

## Hydroksyapatyt – co endokrynolog powinien wiedzieć?

<sup>1,2</sup>Witold Koflątaj, <sup>3</sup>Barbara Koflątaj, <sup>1,2</sup>Maria Klatka, <sup>2</sup>Katarzyna Wrzolek

<sup>1</sup>Klinika Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej z Pracownią Metaboliczną UM w Lublinie

<sup>2</sup>Dziecięcy Szpital Kliniczny w Lublinie, Oddział Endokrynologiczny

<sup>3</sup>Katedra i Zakład Epidemiologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

**Adres do korespondencji:** Witold Koflątaj, Klinika Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej z Pracownią Metaboliczną UM w Lublinie, ul. Chodźki 2, 20-093 Lublin, e-mail: wk@data.pl

**Słowa kluczowe:** hydroksyapatyt, osteoblasty, osteoklasty, gospodarka kwasowo-zasadowa, choroby, leki, dieta

**Key words:** hydroxyapatite, osteoblasts, osteoclasts, acid – base balance, diseases, drugs, diet

### STRESZCZENIE/ABSTRACT

Zaburzenia mineralizacji tkanki kostnej stanowią interdyscyplinarny problem medyczny. Wielokrotnie pacjenci z tego typu problemami medycznymi kierowani są do endokrynologów, gdyż mineralizacja tkanki kostnej jest procesem podlegającym regulacji hormonalnej, a schorzenia endokrynologiczne manifestować się mogą takimi powikłaniami, jak osteoporoza, osteomalacja czy porozomalacja. Tymczasem sam proces mineralizacji tkanki kostnej, czyli deponowanie hydroksyapatytu w przestrzeni pozakomórkowej układu kostnego, to nie tylko wynik gry hormonalnej, ale także proces mający powiązanie z metabolizmem ogólnoustrojowym, w tym z bilansem wapniowo-fosforanowym, bilansem jonów  $H^+/OH^-$  w organizmie oraz z wartością parametru  $pO_2$  w tkance kostnej. W niniejszym artykule przedstawione zostały warunki krystalizacji/dysocjacji jonowej hydroksyapatytu oraz mineralizacji/demineralizacji tkanki kostnej w kontekście stosowanej diety, współistniejących schorzeń ogólnoustrojowych oraz stosowania leków interferujących z gospodarką  $H^+/OH^-$  lub niekorzystnie wpływających na  $pO_2$ . Informacje te pozwalają na zrozumienie, dlaczego endokrynolog niekiedy nie osiąga sukcesów terapeutycznych w leczeniu zaburzeń mineralizacji tkanki kostnej pomimo ustabilizowania osoczowych parametrów  $Ca^{2+}/PO_4^{2-}$  i uzyskania normalizacji regulacji hormonalnej u leczonego pacjenta. Endokrynol. Ped. 13/2014;3(48):45-56.

Disorders of bone mineralization are interdisciplinary medical problem. Quite often, patients with this type of medical problems are referred to endocrinologists, as the mineralization of bone tissue is the process that is controlled by the help of hormonal regulation, and endocrine disorders may manifest themselves as such complications as osteoporosis, osteomalacia, or poromalacia. Meanwhile, the same process of bone mineralization, ie deposition of hydroxyapatite in the extracellular space of the skeletal system, it is not only the result of the proper hormonal regulation but also reflects the status quo of body metabolism including the balance of calcium and phosphate ions,  $H^+/OH^-$  balance in the body and  $pO_2$  in the bone tissue. In this article we present the factors conditioning the proper functioning of crystallization / dissociation of ionic compound called hydroxyapatite that manifest themselves as mineralization / demineralization

of bone tissue in the context of diet, systemic comorbidities, use of drugs interfering with the of the  $H^+/OH^-$  balance or adversely affecting the  $pO_2$  in bone tissue. This information should allow to understand why the endocrinologist sometimes does not achieve therapeutic success in the treatment of bone mineralization, despite the stabilization of the serum levels of  $Ca^{2+}/PO_4^{2-}$  and satisfied hormonal regulation. *Pediatr. Endocrinol.* 13/2014;3(48):45-56.

## Wstęp

Gospodarka wapniowo-fosforanowa funkcjonuje w ścisłym powiązaniu z regulacją kwasowo-zasadową organizmu. Wspólnym elementem łączącym te mechanizmy regulacyjne jest hydroksyapatyt ( $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ) stanowiący rezerwuwar jonów wapnia, jonów fosforanowych i jonów  $OH^-$ . Zaburzenia w obrębie gospodarki wapniowo-fosforanowej jak i kwasowo-zasadowej znajdują odzwierciedlenie w wielkości puli hydroksyapatytu, czyli będą rzutować na skład chemiczny kości i pośrednio na wytrzymałość mechaniczną szkieletu. Niedobór hydroksyapatytu jest jedną (ale nie jedyną) z przyczyn zwiększających ryzyko złamań kości (pamiętać należy, że termin złamanie dotyczy nie tylko przerwania ciągłości struktury kości w wyniku działania sił skierowanych poprzecznie lub skośnie do osi długiej, ale może oznaczać złamania kompresyjne – dotyczące głównie kręgów – stanowiące przyczynę długotrwałej niepełnosprawności, kalectwa i dużych dolegliwości bólowych). Kości/hydroksyapatyt stanowią element układu regulacji pH płynów ustrojowych – rycina 1.

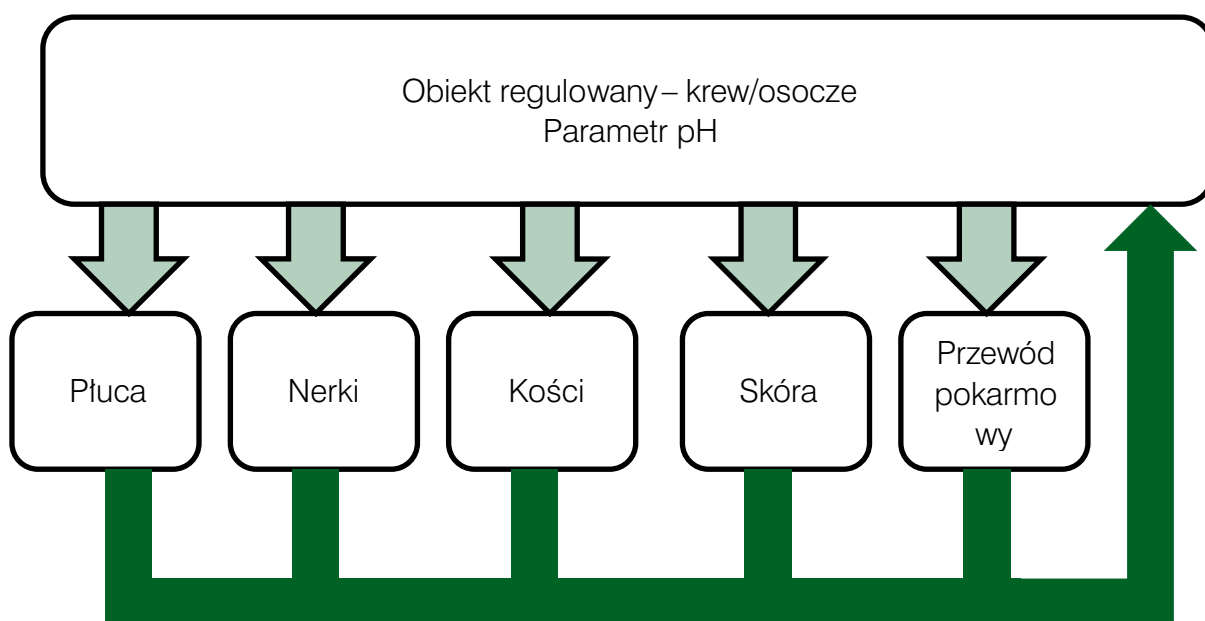
## Hydroksyapatyt – rodzaje i podstawowe właściwości fizykochemiczne

Skład hydroksyapatytu jest nieco odmienny w kościach pochodzących od różnych ssaków, różni się też nieznacznie w różnych obszarach układu kostnego człowieka (tabela I), co wynika z obecności dodatkowych podstawień jonowych (tabela II).

