

Analiza wpływu wybranych pierwiastków na funkcjonowanie tkanki kostnej

Analysis of the influence of selected elements on the functioning of the bone tissue

Dawid Łabądź¹, Justyna Skolarczyk¹, Joanna Pekar¹, Barbara Nieradko-Iwanicka²

¹Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Higieny Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

²Katedra i Zakład Higieny Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Streszczenie

Kość jako element narządu ruchu stanowi bogate źródło do prowadzenia badań związanych z fizjologią i patologią. Ortopedia upodobała sobie badanie kości pod kątem patologii, przede wszystkim związanych z zaburzeniem właściwej osi konstrukcyjnej, oraz zaburzeń funkcji motorycznych. Kości jednak są także prężnie działającym, żywym elementem istotnie wpływającym na metabolizm całego organizmu. Wpływu na nie możemy dopatrywać się w praktycznie wszystkich elementach środowiska, począwszy od żywienia, na składzie powietrza kończąc. Często przedmiotem badań są skomplikowane związki chemiczne, jakoby zapominając, że podstawowe ich elementy budulcowe - atomy poszczególnych pierwiastków - mogą wywierać istotny wpływ na funkcjonowanie organizmu.

Badania pokazują, że suplementacja wapnia wpływa na zmniejszenie ryzyka wystąpienia złamań osteoporetycznych. Szczególnie z poziomem wapnia interferuje fosfor, którego spożycie powinno być ściśle kontrolowane ze względu na ryzyko zakwaszenia organizmu. Niektóre pierwiastki takie jak cynk, selen, mogą zaburzać wchłanianie szkodliwych związków, a ich suplementacja wydaje się być szczególnie korzystna i interesująca. Pierwiastkiem którego zastosowanie wywołuje duże emocje jest także fluor - którego związki mimo zastosowania w stomatologii, mogą wywoływać toksyczny wpływ na kości. Pierwiastkiem którego pochodne ze względu na zanieczyszczenie środowiska powszechnie nas otacza jest tak że kadm, który wywołuje zdecydowanie negatywny wpływ nie tylko na tkankę kostną, ale także wiele innych tkanek i narządów.

Niniejsza praca jest próbą syntetycznego podsumowania dostępnej wiedzy na temat pierwiastków budujących tkankę kostną, oraz wpływających na jej metabolizm pozytywnie lub negatywnie.

Słowa kluczowe: pierwiastki, kości, metabolizm, tkanka kostna, wapń, fosfor, mikroelementy

Abstract

The Bone as part of organ motion is a rich source of research related to Physiology and pathology. Orthopaedics as a bone test for pathology, primarily associated with the disorder the correct structural axis, and impaired motor function. However, bones are also a rapidly acting, living element significantly influencing the metabolism of the whole body. Impact on we cannot detect virtually all elements of the environment, starting with nutrition, the composition of the air. Often the subject of research are complex chemical compounds, forgetting that their basic building blocks-atoms of chemical elements - can have a significant impact on the functioning of the body.

Studies show that calcium supplementation in reducing the risk of fracture osteoporetycznych. Especially with the level of calcium interferuje phosphorus, which intake should be strictly controlled because of the risk of acidification of the body. Some elements such as zinc, selenium, can interfere with the absorption of harmful compounds, and their supplementation seems to be particularly beneficial and interesting. Element of the application calls the big emotions is also fluoride - which compounds even though applications in dentistry, may cause toxic effects on bone. Element whose derivatives due to the environmental pollution commonly surrounds us is so that cadmium, which calls the strongly negative impact not only on bone tissue, but also a variety of other tissues and organs.

This work is an attempt at synthetic summary of available knowledge about the elements that build bone, and its metabolism affecting positively or negatively.

