolicznych kości. Wyjaśnienie dokładnego mechanizmu oddziaływania witaminy E na kości wymaga dalszych badań.

### Witaminy grupy B

Z witamin grupy B istotny wpływ na metabolizm kości wywierają: tiamina ( $B_1$ ), ryboflawina ( $B_2$ ), pirydoksyna ( $B_6$ ), kobalamina ( $B_{12}$ ) a także kwas foliowy. Witaminy te oddziałują na procesy metaboliczne kości pośrednio, poprzez wpływ na poziom homocysteiny. W większości komórek główną drogą konwersji homocysteiny do metioniny jest przeniesienie grup metylowych z 5-metylotetrafolianu na homocysteinę. Proces ten katalizowany jest przez zależną od wit.  $B_{12}$  syntazę metioninową. Homocysteina może być także przekształcana do cystationiny przez  $\beta$ -syntazę cystationinową przy udziale witaminy  $B_6$  (szlak trans-sulfuracji). Ryboflawina ( $B_2$ ) bierze udział w metabolizmie kwasu foliowego i na tej drodze pośredniczy w biotransformacji homocysteiny. [51]

Homocysteina jest uważana u ludzi za niezależny czynnik ryzyka rozwoju zmian miażdżycowych (udar mózgu i zawału mięśnia sercowego) oraz zakrzepowych. Wykazano również, że podwyższony poziom homocysteiny w kościach jest potencjalnym czynnikiem ryzyka złamań osteoporotycznych związanych z wiekiem. Homocysteina może kumulować się w kościach poprzez wiązanie z kolagenem i w ten sposób powoduje upośledzenie sieciowania kolagenu. Stwierdzono również, że stymuluje ona tworzenie osteoklastów oraz pobudza ich aktywność na skutek stymulacji p38 MAPK (p38 Mitogen Activated Protein Kinase) i integriny- $\beta_3$ . [52]

The risk of femoral neck fracture related to higher homocysteine levels was studied in older men and women by Yzdanpanah et al. [53]. A large group of 5304 Caucasian 55+y.o. was studied and revealed a relation between group B vitamins administration and femoral neck bone mineral density (FN BMD) and risk of transcervical fractures of femur was discovered. The cases of fractures, other than vertebral, were analyzed throughout 7,4 years average, while fractures of vertebrae through 6,4 years. A minimal, nevertheless a significant positive correlation between dietary supplementation of vitamin B6 and B2, and FN BMD was discovered. Additionally, application of pyridoxine revealed a negative correlation with the risk of fractures, compared to control group of similar age, sex and body weight. The oldest age group fed with age-adjusted calories diet and supplemented with pyridoxine, when compared to the three youngest intervals had a lower risk of fractures (other than vertebral) as well as of pathological fractures. Based on these data, authors conclude, that increased dietary supplementation of riboflavin and pyridoxine correlates with FN BMD. More to that, a reduction of fractures is linked with diet pyridoxine supplementation, independently to body mass.

Studies ran by Abrahamsen et al. showed that in postmenopausal women increased risk of fractures correlates with methy-tetrahydrofolate reductase (MTHFR (C677T)) gene polymorphism in homozygotic women. Other research revealed, that only B2 vitamin supplementation correlated with reduced risk of transcervical fractures of femur in MTHFR homozygotic women (TT homozygotic people were included only) [54].

Vitamin B6 is a co-factor of ornithine decarboxylase, participating in NADPH metabolism and regulates its concentration in osteoblasts. NADPH is also a necessary in vitamin K metabolism, the latter being proved as active in bone mineralization [55]. Animal studies revealed, that vitamin B6 deficiency impairs bone's mechanical value [53].

Vitamin B12 is required for correct function of osteoblasts. It acts as a co-factor of osteoblastic enzymes, like bone alkaline phosphatase (B-ALP) and osteocalcin. It also takes part in iron metabolism, influencing correct bone development [56]. The studies showed higher occurrence of osteoporosis in men and women with B12 hypovitaminosis [56].