Hydroksyapatyt, obok fluoroapatytu (składnik szkliwa zębów), jest związkem wapnia o najmniejszej z możliwych rozpuszczalności w warunkach tak zwanego fizjologicznego pH (tabela III).

## Warunki dysocjacji jonowej hydroksyapatytu

Zarówno hydroksyapatyt, jak i fluoroapatyt są nierozpuszczalne w warunkach, jakie spotykamy w większości płynów ustrojowych [3]. Kluczowymi parametrami fizykochemicznymi, które w istotny sposób mogą zmienić rozpuszczalność (a właściwie doprowadzić do dysocjacji jonowej) wymienionych związków chemicznych, może być ciśnienie, temperatura, pH, obecność innych jonów w otoczeniu,



**Ryc. 1.** Kości /hydroksyapatyt jako element układu regulacji pH płynów ustrojowych  
**Fig. 1.** Bones /hydroxyapatite are part of pH regulatory system of the body

**Tabela I.** Skład hydroksyapatytu w tkankach człowieka [1,2]**Table I.** The composition of hydroxyapatite in human tissues [1,2]

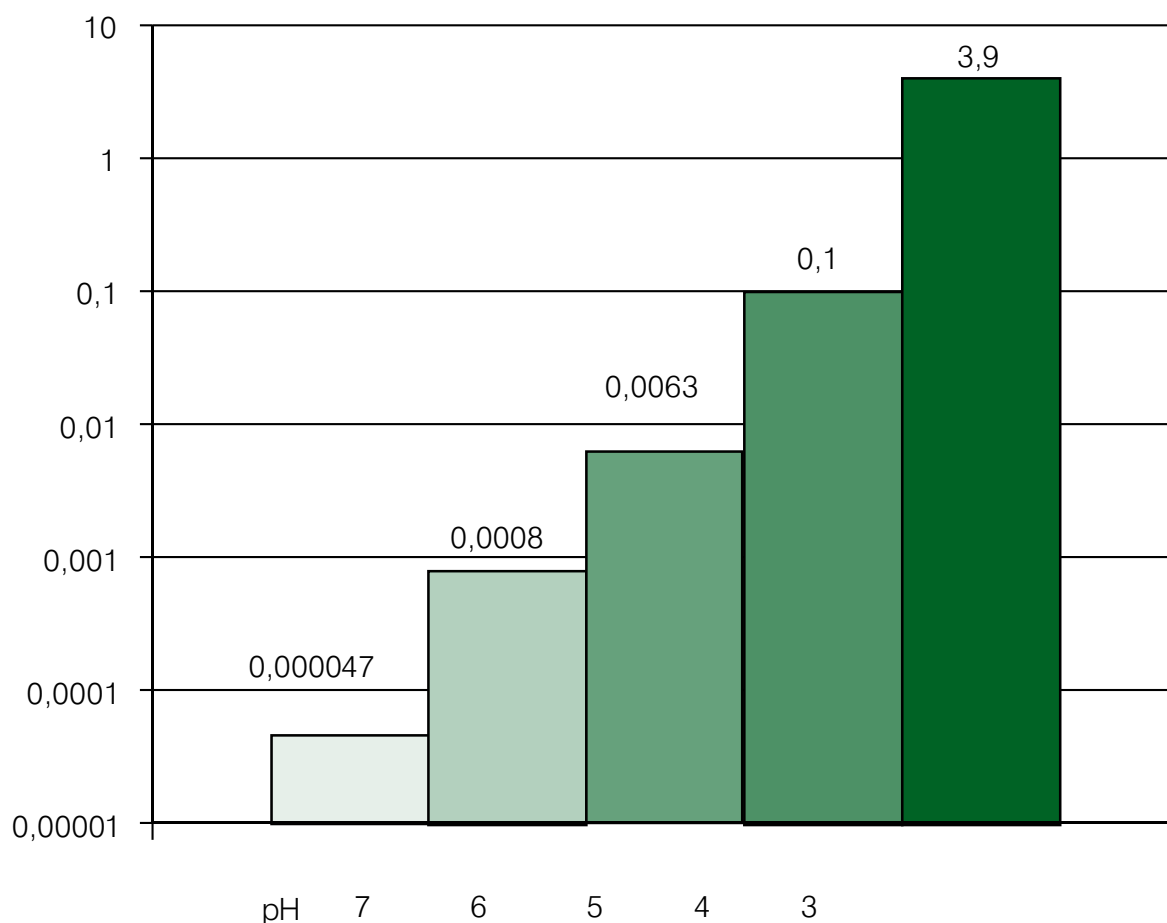
	Kości szkieletu	Zębina	Szkliwo
Zawartość substancji nieorganicznej [%]	65-70	70	96-97
Zawartość substancji organicznej [%]	20-25	17-20	1.5-2
Stosunek molowy Ca/P	1.70	1.62	1.64
Rozmiar kryształów [nm x nm]	25 x 3	20 x 4	130 x 30

**Tabela II.** Możliwe podstawienia jonowe w hydroksyapatycie ssaków [1]**Table II.** Possible ionic substitution in the hydroxyapatite in mammals [1]

Jon podstawiony	Jon podstawiający
Ca <sup>2+</sup>	Ag <sup>+</sup> , H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Li <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup>
	Ba <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Sr <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>
	Al <sup>3+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , Fe <sup>3+</sup>
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , BO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>4-</sup> , HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , jon cytrynianowy

**Tabela III.** Rozpuszczalność soli wapnia obecnych w organizmie ludzkim [3]**Table III.** The solubility of calcium salts present in the human body [3]

Nazwa soli	Rozpuszczalność w g/l
Chlorek	740
Laktoglukonian	45
Mleczan	12
Kwaśny fosforan	10
Glukonian	3.5
Cytrynian	0.2
Siarczan	0.037
Węglan	0.03
Fosforan (V)	0.00022
Hydroksyapatyt	0.000072
Fluoroapatyt	0.000044



**Ryc. 2.** Rozpuszczalność hydroksyapatytu w wodzie (w zależności od pH)  
**Fig. 2.** Hydroxyapatite solubility in water (depending on pH)