Key words: roots, bones, metabolism, bone tissue, calcium, phosphorus, micronutrients

Wstęp:

Kości (ang. *bones*, łac. *ossea*) stanowią bierną część narządu ruchu. Stwierdzenie „bierna część”, jest tu mylące, ponieważ tkanka kostna jest bardzo aktywna metabolicznie. Spełnia nie tylko ważną funkcję mechaniczną ale również uczestniczy w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej oraz kwasowo-zasadowej [16]. Podstawową jednostką budowy kości jest blaszka kostna, a zasadniczo tkanka kostna składa się z istoty międzykomórkowej i komórek (osteocytów, osteoblastów, osteoklastów oraz prekursorowych komórek osteogennych) [8]. Istota międzykomórkowa składa się z części organicznej (stanowiącej 30-35% suchej masy)- którą budują głównie włókna kolagenowe, proteoglikany, niektóre lipidy i białka, oraz z części nieorganicznej (65-70% suchej masy)- zbudowanej głównie z fosforanu wapnia, przyjmującego bardziej złożone formy pod postacią hydroksyapatytu. Wapń i fosfor stanowią jedne z głównych makroelementów organizmu ludzkiego. Należy jednak pamiętać, że wiele rzadziej występujących w organizmie ludzkim pierwiastków może bardzo istotnie wpływać na metabolizm tkanki kostnej- wymieniane tutaj są zwłaszcza takie mikroelementy jak fluor oraz cynk. Metale ciężkie, takie jak kadm, może wpływać szkodliwie.[18]. Należy wspomnieć, że istotny wpływ na pogorszenie jakości tkanki kostnej w postaci

zaburzeń budowy bełczkowej obserwować możemy u chorych na chorobę trzewną, a dieta bezglutenowa może działać osteoprotekcyjnie [23].

Poniżej umieszczona została charakterystyka pierwiastków biorących udział w budowie tkanki kostnej. Spośród nich wapń i fosfor należą do makroelementów, cynk, fluor i selen do mikroelementów [3] Kadm zaś jest pierwiastkiem, którego związki są toksyczne[18].

Wapń:

Pierwiastek zaliczany do berylowców. Jego zawartość w ciele człowieka oceniana jest na ok. 1,7% masy ciała. W 99% znajduje się w istocie międzykomórkowej tkanki kostnej, a tylko 1% rozmieszczone jest w płynach ustrojowych lub innych tkankach (tu głównie w postaci zjonizowanej). Wapń wiąże się z białkami osocza, głównie albuminą. Dzielne zapotrzebowanie na ten pierwiastek wynosi ok. 1g, pokrywane jest ono głównie poprzez źródła pokarmowe (przetwory mleczne, rośliny strączkowe), zaś wchłanianie odbywa się przy współdziałaniu witaminy D. Wydalanie w 80% odbywa się drogą jelitową, w 20% drogą nerkową [3]. Wapń odgrywa wiele ważnych funkcji: inicjuje skurcz mięśnia poprzez wiązanie się z kalmoduliną i troponiną C, stanowi wtórny przekaźnik w przewodnictwie nerwowym, bierze udział w krzepnięciu krwi i uwalnianiu hormonów z komórek gruczołowych. Funkcjonowanie wapnia jest ściśle powiązane z witaminą D, jednak opis ich wzajemnych współzależności przerasta wymiary pracy. Suplementacja wapnia powoduje wzrost gęstości mineralnej kości oraz zmniejszenie ilości złamań pozakręgowych. Analiza obejmująca 29 badań, opublikowanych w latach 1978–2006 ukazała, że efekt zmniejszonego ryzyka złamań był większy w badaniach, w których pacjenci przyjęli $\geq 80\%$ dawek suplementu w porównaniu z badaniami, w których odsetek ten był mniejszy [22]. Dość istotną rolę protekcyjną przed mobilizacją puli mineralnej wapnia może odgrywać jego suplementacja u matek karmiących piersią, zaś już po 6 miesiącach suplementacji wapnia u młodych aktywnych fizycznie mężczyzn obserwowano zwiększenie grubości warstwy korowej kości [20]. Badanie prowadzone na kurach pokazało, że suplementacja wapnia wraz z witaminą K wywołuje wzrost powierzchni szpikowej [21].

