

NATALIA WAWRZYŃIAK, ANNA GRAMZA-MICHAŁOWSKA,  
BARTOSZ KULCZYŃSKI, PAWEŁ KOŁODZIEJSKI, JOANNA SULIBURSKA

### WPLYW WZBOGACONEJ W WAPŃ DYNI NA WYBRANE PARAMETRY BIOCHEMICZNE KRWI SZCZURÓW PO OWARIEKTOMII

#### Streszczenie

Często obserwuje się w diecie kobiet niedobór wapnia, dlatego też ważne jest poszukiwanie nowych źródeł tego niezbędnego składnika mineralnego. Jednym z innowacyjnych produktów jest dynia wzbogacona w wapń. Dostarczenie do organizmu łatwo przyswajalnego wapnia może mieć wpływ na zmniejszenie objawów związanych z menopauzą.

Celem pracy było określenie wpływu dyni wzbogaconej w mleczan wapnia, uzyskanej metodą odwadniania osmotycznego, stosowanej w żywieniu szczurów po owariektomii na zmiany parametrów biochemicznych ich krwi. Badania przeprowadzono na 12-tygodniowych samicach szczurów Wistar. Zwierzęta podzielono na 8 grup ( $n = 10$ ), z czego 7 poddano operacji owariektomii. Szczury żywiono dietą standardową modyfikowaną w zależności od grupy: 1) kontrolna K(-) – dieta standardowa (bez modyfikacji), 2) kontrolna K(+) po owariektomii – dieta standardowa (bez modyfikacji), 3) OVXDEF – dieta z niedoborem wapnia, 4) OVXP – dieta z dynią niewzbogaconą, 5) OVXCaL – dieta z mleczanem wapnia, 6) OVXPCaL – dieta z dynią wzbogaconą mleczanem wapnia, 7) OVXCaLA – dieta z mleczanem wapnia i z dodatkiem alendronianu potasu, 8) OVXPCaLA – dieta z dynią wzbogaconą w wapń i z dodatkiem alendronianu potasu. Po 12 tygodniach od interwencji wykonano analizę składu ciała szczurów, następnie zwierzęta zdekapitowano i pobrano krew do analiz. W surowicy krwi oznaczono profil lipidowy, aminotransferazy ALT i AST oraz glukozę. Wykazano, że owariektomia wpłynęła znacząco na zwiększenie masy ciała szczurów, zawartość tkanki tłuszczowej, stężenie ALT oraz niekorzystnie oddziaływała na profil lipidowy. Zaobserwowano ponadto, że dynia wzbogacona w wapń znacznie obniżyła stężenie aminotransferazy alaninowej i triacylogliceroli we krwi szczurów po owariektomii. Podsumowując, można stwierdzić, że dynia wzbogacona w mleczan wapnia normalizuje parametry funkcji wątroby i parametry lipidowe u szczurów po zabiegu usunięcia jajników.

**Słowa kluczowe:** dynia wzbogacona, wapń, owariektomia, profil lipidowy, aminotransferazy

---

*Mgr N. Wawrzyniak, dr hab. J. Suliburska, Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki, prof. dr hab. A. Gramza-Michałowska, dr B. Kulczyński, Katedra Technologii Gastronomicznej i Żywności Funkcjonalnej, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, dr P. Kołodziejcki, Katedra Fizjologii i Biochemii Zwierząt, Wydz. Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań. Kontakt: joanna.suliburska@up.poznan.pl*

## Wprowadzenie

Według Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW) okres okołomenopauzalny składa się z trzech etapów: wczesna okołomenopauza charakteryzująca się nieregularnym cyklem menstruacyjnym, późne przejście menopauzalne – okres ponad dwóch miesięcy między miesiączkami oraz wczesna menopauza, czyli pierwszy rok od ostatniej miesiączki [34]. W okresie pomenopauzalnym dochodzi do wahań hormonów płciowych, a objawy wiążą się głównie ze znacznym niedoborem estrogenu, czego skutkiem są liczne zmiany metaboliczne, immunologiczne i fizjologiczne w organizmie kobiety [44]. Uderzenia gorąca i nocne poty, bezsenność i niestabilność nastroju mogą rozpocząć się przed ustaniem menstruacji, natomiast długotrwały niedobór estrogenu prowadzić może do migreny, zmian metabolicznych i wzrostu masy ciała, miażdżycy i chorób sercowo-naczyniowych, objawów związanych z układem moczowo-płciowym (bolesność przy oddawaniu moczu, nawracające infekcje), dysfunkcji seksualnych, suchości naskórka, osteoporozy [34].