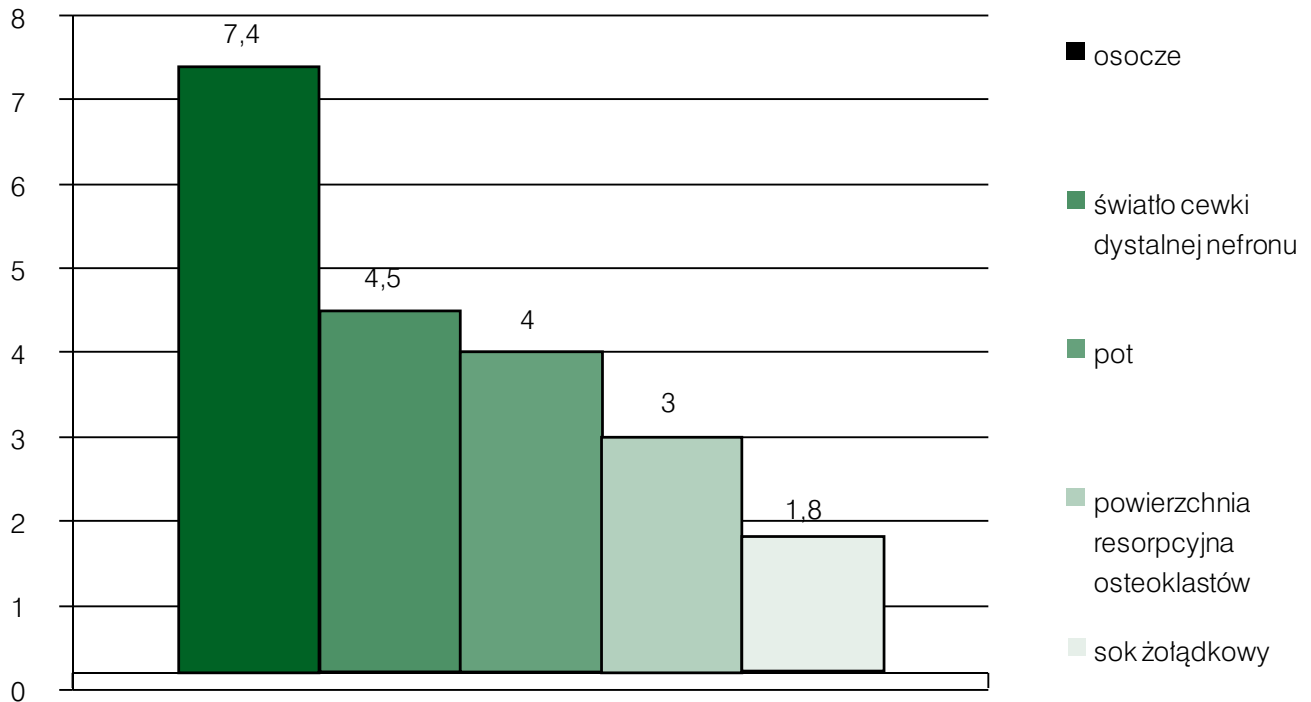
a w warunkach żywego organizmu – praktycznie tylko pH.

Warunkiem uruchomienia rezerw wapnia zgromadzonych w hydroksyapatycie jest obniżenie pH do wartości zbliżonej do 4 lub poniżej 4 (ryc. 3; oś rzędnych: skala logarytmiczna!), a więc istotne zwiększenie koncentracji jonów  $H^+$  w środowisku pozakomórkowym, w którym zdeponowany jest hydroksyapatyt.

Z uwagi na charakter metabolizmu ssaków, którego cechą jest to, że większość końcowych produktów przemiany materii to substancje będące anionami lotnych i nielotnych kwasów, transmembranowy transport jonów  $H^+$ , zgodny z gradientem stężeń, musi być zjawiskiem powszechnym, gdyż stanowi warunek utrzymania właściwej homeostazy żywych komórek. Pomimo powszechności zjawiska ewakuacji jonów  $H^+$  do przestrzeni pozakomórkowych wartości pH w przestrzeni pozakomórkowej zbliżone do 4 lub niższe są w organizmie ludzkim rzadkością (ryc. 3).

Osiągnięcie koncentracji jonów wodorowych w granicach  $pH < 4$  wymaga transportu  $H^+$  wbrew gradientowi stężeń. Taki transport umożliwiają pompy protonowe, które obecne są w komórkach okładzinowych żołądka (ATP-aza wodorowo-potasowa;  $H^+ K^+$ ATP-azy; ang. *hydrogen potassium ATPase*) oraz w nefronach i otoczeniu osteoklastów, makrofagów, granulocytów obojętnochłonnych oraz niektórych komórek nowotworowych, posiadających pompy wodniczkowe oparte na działaniu  $H^+$ -ATP-azy (wakuolarna  $H^+$ -ATP-aza; V-ATP-aza; ang.: *vacuolar-type  $H^+$ -ATPase*, *V-ATPase*) i usytuowane w rąbku szczoteczkowym [4].

Osteoklasty należą do stosunkowo nielicznej grupy komórek organizmu zdolnych do generowania wysokiego przez błonowego gradientu pH. Na powierzchni resorpcyjnej osteoklasta (*functional secretory domain*, *FSD*), bogatej w rąbek szczoteczkowy, spotyka się wartości pH zbliżone do 3. Protony są generowane wewnątrzkomórkowo przez karboksyanhydrazę (anhydraza węglanowa,



**Ryc. 3.** pH w kompartmentach ustrojowych  
**Fig. 3.** pH in body fluid compartments

CA, carbonic anhydrase, EC 4.2.1.1) w przebiegu katalizowanej reakcji chemicznej:  $H_2O + CO_2 \rightarrow HCO_3^- + H^+$ . Wodorowęglan jest wydzielany przez błonę podstawno-boczną (*basolateral domain (BD), non-bone facing plasma membrane*). Jony  $H^+$  są transportowane z cytoplazmy do przestrzeni pozakomórkowej (po stronie powierzchni resorpcyjnej) w sposób aktywny (przy wykorzystaniu energii wiązań fosforowych ATP), przy udziale V-ATP-azy. Niskie pH na powierzchni resorpcyjnej umożliwia aktywację enzymów lizosomalnych i rozpuszczenie hydroksyapatytu, podczas gdy obecność metaloproteaz (syntetyzowanych przez osteoklasty) poszerza zakres wartości pH, w którym dokonuje się resorpcja kostna [5].

### Fizjologiczne mechanizmy regulacji funkcji osteoblastów i osteoklastów

Aktywność resorpcyjna osteoklastów podlega wieloczynnikowej regulacji. Klasycznie podręczniki z dziedziny endokrynologii wspominają o roli parathormonu i kalcytoniny:

#### PARATHORMON (PTH)

Pośród 3 typów receptorów dla PTH (PTH-1-R, PTH-2-R, C-PTH-R) w układzie kostnym znajduje się tylko pierwszy z nich [6,7]. Istnieją kontrower-

sje co do obecności jądrowych receptorów dla PTH/PTH-rp w/na osteoklastach. Są opinie sugerujące ich obecność [8], jak i to, że receptory znajdują się tylko na osteoblastach pozostających w stałym kontakcie (poprzez układ sygnałowy) z osteoklastami (a więc wpływ PTH na osteoklast jest wpływem pośrednim).