Yazdanpanah i współ. badali ryzyko złamań u mężczyzn i kobiet w starszym wieku, u których stwierdzono podwyższony poziom homocysteiny. [53] W badaniach tych, prowadzonych na dużej populacji osób starszych rasy Kaukaskiej (5304 osoby w wieku powyżej 55 roku życia) wykazano zależność pomiędzy podażą witamin z grupy B a gęstością mineralną szyjki kości udowej (FN BMD) i ryzykiem złamań kości. Przypadki wystąpienia złamań (inne niż złamania kręgów) były analizowane przez okres średnio 7,4 lat a złamania kręgów – przez okres średnio 6,4 lat. Zaobserwowano niewielki ale znamienny dodatni związek pomiędzy podażą z dietą pirydoksyny i ryboflawiny a bazową gęstością mineralną kości udowej (FN BMD). Dodatkowo zaobserwowano, że podaż pirydoksyny odwrotnie korelowała z ryzykiem złamań w porównaniu z grupami kontrolnymi z tego samego przedziału wiekowego, płci i masy ciała. W porównaniu z osobami z trzech najniższych przedziałów wiekowych, osoby w najwyższym przedziale wiekowym, które otrzymywały pirydoksynę z dietą dostosowaną do ich zapotrzebowania energetycznego miały obniżone ryzyko złamań (innych niż kręgowych) i złamań patologicznych. Na podstawie tych badań autorzy wnioskowali, że zwiększona podaż z dietą ryboflawiny i pirydoksyny wiąże się z wyższym FN BMD. Oprócz tego zaobserwowali obniżenie ryzyka złamań przy przyjmowaniu z dietą pirydoksyny, niezależnie od masy ciała.

Badania prowadzone przez Abrahamsena i współ. wykazały, że u kobiet po menopauzie podwyższone ryzyko złamań wiąże się z polimorfizmem genu MTHFR (C677T)- genu reduktazy metylenotetrahydrofolanowej u kobiet homozygotycznych. W innych badaniach odkryto, że jedynie podaż ryboflawiny (B<sub>2</sub>) korelowała ze zmniejszonym ryzykiem złamań szyjki kości udowej u kobiet homozygotycznych co do genu MTHFR (w analizowanej grupie osoby posiadające homozygotyczny genotyp TT). [54]

Witamina B<sub>6</sub> jest kofaktorem dekarboksylazy ornitynowej, która uczestniczy w metabolizmie NADPH i reguluje jego stężenie w osteoblastach. NADPH jest również niezbędny w metabolizmie witaminy K, której wpływ na procesy mineralizacji tkanki kostnej został dowiedziony.[55]. Badania na zwierzętach wykazały, że niedobór witaminy B<sub>6</sub> upośledza właściwości mechaniczne kości.[53]

Witamina B<sub>12</sub> jest niezbędna dla prawidłowej funkcji osteoblastów. Jest ona ko-faktorem związanych z osteoblastami białek enzymatycznych, takich jak fosfataza alkaliczna kości i osteokalcyna. Witamina B<sub>12</sub> uczestniczy także w metabolizmie żelaza a poprzez to wpływa na prawidłowy rozwój kości [56]. Badania wykazały częstsze występowanie osteoporozy u kobiet i mężczyzn z niedoborem wit. B<sub>12</sub>. [56]

### Witaminy K

Pod nazwą witamina K występują naturalne (K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>) i syntetyczne (K<sub>3</sub>, K<sub>4</sub>) pochodne naftochinonu, które wy-

## Vitamins K

The term "vitamin K" covers both natural (K<sub>1</sub>, K<sub>2</sub>) and synthetic (K<sub>3</sub>, K<sub>4</sub>) derivatives of naphthoquinone, all of similar biological, mainly anti-hemorrhagic activity. Vitamins K work as glutamine carboxylase's co-factors and are necessary for carboxylation of glutamate acid to  $\gamma$ -carboxyglutamate in clotting factors II, VII, IX, X. Gamma-carboxyglutamate acid in the mentioned clotting factors is necessary for binding these compounds with calcium ions, as required for clotting [32].