Fosfor

Zawartość tego pierwiastka w organizmie ludzkim oceniana jest na ok. 1% masy ciała, zaś dziennie zapotrzebowanie wynosi ok. 1,2g. Fosfor przyswajalny jest poprzez przewód pokarmowy, wchłanianie podlega wpływowi parathormonu i kalcytriolu, zaś usuwany jest drogą nerkową. Jest to pierwiastek niezbędny do syntezy ATP, bierze udział w tworzeniu wiązań estrowych i bezwodnikowych, jest ważnym substratem do syntezy nukleotydów.[3] Zidentyfikowano całe spektrum zaburzeń wynikających z zaburzeń metabolizmu tego pierwiastka- towarzyszącym zwłaszcza chorobom nerek, takich jak zespół Fanconiego, a także mutacjom czynnika wzrostu fibroblastów FGF-23, oraz wpływie obecności guzów mezenchymalnych [13]. Również zbyt duża suplementacja witaminy D może nasilać objawy hipofosfatemii. Zaburzenia wynikające z niedoboru lub zaburzeń metabolizmu fosforu mogą istotnie wpływać na zaburzenia mineralizacji tkanki kostnej, pogarszając jej jakość. Drugą stroną medalu jest bardzo bogata zawartość związków fosforowych w żywności- m.in. w jajach, orzeszkach ziemnych, rybach, a także serach- ich obecność współistnieje z obecnością nadmiarowych jonów wodorowych, co z kolei wpływa na gospodarkę kwasowo-zasadową, pośrednio doprowadzając do zakwaszenia organizmu, wywołując zaburzenia metabolizmu witaminy D, oraz indukując wytrącanie się nierozpuszczalnych osadów[16]. U szczurów karmionych pożywieniem z dużym stężeniem związków fosforowych obserwowano w surowicy wzrost poziomów hormonów przytarczyc, stężeń markerów obrotu kostnego,

receptora aktywatora ekspresji mRNA ligandu NF- κ B w kości udowej, stężenia wapnia i fosforu w nerkach, oraz zmniejszenie aktywności N-acetylo- β -D- glukozydaminidazy i wydalanie β 2-mikroglobuliny z moczem. Dodatkowo zaobserwowano zmniejszenie zawartości składników mineralnych i gęstości mineralnej kości udowej i piszczeli [15].

Cynk

To pierwiastek który jest kofaktorem wielu enzymów, głównie metaloprotein. Dzielne zapotrzebowanie na ten pierwiastek oscyluje ok. 10mg. Transportowany jest w osoczu krwi połączony z albuminą, zaś w komórkach magazynowany jest pod postacią metalotioneiny, która może wiązać także inne pierwiastki (miedź, kadm, bizmut) i pełni funkcje ochronne wobec organizmu przed szkodliwymi jonami metali ciężkich. Cynk wydala się głównie drogą jelitową, zaś w małej ilości (0,2-0,5 mg/dobę) także drogą nerkową i z potem. Szczególnie wysokie stężenie cynku obserwuje się w płynie nasiennym (1 mg/ml) [3]. Skutkami niedoboru cynku może być w szczególności upośledzone gojenie się ran ale także spowolniony wzrost, zaburzenia dojrzewania płciowego, zaburzenia neurologiczne pod postacią upośledzeniu smaku. Wykazano, że suplementacja cynku może wpłynąć pozytywnie na formowanie tkanki kostnej przez wpływ na białko morfogenetyczne kości (BMP) nie indukując przy tym procesów zapalnych [4].