Pośredni wpływ PTH na osteoklasty odbywa się przez: a) zwiększenie produkcji stężenia IL-6 przez osteoblasty w obecności PTH. IL-6 stymuluje dojrzewanie osteoklastów i tworzenie syncytiów wielojądrzastych; b) zmniejszenie produkcji osteoprotegeryny (*OPG, osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF), tumor necrosis factor receptor superfamily member 11B (TNFRSF11B)*) przez osteoblasty pod wpływem PTH. Zmniejszenie stężenia OGP zwiększa dostępność RANKL (ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika  $\kappa B$ , ang.: *receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa B$  Ligand*), co mobilizuje osteoklasty do tworzenia syncytiów i zwiększenia ich aktywności resorpcyjnej.

#### KALCYTONINA (CT)

Osteoklasty posiadają specyficzne receptory dla kalcytoniny (*calcitonin receptor, CTR*). Aktywacja tych receptorów powoduje hamowanie czynności resorpcyjnej osteoklastów. Jest to wynik zmiany organizacji cytoszkieletu osteoklasta, rozluźnienia

i dezorganizacji struktury pierścieni aktywnych otaczających pole aktywnej resorpcji kostnej oraz zaniku polaryzacji błony komórkowej osteoklasta. Aktywacja receptorów dla kalcytoniny uruchamia szlaki sygnałowe związane zarówno z cAMP/PKA (cykliczny AMP/kinaza białkowa), jak i  $\text{Ca}^{2+}$ /PKC (jony wapnia /kinaza białkowa C), przy czym wydaje się, że głównym szlakiem sygnałowym jest tu cAMP/PKA [9].

W rzeczywistości osteoklasty i osteoblasty, które pozostają w ścisłej wzajemnej zależności funkcjonalnej, podlegają regulacji z udziałem większej gamy czynników biologicznych, a wielostronność powiązań z różnymi szlakami metabolicznymi odzwierciedla lista najczęściej wymienianych receptorów obecnych w/na powierzchni tego typu komórek.

Osteoklasty posiadają receptory:

a) receptory jądrowe dla [10,12] • androgenów (*androgen receptor, AR*) • estrogenów (*estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ ; ER $\alpha$  ER $\beta$* ) • glikokortykosterydów (*glucocorticoid receptor, GR receptor*) • kalcytriolu (*vitamin D receptor, VDR*) • retinoidów (*retinoid X receptors, RAR, RXR*) • tyroksyny (*thyroid receptor, TR*) • glitazonu (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$  or PPARG); the glitazone receptor; NR1C3 (nuclear receptor subfamily 1, group C, member 3)*),

b) receptory błonowe dla [10, 13-16] • ATP i UTP (*P2Y2 receptor; P2Y purinoceptor 2*) •  $\text{Ca}^{2+}$  (*Calcium-sensing receptor*) • chemokin CCR2b (*C-C chemokine receptor type 2 (CCR2; CD192) receptors*) • chemokin CCR4 (*C-C chemokine receptor type 4 (CD 194) receptors*) • chemokin CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR-4); fusin; CD184*) • cytokin Il-4, Il-6, Il-7, Il-10, Il-12, Il-13, Il-15, Il-18 (*cytokine receptors for interleukin, interleukin receptors*) • czynników przyspieszających apoptozę: TNF, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), FasL (*TNFR1, TRAIL-R1, TRAIL-R2, FasR*) • FSH (*follicle stimulating hormone receptor, FSHR*) •  $\text{H}^+$  (*pH-sensing mechanism*) – rozważa się też wpływ zmian koncentracji jonów  $\text{H}^+$  na funkcję receptora OGR1 (*ovarian cancer G protein-coupled receptor 1; GPR68; OGR1\_rcpt, sphingosylphosphorylcholine receptor*) regulującego ekspresję mRNA w osteoklastach i ich prekursorach • Interferonu  $\gamma$  (*interferon-gamma receptor, IFNGR*) • Interferonu  $\beta$  (*interferon- $\alpha/\beta$  receptor IFNAR*) • kalcytoniny (*calcitonin receptor,*

*CTR*) • PEDF (*pigment epithelium-derived factor*) • prostaglandyny PG D2 (*DP and CRTH2 receptor*) • PTH (*PTH/PTHrP receptor*) – dyskusyjne • RANK (*receptor activator of nuclear factor-kappaB*) • serotoniny (*hydroxytryptamine receptor; 5HTR*) • TNF $\alpha$  i TNF $\beta$  (*TNFR1, TNFR2*) • TSH (*thyrotropin receptor; TSH receptor*) • VEGF (*vascular endothelial growth factor receptor*),

c) receptory dla następujących integryn (*integrin receptors*) •  $\alpha\beta1$  and the  $\alpha\text{V}\beta3$  hetero-dimers •  $\alpha\text{V}\beta5$  (u prekursorów osteoklastów) • Rho family GPT-binding proteins Cdc42, Rac1 and Rho A [17].

Ścisłe powiązanie funkcji osteoklastów i osteoblastów, które wyraża się między innymi wzajemną wymianą informacji poprzez Ephrin B2- EphB4, RANK-RANKL-OPG, TGF- $\beta$  [18, 19] czy czynniki transkrypcyjne takie, jak  $\beta$ -catenin i Runx2 [20], powoduje iż osteoblast może być w niektórych sytuacjach inicjatorem dojrzewania i wzrostu aktywności osteoklastów, dlatego funkcjonowanie osteoklastów należy rozważać także w kontekście aktywności osteoblastów (mówi się o osi osteoklastyczno-osteoblastycznej).

Zaangażowanie osteoblastów w przemiany ogólnoustrojowe i lokalne procesy metaboliczne odzwierciedla lista receptorów jądrowych, błonowych i cytoplazmatycznych osteoblastów. Są to: a) jądrowe receptory dla [10, 21–25] • androgenów (*androgen receptor, AR*) • estrogenów (*estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ ; ER $\alpha$  ER $\beta$* ) • glikokortykosterydów (*GR receptors; glucocorticoid receptors*) • kalcytriolu (*vitamin D receptor, VDR*) • progesteronu (*PR receptor*) • retinoidów (*retinoid X receptor, RAR, RXR*) • tyroksyny (*thyroid receptors, TR*) • glitazonu (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$  or PPARG); the glitazone receptor; NR1C3 (nuclear receptor subfamily 1, group C, member 3)*) • RUNX2 (Runx2-Upregulated Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa\text{B}$  Ligand)

b) receptory błonowe i cytoplazmatyczne dla [10, 11, 25–36] • ACTH (*ACTH receptors*) • ATP (*P2X purinoceptor 7, P2X7 receptors*) • ATP i UTP (*P2Y2 receptor; P2Y purinoceptor 2*) • efryn klasy B – dla EphB4 (*ephrin receptor EphB4, ephrin type-B receptor 4, hepatoma transmembrane kinase; HTK; MYK1; TYRO11*) • FasL, TNF $\alpha$ , TRAIL (*FasR; TNFR1, TNFR2; TRAIL-R1, TRAIL-R2*) • FSH (*FSHR follicle stimulating hormone receptor*) • IGF-1 (*IGF1R*) • insuliny (*insulin receptors, IR*) • integryn (*integrin receptors*) • interleukin IL-1, IL-6, IL-11 (*cytokine receptors for interleukin, interleukin*