Vitamin K is a co-factor of  $\gamma$ -carboxylase in osteoblasts and hypertrophic chondrocytes – enzyme required for  $\gamma$ -carboxylation of glutamate acid building proteins like osteocalcin – a major non-collagen protein of the bones. Vitamin K deficiency increases concentration of not decarboxylated osteocalcin, a protein of poor value, not fully functioning, found in osteoporotic bones. Clinical studies proved a connection between low vitamin K consumption and low BMD and higher risk of bone fractures [55]. Opposite to supplementation of vitamin K, which decreases level of not decarboxylated osteocalcin, diminish calciuria and bone resorption. These studies suggest, that women in the lowest vitamin K consumption interval (<109  $\mu$ g/d) have lowest BMD and highest risk of bone fractures compared to women in higher intervals.

kazują podobną aktywność biologiczną, głównie działanie przeciwkrwotoczne. Witaminy K pełnią rolę koenzymów karboksylazy glutaminowej i warunkują w wątrobie karboksylację kwasu glutaminowego do kwasu  $\gamma$ -karboksylglutaminowego w czynnikach krzepnięcia II, VII, IX i X. Kwas  $\gamma$ -karboksylglutaminowy w wymienionych czynnikach jest niezbędny, ponieważ umożliwia wiązanie przez te czynniki jonów wapnia, które są konieczne w procesie krzepnięcia.[32]

Witamina K jest kofaktorem  $\gamma$ -karboksylazy w osteoblastach i hipertroficznym chondrocytach – enzymu niezbędnego w  $\gamma$ -karboksylacji kwasu glutaminowego, wchodzącego w skład takich białek jak osteokalcyna – głównego niekolagenowe białka kości. Niedobór witaminy K powoduje wzrost poziomu nie zdekarboksylowanej osteokalcyny, która jest niepełnowartościowym, mniej funkcjonalnym białkiem wykrywanym w kościach pacjentów z osteoporozą. Badania kliniczne wykazały związek pomiędzy niską podażą witaminy K a niską gęstością mineralną kości (BMD) i większym ryzykiem złamań [55]. Przeciwnie, podaż wit. K zmniejsza poziom niezdekarboksylowanej osteokalcyny, wydalanie wapnia z moczem i resorpcję kości. Z badań tych wynika, że kobiety będące w przedziale najniższej podaży witaminy K (<109  $\mu$ g/d) mają najniższą gęstość mineralną kości (BMD) i największe ryzyko złamań kości w porównaniu z kobietami w wyższych przedziałach.