Fluor

W organizmie ludzkim występuje głównie w postaci fluorku wapnia. Jego rola jest dość kontrowersyjna. Niektórzy nie uważają fluoru za biopierwiastek (brak norm stężenia w płynach ustrojowych, brak wiadomości na temat skutków niedoboru). Wzmacnia kości i zęby w budując się w kryształ hydroksyapatytu, zastępując w nim grupę hydroksylową. Posiada szerokie zastosowanie w stomatologii w prewencji próchnicy zębów[3]. Długotrwałe narażenie na wysokie stężenia fluoru powoduje zakłócenie równowagi między kościotwórczym, a resorbcją tkanki kostnej oraz powodują fluorozę szkieletową. Pierwiastek ten może uszkadzać kolagen typu I, który odpowiedzialny jest za stabilność tkanki kostnej i funkcje biologiczne komórek. Ponadto fluor może przyczyniać się do zmian w ultrastrukturze tkanki kostnej [26].Badania z udziałem szczurów wykazały, że ekspozycja na fluor prowadzi do zwiększenia ilości kości zbitnej i gąbczastej, przerostu chondrocytów oraz zaburzeń ich kształtowania oraz wzrostu stężenia beta- kateniny głównie w osteoblastach i osteoklastach [14].

Selen

Zainteresowanie tym pierwiastkiem gwałtownie wzrosło, gdy okazało się, że jest elementem składowym stosunkowo niedawno odkrytego aminokwasu- selenocysteiny. Jego zawartość w organizmie związana jest ze zróżnicowaną geograficznie jego zawartością w środowisku. W organizmie wchodzi w skład białek, także enzymatycznych (np. część peroksydaz), spełnia funkcje antyoksydacyjne. Zapotrzebowanie dziennie na ten pierwiastek wynosi ok. 55 μ g u kobiet (rośnie w czasie ciąży i laktacji) i ok. 70 μ g u mężczyzn [3]. Niedobór selenu koreluje z występowaniem endemicznej kardiomiopatii Keshan [10] oraz zachorowalnością na nowotwory złośliwe [3]. Badanie Arslana i wsp. pokazało, że dieta ketogenna stosowana u chorych na epilepsję, może już po 6 miesiącach istotnie wpłynąć na zmniejszenie stężenia selenu w surowicy [2]. Suplementacja tego pierwiastka skorelowana z wpływem na choroby tarczycy jest obecnie przedmiotem badań [19]. Wykazano pozytywny przyjmowania dawek suplementacyjnych na wzrost gęstości mineralnej kości [27].

Kadm

Kadm to pierwiastek, który stanowi duże zagrożenie dla życia i zdrowia ludzi i zwierząt. Ze względu na duże jego wykorzystanie w przemyśle (produkcja akumulatorów niklowo-kadmowych, barwników, stabilizatorów, tworzyw sztucznych, powłok ochronnych, sztucznych ogni, farb fluorescencyjnych), kadm odgrywa jedną z kluczowych ról spośród pierwiastków toksycznych. Długi okres półtrwania tego pierwiastka powoduje jego akumulację w środowisku i zwiększa ryzyko wchłonięcia kadmu w wysokich stężeniach. Dwie zasadnicze drogi wchłaniania tego pierwiastka, to droga oddechowa (10-40% wchłoniętej dawki)- na ekspozycję najbardziej narażeni są palacze papierosów (spalenie 1 papierosa powoduje dostanie się do organizmu 0,1-0,2 ug kadmu) oraz droga pokarmowa (ok. 6% wchłoniętej dawki)- głównie poprzez spożycie roślin (w naszym klimacie głównie ziemniaków) mięsa ryb, skorupiaków, podrobów [9]. Wedle zaleceń WHO/FAO dopuszczalna dawka kadmu to 60-70 ug/dobę, a tolerowane spożycie to 0,4-0,5 mg/tydzień. We wchłonięciu kadmu drogą pokarmową istotną rolę wpływa spożycie wapnia, a także stężenie jonów cynku, miedzi, wapnia i żelaza. Jednocześnie wysokie stężenie kadmu wywołuje zaburzenia metabolizmu wymienionych jonów, prowadząc do osteomalacji, demineralizacji kości i osteoporozy.