Przebudowa kości składa się z czterech etapów: aktywacji fazy spoczynkowej, resorpcji, fazy odwróconej oraz formowania. W stanie niedoboru estrogenu cykl ten zostaje upośledzony poprzez zwiększenie aktywności fazy resorpcji, czego skutkiem jest utrata masy kostnej. Mineralna gęstość kości  $\leq -2,5$  T-score w badaniu densytometrycznym świadczy o osteoporozie, co zwiększa ryzyko złamań kości. Terapię osteoporozy można przeprowadzić drogą farmakologiczną lub/i żywieniową. Do leków chroniących przed utratą masy kości należą środki anaboliczne, zwiększające formowanie kości (np. teryparatyd) oraz środki przeciwresorpcyjne (głównie bisfosfoniary, denozumab, hormonalna terapia zastępcza) [17]. Natomiast do żywieniowych metod leczenia należy zwiększenie spożywania źródeł bogatych w wapń oraz unikanie czynników zmniejszających jego przyswajalność [45].

Niedobór wapnia w diecie jest powszechnym problemem, który dotyczy ludności na całym świecie, w szczególności kobiet w okresie okołomenopauzalnym. Przewlekły niedobór wapnia może przyspieszyć zmniejszanie mineralnej gęstości kości i wraz z deficytem estrogenu przyczynić się do powstania osteoporozy [6].

Jednym ze sposobów na zwiększenie dziennej podaży wapnia jest zastosowanie żywności fortyfikowanej. Innowacyjnym produktem, mogącym pomóc w dostarczeniu do organizmu odpowiedniej ilości wapnia, jest dynia wzbogacona metodą odwadniania osmotycznego [28].

Celem pracy było określenie wpływu dyni wzbogaconej w mleczan wapnia, uzyskanej metodą odwadniania osmotycznego, stosowanej w żywieniu szczurów po ovariectomii na zmiany parametrów biochemicznych ich krwi.

## Material i metody badań

Dynia użyta do badań pochodziła z krajowych upraw ekologicznych, natomiast mleczan wapnia i inulinę zakupiono w firmie Agnex (Białystok, Polska). Składniki karmy dla zwierząt, tj. składniki mineralne, witaminy, cholinę i L-cysteinę zakupiono w firmie Sigma-Aldrich (Darmstadt, Niemcy) natomiast skrobię kukurydzianą, dekstrynę, kazeinę, sacharozę, celulozę oraz olej rzepakowy – w firmie Hortimex (Konin, Polska).

Szczury Wistar (12-tygodniowe samice) zakupiono w Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Zwierzęta trzymano w standardowych warunkach, pojedynczo w klatkach. Zastosowano dwunastogodzinny cykl światło – ciemność. Badania poprzedzono jednodniową aklimatyzacją zwierząt. Doświadczenie na zwierzętach przeprowadzono zgodnie z wytycznymi dotyczącymi opieki i użytkowania zwierząt laboratoryjnych. Na eksperyment uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej w Poznaniu nr 34/2019.

Badania przeprowadzono na 80 szczurach. Wszystkie szczury były karmione dietą AIN-93M [37]. Zwierzęta losowo podzielono na osiem grup po 10 zwierząt w każdej. Początkowa masa ciała szczurów nie różniła się między grupami. Na początku doświadczenia 70 szczurów poddano owariektomii (OVX) w celu ustalenia modelu osteoporozy pomenopauzalnej. Po 7 dniach rekonwalescencji rozpoczęto interwencję żywieniową trwającą 12 tygodni. Dietę standardową modyfikowano w zależności od grupy:

- kontrolna K(-) – dieta standardowa (bez modyfikacji),
- kontrolna K(+) po owariektomii – dieta standardowa (bez modyfikacji),
- OVXDEF – dieta z niedoborem wapnia,
- OVXP – dieta z dynią niewzbogaconą,
- OVXCaL – dieta z mleczanem wapnia,
- OVXPCaL – dieta z dynią wzbogaconą mleczanem wapnia,
- OVXCaLA – dieta z mleczanem wapnia, z dodatkiem alendronianu potasu,
- OVXPCaLA – dieta z dynią wzbogaconą w wapń, z dodatkiem alendronianu potasu.