## References/Piśmiennictwo:

1. Jameel Iqbal, Li Sun, Mone Zaidi.: Coupling bone degradation to formation. *Nat. Med.* 2009; 15 :729 -732
2. Yoshino M , Watanabe Y, Tokunaga Y i wsp. Roles of specific cytokines in bone remodeling and hematopoiesis in Gaucher disease. *Pediatr. Int.* 2007;. 49(6): 959-64.
3. Rauner M, Sipos W, Pietschmann P: Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;143(1):31-48.
4. Li J, Meyer R, Duncan RL, Turner CH.: P2X7 Nucleotide Receptor Plays an Important Role in Callus Remodeling During Fracture Repair. *Calcif Tissue Int.* 2009 ;84(5):405-12.
5. Hsu YH, Niu T, Terwedow HA i wsp.: Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Hum Genet.* 2006;118(5):568-77
6. Bellini A, Mattoli S.: The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibrosis. *Lab Invest.* 2007 ;87(9):858-70.
7. Benayahu D, Akavia UD, Shur I.: Differentiation of Bone Marrow Stroma-Derived Mesenchymal Cells. *Curr Med Chem.* 2007;14(2):173-9.
8. Burdan F, Szumilo J, Korobowicz A i wsp.: Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009;47(1):5-16.
9. Wixted JJ, Fanning PJ, Gaur T i wsp.: Enhanced fracture repair by leukotriene antagonism is characterized by increased chondrocyte proliferation and early bone formation: a novel role of the cysteinyl LT-1 receptor. *J Cell Physiol.* 2009; 221(1):31-9.
10. Dziedzic-Gocławska : Modelowanie strukturalne i przebudowa wewnętrzna tkanki kostnej. *Nowa Klinika* 1994; 5: 3-6.
11. Pogoda P, Priemel M, Rueger JM i wsp.: Bone remodeling: new aspects of a key process that controls skeletal maintenance and repair. *Osteoporos Int.* 2005;16 Suppl 2 : 18-24.
12. Wang M, Crisostomo PR, Herring C i wsp.: Human progenitor cells from bone marrow or adipose tissue produce VEGF, HGF, and IGF-I in response to TNF by a p38 MAPK-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;291(4):R880-4.
13. Kang SK, Kim KS, Byun YS i wsp.: Effects of ulmus davidiana planch on mineralization, bone morphogenetic protein-2, alkaline phosphatase, type I collagen, and collagenase-1 in bone cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2006 ;42(7):225-9.
14. Lim JY, Taylor AF, Li Z i wsp.: Integrin expression and osteopontin regulation in human fetal osteoblastic cells mediated by substratum surface characteristics. *Tissue Eng.* 2005;11(1-2):19-29.
15. Gill KS, Beier F, Goldberg HA : Rho-ROCK signaling differentially regulates chondrocyte spreading on fibronectin and bone sialoprotein. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295(1):C38-49
16. Findlay DM, Haynes DR: Mechanisms of bone loss in rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology* 2005;15:232–240.
17. Bsoul SA, Terezhalmay GT : Vitamin C in health and disease. *J Contemp Dent Pract.* 2004; 15;5(2):1-13
18. Tanaka S, Tsurukami H, Sakai A i wsp.: Effects of 1,25(OH)2D3 on turnover, mineralization, and strength of bone in growing rats with liver cirrhosis induced by administration of carbon tetrachloride. *Bone* 2003 ; 32(3):275-83.
19. Barragan-Adjemian C, Nicolella D, Dusevich V : Mechanism by which MLO-A5 late osteoblasts/early osteocytes mineralize in culture: similarities with mineralization of lamellar bone. *Calcif Tissue Int.* 2006;79(5):340-53.