Wchłanianie kadmu to proces wieloetapowy. Najwięcej kadmu wchłania się dwunastnicy, początkowo akumulując się w enterocytach, następnie podlega redystrybucji dzięki przenośnikom DMT1 i MTP1, oraz hZTL1, ZNT1 (transportery jonów cynkowych)[9]. Część ulega wchłonięciu wraz z grupami tiolowymi glutationu i cysteiny. W krwioobiegu kadm wiąże się z błoną erytrocytów lub hemoglobina. Kadm, podobnie jak molibden powoduje zakłócenie równowagi wapniowo- fosforanowej oraz zmniejszenie stężenia seleniu, żelaza, miedzi i cynku w tkance kostnej, co może prowadzić do jej uszkodzeń [18]. Badanie zawartości kadmu w preparatach kości biodrowych człowieka wykazało, że pierwiastek ten ma największe powinowactwo do kumulacji w istotach gąbczastych, natomiast najmniej w torebkach stawowych. Większe ilości kadmu w tkance kostnej posiadają mężczyźni. [5]. Ponadto wykazano, że 90- dniowa ekspozycja na kadm prowadzi do znacznego zmniejszenia gęstości tkanki kostnej [17] [25]. Badania przeprowadzone z udziałem ciężarnych szczurzy wykazały, że pojedyncza dawka kadmu podana w czasie ciąży może doprowadzić do deformacji czaszki, kręgosłupa oraz kończyn [11]. Doustne podawanie 30 mg CdCl₂/L dorosłym samcom szczurów przez okres 90 dni spowodowało zwiększenie masy kości udowych oraz zmiany w budowie histologicznej części zbitnej kości udowych- zwężenie kanałów naczyniowych oraz rozwój wczesnych zmian osteoporotycznych w porównaniu do grupy kontrolnej [12]. Przewlekła ekspozycja na kadm jest w stanie doprowadzić do rozwoju zmian osteoporotycznych kości i zwiększenia ryzyka złamań [1]. Badania naukowe wskazały, że polifenole zawarte w jagodach aronii wywierają ochronny wpływ na tkankę kostną samic szczurów i zapobiegają jej uszkodzeniom indukowanym przez kadm. Polifenole mogą wykazywać podobny efekt w odniesieniu do tkanki kostnej ludzi, dlatego też należy przeprowadzić dalsze badania nad profilaktycznym stosowaniem ich w prewencji uszkodzeń wywoływanych przez ten pierwiastek. [6] Okazało się, że suplementacja cynku chroni przed stresem oksydacyjnym uszkadzającym DNA, białka i utleniającym lipidy w kościach wywoływanych przez kadm. Ponadto cynk zapobiega zwiększeniu stężenia sRANKL i spadku stężenia osteoprotegryny w surowicy i kościach. [7]

Tab. 1. Wybrane właściwości opisywanych pierwiastków na podstawie danych PubChem.

Właściwość/ Pierwiastek	Masa cząsteczkowa	Stan skupienia	Właściwości metaliczne	Gęstość	Temperatura topnienia	Temperatura wrzenia
Wapń	40.078 g/mol	stały	metal	1550 kg/m ³	842 °C	1484 °C
Fosfor	30,97 g/mol	stały	niemetal	1823 kg/m ³ (biały) 2160 kg/m ³ (czerwony) 2690 kg/m ³ (czarny)	44,15°C (biały) 610 °C (czarny)	280,5 °C (biały) 431 °C (<czerwony, punkt sublimacji)
Cynk	65.38 g/mol	stały	metal przejściowy	7134 kg/m ³	419,53 °C	907 °C
Fluor	18,998 g/mol	gazowy	niemetal	1,696 kg/m ³	-219,67°C	-188,12 °C
Selen	78.971 g/mol	stały	niemetal	4,790 g/cm ³	220 °C	684,65 °C
Kadm	112.414 g/mol	stały	metal przejściowy	8650 kg/m ³	321,07 °C	767 °C

Wnioski:

Podsumowując, możemy dojść do kilku wniosków:

- 1) Suplementacja wapnia powinna być zalecana, opcjonalnie w połączeniu z witaminą D, ponieważ zmniejsza ona ryzyko złamań osteoporetycznych i zwiększa gęstość mineralną kości.
- 2) Spożycie związków fosforowych powinno być ściśle kontrolowane, ze względu na łatwą interferencje poziomów tego pierwiastka na procesy metaboliczne i mineralizację kości.
- 3) Suplementacja mikroelementów takich jak cynk, czy selen jest korzystna, jednak wymaga

dalszych badań. Może ona także zaburzać wchłanianie pierwiastków szkodliwych takich jak kadm.

4) Fluor jest pierwiastkiem, którego związki mimo niewątpliwych pożytecznych zastosowań w stomatologii, winny być dalej badane w celu oceny bezpieczeństwa ich stosowania.
5) Kadm wpływa toksycznie na kości wieloaspektowo- istotne są działania prowadzące do zmniejszenia jego stężenia w środowisku, szczególnie interesujący wydaje się wpływ polifenoli zawartych w aronii- powinno to być przedmiotem intensywnych badań. Prowadzone badania wpływu związków poszczególnych pierwiastków winny być prowadzone wieloaspektowo- tak by zauważać wzajemne interferencje pomiędzy poszczególnymi działaniami tych związków, sygnalizując wpływy synergistyczne i antagonistyczne.

Piśmiennictwo:

1. Åkesson A, Barregard L, Bergdahl IA, Nordberg GF, Nordberg M, et al. *Non-renal effects and the risk assessment of environmental cadmium exposure*. Environ Health Perspect. 2014; 122 (5):431-438.
2. Arslan N, Kose E, Guzel O. *The Effect of Ketogenic Diet on Serum Selenium Levels in Patients with Intractable Epilepsy*. Biol Trace Elem Res. 2016 Nov 21.
3. Bańkowski E. *Biochemia, podręcznik dla studentów uczelni medycznych*, 2009;2; 403-410.
4. Begam H, Nandi SK, Chanda A, Kundu B. *Effect of bone morphogenetic protein on Zn-HAp and Zn-HAp/collagen composite: A systematic in vivo study*. Res Vet Sci. 2017 Jan 17;115:1-9.
5. Brodziak-Dopierała B, Kwapuliński J, Sobczyk K, Wiechuła D. *Analysis of the content of cadmium and zinc in parts of the human hip joint*. Biol Trace Elem Res. 2015; 163 (1-2): 73-80.
6. Brzóska MM, Rogalska J, Galazyn-Sidorczuk M, Jurczuk M, Roszczenko A, et al. *Protective effect of Aronia melanocarpa polyphenols against cadmium-induced disorders in bone metabolism: a study in a rat model of lifetime human exposure to this heavy metal*. Chem Biol Interact. 2015; 229: 132-46.
7. Brzóska MM, Rogalska J. *Protective effect of zinc supplementation against cadmium-induced oxidative stress and the RANK/RANKL/OPG system imbalance in the bone tissue of rats*. Toxicol Appl Pharmacol. 2013; 272 (1): 208-220.
8. Cichocki T., Litwin J. A., Mirecka J., Litwin. *Kompendium histologii*, 2002;3;103-107
9. H. Czeczot, M. Majewska *Kadm – zagrożenie i skutki zdrowotne*. Toksykol. 2010;66;243-250.
10. Dasgupta S, Aly AM. *Dilated Cardiomyopathy Induced by Chronic Starvation and Selenium Deficiency*. Case Rep Pediatr. 2016;2016:8305895.
11. del C Díaz M, González NV, Gómez S, Quiroga MA, Najle R, et al. *Effect of a single dose of cadmium on pregnant Wistar rats and their offspring*. Reprod Domest Anim. 2014; 49 (6): 1049-1056.
12. Duranova H, Martiniakova M, Omelka R, Grosskopf B, Bobonova I, et al. *Changes in compact bone microstructure of rats subchronically exposed to cadmium*. Acta Vet Scand. 2014; 56: 64.
13. Georges GT, Nájera O, Sowers K, Sowers JR. *Fibroblast Growth Factor 23 and Hypophosphatemia: A Case of Hypophosphatemia along the Rickets-Osteomalacia Spectrum*. Cardioresnal Med. 2016 Nov;7(1):60-65.
14. Guo X, Wu S, He Y, Zhang Z, Sun G. *Effect of subchronic fluoride exposure on pathologic change and beta-catenin expression in rat bone tissue*. Wei Sheng Yan Jiu. 2011;40 (3): 304-307.