receptors) • katecholamin ( $\alpha 1$ - and  $\beta 2$ -adrenergic receptors) • leptyn (*leptin receptor*; *LEP-R*) • LH (*lutetizing hormone/choriogonadotropin receptor*; *LH receptor*; *LHR*) • NMDA (*N-methyl-d-aspartate receptors*) • PDGFR- $\beta$  (*platelet-derived growth factor receptor  $\beta$* ) • prolaktyny (*prolactin receptor*; *PRLR*) • PTH (*PTH/PTHrP receptor*) • sclerostyny (LRP5) • serotoniny (*hydroxytryptamine receptors*; *5HTR*) • TGF- $\beta$  (*transforming growth factor, beta receptor*; *TGF-beta receptor*) • TSH (*thyrotropin receptor*; *TSH receptor*) • Wnt (*Wnt- Fz*, *Wnt frizzled receptor*)

W wykazie wzajemnych zależności na szczególną uwagę zasługują uwikłanie osteoklastów i osteoblastów w regulację gospodarki kwasowo-zasadowej.

### Aktywność osteoblastyczna i osteoklastyczna a stan gospodarki kwasowo-zasadowej organizmu

Część ze wspomnianych receptorów może pośrednio i pośrednio zmieniać swoją aktywność w odpowiedzi na zmianę pH w otoczeniu komórek osi osteoblastyczno-osteoklastycznej [37, 38]:

- pH-sensing mechanizm, stanowiący *de facto* formę receptora dla jonów  $H^+$ , modyfikuje aktywność osteoklastów w zależności od pH w otoczeniu komórki;
- pH może regulować aktywność kanałów jonowych [38];
- obniżenie pH może aktywować czynność receptorów dla TNF, czynnika transkrypcyjnego NFATc1 (*Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1*) kontrolowanego przez kanały wapniowe, oraz stan czynnościowy receptorów dla RANKL [39];
- obniżenie pH może mobilizująco wpływać na funkcję fosfatazy kwaśnej odpornej na winian (*TRAP, tartrate resistant acid phosphatase*) [38, 40];
- większa koncentracja jonów  $H^+$  w otoczeniu osteoklasta przekłada się na zwiększoną aktywność anhidrazy węglanowej II i  $H^+$ -ATP-azy (wakuolarna  $H^+$ -ATP-aza; V-ATP-aza; *vacuolar-type  $H^+$  -ATPase, V-ATPase*) usytuowanej w rąbku szczoteczkowym osteoklasta [41, 42].

Klasyczne już badania przeprowadzone przez Timothy R. Arnetta i wsp. pozwalają na sformułowanie następujących wniosków [43-45]:

- obniżenie pH w otoczeniu osteoklasta zwiększa jego aktywność resorpcyjną i zdolność do tworzenia syncytiów;

- obniżenie pH zwiększa proresorpcyjne działanie PTH na układ osteoblasty-osteoklasty;
- obniżenie pH w otoczeniu osteoklastów zwiększa ich wrażliwość na RANKL;
- zarówno нефизjologiczny wzrost, jak i spadek pH zmniejszają aktywność osteoblastów;
- w granicach zmian pH 7.1–7.5 (płyn śródtkankowy) można oczekiwać wzrostu BMD (gęstość mineralna kości, ang. *bone mineral density*) wraz ze wzrostem pH;
- obniżenie  $pO_2$  poniżej 20% (zakres 2%–20%), co często (ale nie zawsze) idzie w parze z obniżeniem pH płynów ustrojowych, wiąże się ze zwiększeniem liczby i funkcji resorpcyjnej osteoklastów, obniżenie  $pO_2$  poniżej 1% dezorganizuje funkcję osteoklastów i przyspiesza ich apoptozę.

Zmiana aktywności osteoblastów i osteoklastów może być wynikiem zaistnienia zmian pH w przestrzeniach pozakomórkowej kości, a więc w miejscu deponowania hydroksyapatytu. Z drugiej strony aktywność osteoblastów i osteoklastów modyfikuje pH przestrzeni pozakomórkowej w układzie kostnym, wpływając na zmianę puli zdeponowanego hydroksyapatytu.

Pomijając opis skomplikowanego mechanizmu syntezy białek macierzy kostnej oraz akumulacji anionów fosforanowych (reakcje wymagające udziału ATP) na ufosforylowanych grupach  $OH^-$  seryny sialoproteiny kostnej (*BSP1 Bone Sialoprotein I, BSP-1, Osteopontin, OPN*), umożliwiających formowanie jąder krystalizacji hydroksyapatytu, należy podkreślić, że to właśnie alkalizacja środowiska sprzyja krystalizacji i tworzeniu nierozpuszczalnego hydroksyapatytu, a zakwaszenie (w obecności metaloproteaz stanowiących katalizator resorpcji) powoduje dysocjację jonową tego związku.

**Hydroksyapatyt (stosowane skróty w literaturze: HAp, OHAp, HA) jest wodorotlenkiem (sześciortofosforan (V) dwuwodorotlenku dziesięciowapnia). Z punktu widzenia fizjologii kościotworzenia oraz funkcjonowania buforów krwi i płynów ustrojowych kluczowe staje się słowo „dwuwodorotlenek”. Do jego powstania konieczna jest obecność jonów  $OH^-$ .**

Kościotworzenie jest więc procesem zakwaszającym organizm (zubożającym w jony  $OH^-$ ), resorpcja hydroksyapatytu zubaża organizm w jony  $H^+$ , a wzbogaca w jony  $OH^-$ .

Warunkiem mineralizacji tkanki kostnej jest dostępność jonów zarówno  $\text{PO}_4^{2-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , jak i  $\text{OH}^-$ , właściwe proporcje białek strukturalnych i regulatorowych oraz odpowiednia dostawa energii (ATP).

Metabolizm ustroju oraz sposób odżywiania się człowieka prowadzą do deficytu jonów  $\text{OH}^-$  i nadmiaru jonów  $\text{H}^+$ . Utrzymanie funkcji życiowych wymaga permanentnego usuwania jonów  $\text{H}^+$  oraz uruchomienia mechanizmów oszczędzania i odzyskiwania jonów  $\text{OH}^-$ .

W bilansie dobowym dorosłego człowieka nadmiar substancji kwaśnych wyraża się obecnością nadmiarowych: 15-20 moli  $\text{CO}_2$  oraz znacznych ilości nietlotnych kwasów (ang.: *noncarbonic or nonvolatile acids*) (nietlotne kwasy składające się na lukę anionową  $[\text{Na}^+] - [\text{Cl}^- + \text{HCO}_3^-] = \text{LA}$ ). Dotychczas szacowano, iż ten nadmiar nietlotnych kwasów jest znacznie mniejszy.