Każda dieta, poza deficytową, zawierała 5 g wapnia na 1 kg diety. Dietę deficytową otrzymano poprzez pominięcie dodatku węglanu wapnia do standardowej diety. Dynia została wzbogacona mleczanem wapnia w procesie odwodnienia osmotycznego z użyciem substancji osmotycznie czynnej – inuliny [28]. 1 g liofilizatu dyni wzbogaconej mleczanem wapnia zawierał 28 mg wapnia. Dynię wzbogaconą mleczanem wapnia dodawano w ilości 180 g na 1 kg diety OVXPCaL, natomiast do diety OVXCaL dodawano 27,22 g mleczanu wapnia na 1 kg diety. Zwierzętom pozwolono spożywać karmę i pić wodę dejonizowaną *ad libitum* przez cały eksperyment. Szczury w każdej grupie ważono raz w tygodniu, a codziennie odnotowywano spożycie pokar-

mu. Po zakończeniu eksperymentu przeprowadzano analizę składu ciała wszystkich zwierząt za pomocą analizatora składu ciała LF90II firmy Bruker (USA). Następnie szczury z każdej grupy dekapitowano i pobierano próbki krwi. Krew wirowano i otrzymano surowicę. W surowicy oznaczano: aminotransferazę alaninową i asparaginianową, glukozę, cholesterol, triacyloglicerole, cholesterol LDL i cholesterol HDL. Badania biochemiczne krwi wykonywano w certyfikowanym laboratorium diagnostycznym.

Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  odchylenie standardowe. Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą programu Statistica (StatSoft, USA). Zastosowano jednoczynnikową analizę ANOVA, a istotność różnic między wartościami średnimi weryfikowano testem post-hoc Tukeya ( $p < 0,05$ ).

### **Wyniki i dyskusja**

Wyniki przedstawiono w tab. 1 i 2. Masa ciała szczurów w grupach po owariektomii była istotnie większa niż w grupie kontrolnej, wyjątkiem była grupa żywiona dynią wzbogaconą w wapń (OVXCaL), która nie różniła się statystycznie od grupy kontrolnej (tab. 1). Zaobserwowano również, że zawartość tkanki tłuszczowej w grupach owariektomizowanych była prawie dwukrotnie większa niż w grupie kontrolnej K(-), z wyjątkiem grup karmionych dietą z dodatkiem wzbogaconej dyni, w których wartości tego parametru były porównywalne z grupą kontrolną. Szczury karmione dynią wzbogaconą w mleczan wapnia (OVXPCaL) miały mniej tkanki tłuszczowej niż szczury karmione z dodatkiem samego mleczanu wapnia (OVXCaL). Analogiczna sytuacja wystąpiła między grupą karmioną dietą wzbogaconą dynią z dodatkiem alendronianu (OVXPCaLA) a dietą z dodatkiem tylko mleczanu wapnia i alendronianu (OVXCaLA). U kobiet po menopauzie także obserwuje się wzrost masy ciała i tkanki tłuszczowej [32]. Zarówno receptory estrogeny, jak i leptyny znajdują się w tych samych neuronach w podwzgórzu brzuszno-przyśrodkowym, jądrze łukowatym oraz w obszarze przedocznym, które koordynują zarówno funkcję gonad, jak i metabolizm. W ten sposób estrogen odpowiada nie tylko za regulację rozrodu, ale także wpływa na utrzymanie prawidłowej masy ciała, a leptyna oprócz regulacji apetytu uczestniczy również w modulowaniu neuroendokrynych funkcji rozrodu. Po menopauzie stężenie estrogeny ulega zmniejszeniu, natomiast poziom leptyny zależy od masy ciała: u szczupłych kobiet po menopauzie stężenie leptyny jest w normie, natomiast u otyłych – stężenie ulega zwiększeniu [4]. Przy niedoborze estrogeny dochodzi do wzrostu reaktywnych form tlenu, a tym samym do zwiększenia stresu oksydacyjnego [33], co może skutkować przyrostem masy ciała [35]. Dynia zawiera przeciwutleniacze, które w sposób naturalny minimalizują stres oksydacyjny. Jednym z nich jest  $\beta$ -kryptoksantina, która poprzez 7-krotnie większe wchłanianie niż inne antyoksydanty z grupy karotenoidów może w istotny sposób przyczynić się do zmniejszenia masy