15. Katsumata S, Matsuzaki H, Uehara M, Suzuki K. *Effects of Dietary Calcium Supplementation on Bone Metabolism, Kidney Mineral Concentrations, and Kidney Function in Rats Fed a High-Phosphorus Diet.* J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 2015;61(2):195-200.
16. Kowalczyk J. R. *Pediatria-wybrane zagadnienia. Nefrologia, hematologia, onkologia, gastroenterologia, endokrynologia.* 2010;2;241-250.
17. Lu H, Yuan G, Yin Z, Dai S, Jia R, et al. *Effects of subchronic exposure to lead acetate and cadmium chloride on rat's bone: Ca and Pi contents, bone density, and histopathological evaluation.* Int J Clin Exp Pathol. 2014;7 (2): 640-647.
18. Liao Y, Cao H, Xia B, Xiao Q, Liu P, et al. *Changes in Trace Element Contents and Morphology in Bones of Duck Exposed to Molybdenum or/and Cadmium.* Biol Trace Elem Res. 2017; 175 (2): 449-457.
19. Negro R, Attanasio R, Grimaldi F, Marcocci C, Guglielmi R, Papini E. *A 2016 Italian Survey about the Clinical Use of Selenium in Thyroid Disease.* Eur Thyroid J. 2016 Sep;5(3):164-170.
20. Silk LN, Greene DA, Baker MK, Jander CB. *Tibial bone responses to 6-month calcium and vitamin D supplementation in young male jockeys: A randomised controlled trial.* Bone. 2015 Dec;81:554-61.
21. Souza C, Santos TC, Murakami AE, Iwaki LC, Mello JF. *Influence of graded levels of calcium and vitamin K in the diets of laying hens during the growing phase and their effects on the laying phase.* J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2016 Jul 20.
22. Tang B.M.P., Eslick G.D., Nowson C., Smith C., Bensoussan A. *Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis,* The Lancet, 2007; 370: 657–666.
23. Zanchetta MB, Longobardi V, Bai JC. *Bone and Celiac Disease.* Curr Osteoporos Rep. 2016 Apr;14(2):43-8.
24. Zhang ZQ, Chen YM, Wang RQ, Huang ZW, Yang XG, Su YX. *The effects of different levels of calcium supplementation on the bone mineral status of postpartum lactating Chinese women: a 12-month randomised, double-blinded, controlled trial.* Br J Nutr. 2016 Jan 14;115(1):24-31.
25. Zhu G, Chen X, Jin T, Qin B, Zhou W, et al. *Cadmium is more toxic on volume bone mineral density than tissue bone mineral density.* Biol Trace Elem Res. 2011;144 (1-3): 380-387.
26. Yan X, Hao X, Nie Q, Feng C, Wang H, et al. *Effects of fluoride on the ultrastructure and expression of Type I collagen in rat hard tissue.* Chemosphere. 2015;128 : 36-41.
27. Beukhof CM, Medici M, van den Beld AW, Hollenbach B, Hoeg A, Visser WE, de Herder WW, Visser TJ, Schomburg L, Peeters RPS. *Selenium Status Is Positively Associated with Bone Mineral Density in Healthy Aging European Men.* PLoS One. 2016 Apr 7;11(4).