Oto przybliżone szacunki (publikowane w latach 1981–2006) dotyczące dobowej produkcji ilości kwasów nietlotnych przez organizm standardowego osobnika ludzkiego (bez uwzględnienia jonu  $\text{Cl}^-$ ): 70 mmol (1981 r.) [46], 70-100 mmol (1998 r.) [47], 100-200 mmol (2004 r.) [48], 240 mmol (2006 r.) [49].

Zmiana sposobu odżywiania z roku na rok pogarsza bilans  $\text{H}^+/\text{OH}^-$ . Ilustracją są powyższe dane. Uwzględniając podaż  $\text{NaCl}$ , można szacować, że przeciętny Polak dostarcza z pokarmem już 300–400 milimoli nietlotnych kwasów [50]. Obecnie, w bilansie dobowym dorosłego człowieka nadmiar substancji kwaśnych wyraża się więc obecnością nadmiarowych: 15–20 moli  $\text{CO}_2$ , 300–400 mmol nietlotnych kwasów (wliczając podaż jonów  $\text{Cl}^-$ ).

Teoretycznie cały hydroksyapatyt zgromadzony w kościach dorosłego, zdrowego człowieka (7–8 moli zasad, w większości dwuwodorotlenku, czyli potencjalne źródło 14-16 moli  $\text{OH}^-$ ) ma możliwość zbilansowania maksymalnie 1–2 miesięcznej podaży nietlotnych kwasów.

### Wpływ diety na gospodarkę kwasowo-zasadową i wielkość depozytów hydroksyapatytu w układzie kostnym

Bilans  $\text{H}^+/\text{OH}^-$  u dzieci i młodzieży jest także zależny od sposobu odżywiania i podlega tym samym wpływom kulturowym, co bilans u dorosłych.

Wiele pokarmów może zawierać znaczne ilości związków organicznych i nieorganicznych, które w wyniku przemian ustrojowych stają się źródłem reszt nietlotnych kwasów (białka zawierające ami-

**Tabela IV.** Jon chlorkowy w pokarmach [59–61]

**Table IV.** Chloride ion in foods [59–61]

Produkt spożywczy	Cl w przeliczeniu na $\text{Cl}^-$ [mmol] w 100 g produktu
Sólne paluszki	120–150
Ser Nidzki, Morski, Tylżycki i Mazurski	60
Ser Salami	52
Ser Camembert	66
Sery typu 'feta'	47
Konserwy rybne	40–48
Sery pełnotłuste i tłuste (np. Edamski, Gouda)	43–47
Ryby morskie wędzone i marynowane	33–72
Chleb pełnoziarnisty, ciemny	do 25
Szynka peklowana	41
Kiełbasy	36–70
Konserwy mięsne	8.6–86
Chleb pszenny	9–29



nokwasy siarkowe, nukleotydy, fosfolipidy, fosforany, siarczany, azotyny, azotany, chlorek sodu). Niektóre z tych pokarmów uważane są za szczególnie bogate w wymienione kwasy lub ich prekursorzy (tabele IV4–VI). Wiele z nich stało się składnikami naszego codziennego pożywienia, wiele z nich po-

jawia się w diecie dzieci i młodzieży, w tym także w tak zwanym śmieciowym pożywieniu.

Zwiększona podaż pokarmów będących źródłem nietłotnych kwasów zwiększa aktywność osteoklastyczną i sprzyja demineralizacji tkanki kostnej [51–57].

**Tabela V.** Pokarmowe źródła jonów fosforanowych [60, 61]

**Table V.** Dietary sources of phosphate ions [60, 61]

Produkt spożywczy	P w przeliczeniu na $\text{PO}_4^{-3}$ [mmol] w 100 g produktu
Soja	21,3
Sery żółte	16–25
Orzeszki ziemne; brazylijskie	8,1; 19
Jaja kurze całe	6,3
Mięso kurze	5,1–11,3
Sery twarogowe	4,3–7,8
Pieczywo żytnie	4,2–10
Ryby	3,6–18
Wołowina, wieprzowina i wędliny	3,5–12,5
Mleko	3,1–4,5
Pieczywo pszenne	2,0–5,5
Coca-cola	0,53

**Tabela VI.** Pokarmowe źródła jonów siarczanowych [60, 62]

**Table VI.** Nutritional source of sulphate ions [60, 62]

Produkt spożywczy	S w przeliczeniu na $\text{SO}_4^{-2}$ [mmol] w 100 g produktu
Sery żółte	7,2–7,8
Rośliny strączkowe (fasola, groch, soja)	6,5–15,6
Ryby	6,5–16
Jaja	6,5
Orzechy	5–10
Mięso, podroby	4,3–10,3
Wędliny	3,7–5,6
Mleko	2,8

## Schorzenia, leki, szczególne stany fizjologiczne zwiększające ryzyko pojawiania się ujemnego bilansu jonów OH<sup>-</sup>

Wybrane leki, których podaż może bezpośrednio lub pośrednio negatywnie wpływać na rezerwę alkaliczną ustroju: acetazolamid, aldactone, aminoglutetymide, glutetymid (blokery syntezy steroidów nadnerczowych), antagoniści układu RAA (hypoaldosteronizm, wzrost poziomu kw. mlekowego z powodu spadku przepływu tkankowego), beta- blokery (hypoaldosteronizm, wzrost poziomu kw. mlekowego z powodu spadku przepływu tkankowego), cholestyramina, heparyna (możliwy hypoaldosteronizm), kwas walproinowy, metformina u osób w podeszłym wieku i z niewydolnością krążenia, niektóre antybiotyki, jak linezolid, niektóre leki przeciwhistaminowe (zwłaszcza przedawkowane), niektóre leki przeciwwirusowe, jak: didanosine, stavudine, and zidovudine, niesterydowe leki p-zapalne (nie tylko salicylany), paracetamol u osób z niedoborem G-6-PD (methemoglobinemia i hemoliza), topiramata, wiele cytostatyków.

Choroby, szczególne stany fizjologiczne sprzyjające pojawianiu się deficytu jonów OH<sup>-</sup>: dieta ketogenna, drgawki, stan padaczkowy, głodzenie, jadłowstręt psychiczny, kwasice cewkowe, lokalne niedokrwienie i niedotlenienie, niedokrwistości, niewyrównane zaburzenia rytmu: serca – tachy- i bradyarytmie, ostra i przewlekła niewydolność krążenia, ostra i przewlekła niewydolność nerek, ostre i przewlekłe biegunki, ostre przewlekłe schorzenia układu oddechowego, schorzenia przebiegające z gorączką, siniczne wady serca, źle wyrównana cukrzyca, inne schorzenia przebiegające z przyspieszonym katabolizmem białkowym (np. tyreotoksykoza, choroba i zespół Cushinga, choroby nowotworowe, zaostrenie schorzeń autoimmunologicznych, wiele schorzeń infekcyjnych).