ciała wskutek obniżenia poziomu stresu oksydacyjnego [9]. Oprócz  $\beta$ -kryptoksantyny stres oksydacyjny mogą również zmniejszyć inne przeciwutleniacze zawarte w dyni, tj. luteina, likopen, zeaksantyna, rutyna czy kemferol [28]. W grupach szczurów karmionych dietą z dodatkiem mleczanu wapnia nie zaobserwowano tak zbliżonej masy ciała do grupy kontrolnej, jak w przypadku szczurów otrzymujących dynię wzbogaconą tym związkami. Pośrednio na ten wynik wpływ mógł mieć wzrost biodostępności wapnia oraz wpływ bioaktywnych składników dyni na mikrobiom jelitowy. Inulina, będąca jednym ze składników wzbogaconej dyni, zwiększa wchłanianie wapnia oraz innych składników mineralnych, czego przyczyną jest zmiana składu mikrobioty jelitowej – głównie wzrost probiotycznych bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* [14]. Możliwym mechanizmem jest też powiększenie powierzchni wchłaniania, głównie w kątnicy [2, 36] oraz zwiększenie stężenia krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (ang. SCFA, *short chain fatty acids*), które obniżają pH w jelicie, a tym samym zwiększają biodostępność wapnia [27, 36].

Jak podają Jürimäe i wsp. [24], ilość wapnia w diecie jest ujemnie skorelowana z zawartością tkanki tłuszczowej oraz masą ciała. W podobnych badaniach stwierdzono również, że przewlekły niedobór wapnia prowadzi do zaburzenia metabolizmu energetycznego [16], a jego suplementacja wzmacnia wrażliwość na insulinę i prowadzi do zmniejszenia masy ciała [15]. W niniejszych badaniach zastosowano również połączenie leku na osteoporozę (alendronianu potasu) z wapniem i dynią wzbogaconą w wapń. Alendronian stosuje się w tego typu badaniach modelowych [22, 23, 26, 29]. Bonnick i wsp. [8] wykazali, że dodatek wapnia nie niweluje działania alendronianu związanego ze zmniejszeniem resorpcji i zwiększeniem mineralnej masy kości, ale może zmniejszać w moczu zawartość N-teloptydu [8], którego występowanie jest wskaźnikiem diagnostycznym osteoporozy [18].

Zawartość wody w organizmie w grupach szczurów otrzymujących dietę z dodatkiem dyni była mniejsza niż w innych grupach owariotomizowanych i nie różniła się statystycznie istotnie od grupy kontrolnej. Natomiast beztłuszczowa masa ciała we wszystkich grupach była zbliżona do grupy kontrolnej.

W pracy badano parametry funkcji wątroby: aminotransferazę alaninową oraz aminotransferazę asparaginianową (tab. 2). Zaobserwowano nieznacznie wyższe stężenia ALT w krwi szczurów po owariotomii, ale były one statystycznie nieistotne. Zastosowanie diety z dynią wzbogaconą w wapń z dodatkiem alendronianu najsilniej obniżało stężenie tego parametru do wartości porównywalnej z grupą kontrolną. Warto zauważyć, że szczury spożywające dietę z wapniem bez dodatku dyni miały nieznacznie wyższe stężenia ALT aniżeli te, które otrzymywały dodatek dyni do diety. Owariotomia nie miała natomiast wpływu na stężenie AST we krwi. Nie zaobserwowano również wpływu interwencji żywieniowej na ten parametr.

Tabela 1. Dzielne spożycie diety przez badane szczury oraz skład ich ciała  
 Table 1. Daily diet intake of the test rats and their body composition