20. Lacey DL, Timms E, Tan HL: Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 17;93(2):165-76.
21. Bell NH : RANK ligand and the regulation of skeletal remodeling. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1120-2.
22. Tang Y, Wu X, Lei W : TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med*. 2009;15(7):757-65
23. Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G i wsp.: Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov*. 2008 ;92(3):161-8.
24. Włodarski K, Włodarski P, Galus K: Aktywacja komórek osteogennych poprzez polipeptydowe czynniki wzrostu. *Pol.Tyg.Lek*. 1993; t. XLVIII supl. 3: 5-9
25. Janiec W: *Farmakodynamika leków wpływających na układ kostny w Farmakodynamika pod red. Janiec W, Krupińska J, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002; 742-767*
26. Valdivielso JM : The physiology of vitamin D receptor activation. *Contrib Nephrol*. 2009;163:206-12.
27. Ordóñez-Morán P, Muñoz A: Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle*. 2009; 8(11):1675-80.
28. Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S i wsp.: Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J Clin Invest*. 2006; 116(12): 3150-9.
29. Ornoy A, Goodwin D, Noff D i wsp.: 24,25-dihydroxyvitamin D is a metabolite of vitamin D essential for bone formation. *Nature*. 1978; 30,276(5687):517-9.
30. Holick MF : Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007;357:266-281
31. Morita R, Yamamoto I, Takada M i wsp. : Hypervitaminosis D *Nippon Rinsho* 1993 ;51(4):984-8.
32. Janiec W: *Farmakodynamika związków wpływających na przemianę materii. Witaminy w Farmakodynamika pod red. Janiec W, Krupińska J: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1995: 549-554*
33. Navia JM, Harris SS: Vitamin A influence on calcium metabolism and calcification. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;355:45-5733.
34. Lips P : Hypervitaminosis A and fractures. *N Engl J Med*. 2003; 23,348(4):347-9.
35. Binkley N, Krueger D: Hypervitaminosis A and bone. *Nutr Rev* 2000 ;58(5):138-44.
36. Frankel TL, Seshardi MS, McDowall DB i wsp.: Hypervitaminosis A and calcium-regulating hormones in the rat. *J. Nutr* 1986;116(4); 578-87 37. Michaëlsson K, Lithell H, Vessby B i wsp.: Serum retinol levels and the risk of fracture. *N Engl J Med* 2003; 23,348(4):287-94
38. Kapil U: Vitamin A deficiency in children. *Indian J Med Res* 2006;123(5):711.
39. Vahlquist A : Long-term safety of retinoid therapy. *J Am Acad Dermatol* 1992 ;27(6 Pt 2):S29-33
40. Herrmann G, Jungblut RM, Goerz G: Skeletal changes after long-term therapy with synthetic retinoids. *Br J Dermatol*. 1997; 136(3):469-70.
41. Rohde CM, DeLuca H: Bone resorption activation of all-trans retinoic acid is independent of vitamin D in rats. *J Nutr*. 2003; 133(3):777-83
42. Sugimoto M, Hirota S, Sato M i wsp.: Impaired expression of non-collagenous bone matrixprotein mRNAa during fracture healing in ascorbic acid-deficient rats. *J Bone Miner Res*. 1998; 13(2):271-8.
43. Hall SL, Greendale GA: The relation of dietary vitamin C intake to bone mineral density. *Calcif Tissue Int*. 1998;63(3):183-9
44. Morton DJ, Barrett-Connor EL, Schneider DL: Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2001;16(1):135-40.
45. Venezie R, Shenker BJ, Datar S i wsp.: Modulation of chondrocyte proliferation by ascorbic acid and BMP-2. *J Cell Physiol*. 1998 ;174(3):331-41.
46. Mase K: Scurvy, Möller-Barlow disease, Ryoikibetsu *Shokogun Shirizu*. 1998;(21 Pt 2):405-7.
47. Eldridge AL: Comparison of 1989 RDAs and DRIs for Water-Soluble Vitamins. *Nutr Today*. 2004;39(2):88-93.
48. Hermizi H, Faizah O, Ima-Nirwana S i wsp.: Beneficial effects of tocotrienol and tocopherol on bone histomorphometric parameters in sprague-dawley male rats after nicotine cessation. *Calcif Tissue Int*. 2009 ;84(1):65-74.
49. Smith BJ, Lucas EA, Turner RT : Vitamin E provides protection for bone in mature hindlimb unloaded male rats. *Calcif Tissue Int*. 2005;76(4):272-9
50. Ricciarelli R, Maroni P, Ozer N i wsp.: Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by alpha-tocopherol via protein kinase C inhibition. *Free Radic Biol Med*. 1999 ;27(7-8):729-37.
51. Chuang CZ, Boyles A, Legardeur B i wsp.: Effects of riboflavin and folic acid supplementation on plasma homocysteine levels in healthy subjects. *Am J Med Sci*. 2006;331(2):65-71.
52. Claes L, Schmalenbach J, Herrmann M i wsp.: Hyperhomocysteinemia is associated with impaired fracture healing in mice. *Calcif Tissue Int*. 2009 ;85(1):17-21
53. Yazdanpanah N, Zillikens MC, Rivadeneira F i wsp.: Effect of dietary B vitamins on BMD and risk of fracture in elderly men and women: the Rotterdam study. *Bone*. 2007;41(6):987-94.
54. Abrahamsen B, Madsen JS, Tofteng C: Are effects of MTHFR (C677T) genotype on BMD confined to women with low folate and riboflavin intake? Analysis of food records from the Danish osteoporosis prevention study. *Bone*. 2005;36(3):577-83.
55. Shea MK, Booth SL: Update on the role of vitamin K in skeletal health. *Nutr Rev*. 2008;66(10):549-57.
56. Tucker KL, Hannan MT, Qiao N: Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res*. 2005;20(1):152-8.