Zwiększone ryzyko obecności zaburzeń mineralizacji tkanki kostnej pojawia się u pacjentów z następującymi danymi w wywiadzie: schorzenie reumatologiczne, schorzenia gastroenterologiczne, schorzenia wymagające stosowania leków upośledzających wchłanianie Ca, metabolizmu witaminy D lub indukujące kwasicę metaboliczną (padaczka, niektóre schorzenia kardiologiczne), schorzenia

wymagające długotrwałego stosowania leków przeciwzapalnych, immunosupresyjnych i glikosterydów w dawkach leczniczych, schorzenia hematologiczne, przewlekłe schorzenia prowadzące do zaburzeń gospodarki kwasowo-zasadowej, np. niewydolność nerek, tubulopatie, źle wyrównana cukrzyca, choroby układu oddechowego, opóźnione dojrzewanie/ brak dojrzewania płciowego, krzywica, intencjonalne niedobory masy ciała – odchudzanie się, jadłowstręt psychiczny, długotrwałe unieruchomienie.

Szczególne stany fizjologiczne/rodzaj aktywności usposabiające do pogłębiania deficytu jonów OH<sup>-</sup>: wcześniactwo, okres niemowlęcy, starzenie się organizmu, intensywne prace fizyczne, uprawianie sportu, wyczerpujące treningi, odchudzanie się, ciąża.

Zaburzenia mineralizacji tkanki kostnej (niedobór hydroksyapatytu), to problem, który pojawia się u pacjentów przewlekłe chorych leczonych przez specjalistów z zakresu: alergologii, dermatologii, chirurgii, endokrynologii, gastroenterologii, hematologii, kardiologii, nefrologii, neurologii, ortopedii, pulmonologii, reumatologii.

## Podsumowanie

Kość jest jednym z regulatorów pH ustrojowego, a hydroksyapatyt jest jednym z elementów układu wykonawczego regulacji pH.

Optimum dla prawidłowej przebudowy kości stanowi pH osocza w granicach 7,35–7,45.

Pula hydroksyapatytu w kościach zwiększa się wraz ze wzrostem pH osocza, maleje wraz z obniżeniem pH i/lub pO<sub>2</sub>.

Prawidłowa podaż Ca<sup>2+</sup> i PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> bez zapewnienia prawidłowego pH osocza nie prowadzi do wzrostu puli hydroksyapatytu w układzie kostnym.

Typowa dieta współczesnego człowieka, nowe zwyczaje żywieniowe, wiele schorzeń i powszechnie stosowanych leków, a także niektóre szczególne stany fizjologiczne predysponują do ubytku puli hydroksyapatytu kostnego i obniżenia wartości gęstości mineralnej kości (BMD).

Zaburzenia mineralizacji tkanki kostnej to problem interdyscyplinarny, z którym mają styczność specjaliści ze wszystkich niemal dyscyplin wiedzy medycznej, nie tylko endokrynolodzy.

**PIŚMIENICTWO/REFERENCES**

- [1] Sobczak-Kupiec A., Wzorek Z.: Właściwości fizykochemiczne ortofosforanów wapnia istotnych dla medycyny TCP i HAp. *Chemia. Czasopismo techniczne*, 2010:10(107), 309-322.
- [2] LeGeros R.Z., LeGeros J.P.: Hydroxyapatite. [w:] *Handbook of Bioceramics and their Applications*. Red. Kokubo T., Woodhead Publishing Ltd, London 2008, 367-394.
- [3] Chen Z.-F., Darvell B.W., Leung V.W.-H.: Hydroxyapatite solubility in simple inorganic solutions. *Archives of Oral Biology*, 2004:49, 359-367.
- [4] Izumi H., Torigoe T., Ishiguchi H. et al.: Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.*, 2003: 29(6), 541-549.
- [5] Baron R.: Mecanismes moleculaires de la resorption osseuse: implications therapeutiques. *Rev. Rhum.*, 1996:63, 743-748.
- [6] Potts J.T.: Parathyroid hormone: past and present. *J Endocrinol.*, 2005:187, 311-325.
- [7] Torres P.U.: The need for reliable serum parathyroid hormone measurements. *Kidney Int.* 2006, 70, 240-243.
- [8] Dempster D.W., Hughes-Begos C.E., Plavetic-Chee K. et al. Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *J. Cell. Biochem.*, 2005:95(1), 139-148.
- [9] Yamamoto Y., Noguchi T., Takahashi N.: Effects of calcitonin on osteoclast. *Clin. Calcium.*, 2005:15(3), 147-151.
- [10] Del Fattore A., Teti A., Rucci N.: Osteoclast receptors and signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008: 473(2), 147-160.
- [11] Moutsatsou P., Kassi E., Papavassiliou A.G.: Glucocorticoid receptor signaling in bone cells. *Trends in Molecular Medicine*, 2012:18(6), 348-359.
- [12] Takahashi N., Udagawa N., Suda T.: Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *BoneKey Reports*, 2014:3, 495 [Published online]
- [13] Kim M.S., Magno C.L., Day C.J. et al.: Induction of chemokines and chemokine receptors CCR2b and CCR4 in authentic human osteoclasts differentiated with RANKL and osteoclast like cells differentiated by MCP-1 and RANTES. *J. Cell. Biochem.*, 2006:97(3), 512-518.
- [14] Feng X.: Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts (Review). *Gene*, 2005:350(1), 1-13.
- [15] Durand M., Gallant M.A., de Brum-Fernandes A.J.: Prostaglandin D2 receptors control osteoclastogenesis and the activity of human osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.*, 2008:23(7), 1097-1105.
- [16] Klein-Nulend J., Westbroek I., van der Plas A. et al.: Expression of serotonin receptors in bone. *J. Bone Miner. Res.*, 2001:16, S176.
- [17] Meenakshi A.: Chellaiah Regulation of podosomes by integrin avb3 and Rho GTPase-facilitated phosphoinositide signaling. *European Journal of Cell Biology*, 2006:85, 311-331.
- [18] Lemaire V., Tobina F.L., Grellera L.D. et al.: Modeling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling. *Journal of Theoretical Biology*, 2004:229, 293-309.
- [19] Matsuo K., Irie N.: Osteoclast-osteoblast communication. *Arch. Biochem Biophys.*, 2008:473(2), 201-219.
- [20] Qiang Y.W., Chen Y., Brown N. et al.: Characterization of Wnt/beta-catenin signalling in osteoclasts in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 2010:148(5), 726-738.
- [21] Gardinier J., Yang W., Madden G.R. et al.: P2Y2 Receptors Regulate Osteoblast Mechanosensitivity During Fluid Flow. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 2014:306, C1058-C1067.
- [22] van Driel M., van Leeuwen J.P.T.: Vitamin D endocrine system and osteoblasts. *BoneKey Reports*, 2014:3(493) [Published online].
- [23] Chen F.P., Hsu T., Hu Ch. et al.: Expression of estrogen receptors alpha and beta in human osteoblasts: identification of exon-2-deletion variant of estrogen receptor beta in postmenopausal women. *Chang Gung Med. J.*, 2004:27, 107-115.
- [24] MacNamara P., O'Shaughnessy C., Manduca P. et al.: Progesterone receptors are expressed in human osteoblast-like cell lines and in primary human osteoblast cultures. *Calcif. Tissue Int.*, 1995:57(6), 436-441.
- [25] Gouveia C.H., Schultz J.J., Bianco A.C. et al.: Thyroid hormone stimulation of osteocalcin gene expression in ROS 17/2•8 cells is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Journal of Endocrinology*, 2001:170, 667-675.
- [26] Neve A., Corrado A., Cantatore F.P.: Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res.*, 2010. Published online. DOI 10.1007/s00441-010-1086-1.
- [27] Blair H.C., Robinson L.J., Sun L. et al.: Skeletal receptors for steroid-family regulating glycoprotein hormones: A multilevel, integrated physiological control system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2011:1240, 26-31.
- [28] Fulzele K., Riddle R.C., DiGirolamo D.J. et al.: Insulin Receptor Signaling in Osteoblasts Regulates Postnatal Bone Acquisition and Body Composition. *Cell*, 2010, 142(2), 309-319.
- [29] Bellido T., Stahl N., Farruggella T.J. et al.: Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. *J. Clin. Invest.*, 1996:97, 431-437.
- [30] Huang H.H., Brennan T.C., Muir M.M. et al.: Functional 1- and 2-adrenergic receptors in human osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 2009:220(1), 267-275.
- [31] Pellegatti P., Falzoni S., Donvito G. et al.: P2X7 receptor drives osteoclast fusion by increasing the extracellular adenosine concentration. *The FASEB Journal*, 2011:25(4), 1264-1274

- [32] Yuchun G., Stephen J.: Publicover Expression of Functional Metabotropic Glutamate Receptors in Primary Cultured Rat Osteoblasts. CROSS-TALK WITH N-METHYL-D-ASPARTATE RECEPTORS. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000:275, 34252-34259.
- [33] Kumar T. R.: Focus on Gonadotrophin Signalling. What have we learned about gonadotropin function from gonadotropin subunit and receptor knockout mice? *Reproduction*, 2005:130, 293-302.
- [34] Bowler W.B., Littlewood-Evans A., Bilbe G. et al.: P2Y2 receptors are expressed by human osteoclasts of giant cell tumor but do not mediate ATP-induced bone resorption. *Bone*, 1998:22(3), 195-200.
- [35] Clément-Lacroix P., Ormandy C., Lepescheux L. et al.: Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology*, 1999:140(1), 96-105.
- [36] Abe E., Mariani R.C., Yu W. et al.: TSH is a negative regulator of skeletal remodeling. *Cell*, 2003:115(2), 151-162.
- [37] Grano M., Faccio R., Colucci S. et al.: Extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing is modulated by pH in human osteoclast-like cells in vitro. *Am. J. Physiol.*, 1994:267(4 Pt 1), C961-C968.
- [38] Arnett T.R.: Extracellular pH regulates bone cell function. *J. Nutr.*, 2008:138(2), 415S-418S.
- [39] Chen S., Pan M.: NFAT Signaling and Bone Homeostasis. *J. Hematol. Thromb. Dis.*, 2013:1, 1-7.
- [40] Brandao-Burch A., Meghji S., Arnett T.R.: Acidosis strongly upregulates mRNA for cathepsin K, TRAP and TRAF-6 in bone. *Calcif. Tissue Int.*, 2003:72, 364.
- [41] Biskobing D.M., Fan D.: Acid pH increases carbonic anhydrase II and calcitonin receptor mRNA expression in mature osteoclasts. *Calcif. Tissue Int.*, 2000:67, 178-183.
- [42] Nordström T., Shrode L.D., Rotstein O.D. et al.: Chronic extracellular acidosis induces plasmalemmal vacuolar type H<sup>+</sup> ATPase activity in osteoclasts. *J. Biol. Chem.*, 1997:272, 6354-6360.
- [43] Arnett T.R.: Acidosis, hypoxia and bone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010:503, 103-109.
- [44] Utting J.C., Robins S.P., Brandao-Burch A. et al.: Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts. *Exp. Cell Res.*, 2006:312(10), 1693-1702.
- [45] Arnett T.R.: Acid-base regulation of bone metabolism. *Int. Congr. Ser.*, 2007:1297, 255-267.
- [46] Kokot F.: *Gospodarka wodno-elektrolitowa i kwasowo zasadowa*. PZWL, Warszawa 1981.
- [47] The Prince of Wales Hospital: Guide to Acid/Base Analysis. [1998.7.02]. [http://intensivecare.hsnet.nsw.gov.au/five/doc/education\\_packages/pow/POW\\_guide\\_acid\\_base.pdf](http://intensivecare.hsnet.nsw.gov.au/five/doc/education_packages/pow/POW_guide_acid_base.pdf)
- [48] Ronco R.C., Bellomo R., Brendolan A. et al.: *Sepsis, Kidney and Multiple Organ Dysfunction: Proceedings of the Third International Course on Critical Care Nephrology*. Vicenza, June 2004. Karger Publishers 2004.
- [49] Górski J.: *Podstawy fizjologii wysiłku fizycznego*. Wydawnictwo Lekarskie. PZWL, Warszawa 2006.
- [50] Schlegel-Zawadzka M., Kowalczyk B.: *Wiedza na temat spożycia soli w różnych grupach narodowościowych*. Zeszyty Naukowe Akademii Morskiej w Gdyni, 2010:65, 43-50.
- [51] Arnett T.: Regulation of bone cell function by acid-base balance. *Proc. Nutr. Soc.* 2003:62(2), 511-520.
- [52] Brandao-Burch A., Utting J.C., Orriss I.R. et al.: Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. *Calcif. Tissue*, 2005:77, 167-174.
- [53] Bushinsky D.: Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts. *Am J. Physiol.*, 1996:271(40), F216-F222.
- [54] Bushinsky D.: Chronic Acidosis. *Calcium Release*. *Eur. J. Nutr.*, 2001:40(5), 240-244.
- [55] MacLeay J.M., Sullivan E.K., Jackinsky S.J. et al.: Ovine modeling of dietary induced metabolic acidosis and bone loss. *International Congress Series*. 2007:1297, 282-285.
- [56] MacLeay J.M., Olson J.D., Enns R.M. et al.: Dietary induced metabolic acidosis reduced bone mineral density in mature ovariectomized ewes. *Calcif. Tissue*. 2004:75, 431-437.
- [57] MacLeay J.M., Olson J.D., Turner A.S.: Effect of dietary induced metabolic acidosis and ovariectomy on bone mineral density and markers of bone turnover. *J. Bone Mineral. Metab.*, 2004:22(6), 561-568.
- [58] Paul A.A., Southgate D.A.T.: *McCance and Widdowson's The Composition of Foods*. Verlag Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford 1978.
- [59] Department of Human Nutrition at Deakin University.: CHLORINE Food Charts. <http://apjcn.nhri.org.tw/server/info/books-phds/books/foodfacts/html/data/data5h.html>
- [60] Piekarska J., Łoś-Kuczera M.: *Skład i wartość odżywcza produktów spożywczych*. PZWL, Warszawa 1983.
- [61] Department of Human Nutrition at Deakin University.: PHOSPHORUS Food Charts: <http://apjcn.nhri.org.tw/server/info/books-phds/books/foodfacts/html/data/data5f.html>
- [62] Department of Human Nutrition at Deakin University.: SULPHUR Food Charts. <http://apjcn.nhri.org.tw/server/info/books-phds/books/foodfacts/html/data/data5g.html>