Wyszczególnienie / Item	Grupa / Group									
	K(-)	K(+)	OVXDEF	OVXP	OVXCaL	OVXPCaL	OVXCaLA	OVXPCaLA		
Dzielne spożycie karmy Daily diet intake [g]	25,08 ± 0,63	25,11 ± 1,7	26,14 ± 1,87	24,53 ± 1,09	25,90 ± 0,55	24,31 ± 1,26	26,19 ± 2,26	23,95 ± 1,75		
Masa ciała / Body mass [g]	337,19 <sup>a</sup> ± 27,2	436,62 <sup>b</sup> ± 56,89	449,79 <sup>b</sup> ± 68,62	424,89 <sup>b</sup> ± 55,3	443,32 <sup>b</sup> ± 52,21	403,9 <sup>ab</sup> ± 32,43	448,05 <sup>b</sup> ± 52,65	408,22 <sup>b</sup> ± 34,16		
Tkanka tłuszczowa Fat tissue [g]	113,66 <sup>a</sup> ± 42,99	225,68 <sup>bcd</sup> ± 66,19	246,19 <sup>bcd</sup> ± 83,14	205,94 <sup>abcd</sup> ± 79,23	252,27 <sup>cd</sup> ± 47,47	160,32 <sup>ab</sup> ± 36,9	274,89 <sup>d</sup> ± 69,62	176,96 <sup>abc</sup> ± 39,14		
Zawartość wody Water content [g]	34,08 <sup>a</sup> ± 7,02	52,9 <sup>bc</sup> ± 12,33	55,98 <sup>bc</sup> ± 15,99	51,09 <sup>bc</sup> ± 12,67	58,9 <sup>bc</sup> ± 9,29	42,76 <sup>ab</sup> ± 6,76	64,47 <sup>c</sup> ± 14,17	48,72 <sup>abc</sup> ± 8,2		
Beztłuszczowa masa ciała Lean body mass [g]	194,64 <sup>ab</sup> ± 21,21	199,76 <sup>ab</sup> ± 29,27	194,82 <sup>ab</sup> ± 24,77	203,49 <sup>ab</sup> ± 28,17	184,92 <sup>ab</sup> ± 20,25	217,3 <sup>b</sup> ± 24,96	170,21 <sup>a</sup> ± 24,87	205,96 <sup>b</sup> ± 23,55		

Objaśnienia / Explanatory notes:

K(-) – grupa kontrolna / control group; K(+)  
 – grupa po owariotomii / group after ovariectomy; OVXDEF – grupa po owariotomii na diecie z niedoborem wapnia / group after ovariectomy with calcium-deficient diet; OVXP – grupa po owariotomii na diecie z niedoborem wapnia z dodatkiem dyni / group after ovariectomy with calcium-deficient diet and with pumpkin added; OVXCaL – grupa po owariotomii na diecie z deficytem wapnia z dodatkiem mleczanu wapnia / group after ovariectomy with calcium-deficient diet and with calcium lactate added; OVXPCaL – grupa po owariotomii na diecie z deficytem wapnia z dodatkiem dyni wzbogaconej mleczanem wapnia / group after ovariectomy with calcium-deficient diet and with calcium lactate-enriched pumpkin added; OVXCaLA – grupa po owariotomii na diecie z deficytem wapnia z dodatkiem alendronianu potasu i mleczanu wapnia / ovariectomy group with a calcium-deficient diet with alendronate and calcium lactate; OVXPCaLA – grupa po owariotomii na diecie z deficytem wapnia z dodatkiem alendronianu potasu oraz dyni wzbogaconej mleczanem wapnia / group after ovariectomy with calcium-deficient diet and with potassium alendronate and calcium lactate-enriched pumpkin added. W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; a, b, c, d – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (p ≤ 0,05) / mean values in columns denoted by different letters differ statistically significantly (p ≤ 0,05).



Tabela 2. Wybrane parametry biochemiczne krwi szczurów  
Table 2. Selected biochemical parameters of blood in rats

Wyszczególnienie Item	Grupa / Group									
	K(-)	K(+)	OVXDEF	OVXP	OVXCaL	OVXPCaL	OVXCaLA	OVXPCaLA		
ALT [U/l]	44,69 <sup>a</sup> ± 20,24	68,99 <sup>ab</sup> ± 34,25	55,38 <sup>a</sup> ± 26,36	51,38 <sup>a</sup> ± 19,96	94,71 <sup>b</sup> ± 42,39	57,29 <sup>ab</sup> ± 17,82	71,58 <sup>ab</sup> ± 32,76	46,37 <sup>a</sup> ± 19,23		
AST [U/l]	188,15 ± 65,5	210,54 ± 42,6	189,18 ± 50,31	196,71 ± 27,93	248,31 ± 76,04	235,29 ± 50,3	202,69 ± 50,25	195,78 ± 35,99		
GLU [mg/dl]	109,6 <sup>ab</sup> ± 14,11	103,8 <sup>a</sup> ± 11,72	110,55 <sup>ab</sup> ± 12,13	103,8 <sup>a</sup> ± 9,16	113,2 <sup>ab</sup> ± 16,69	110,78 <sup>ab</sup> ± 11,8	120,6 <sup>b</sup> ± 8,28	116,2 <sup>ab</sup> ± 7,15		
CHOL [mg/dl]	92,1 ± 14,25 <sup>a</sup>	148,58 ± 33,44 <sup>b</sup>	143,34 ± 28,55 <sup>b</sup>	135,23 ± 17,74 <sup>b</sup>	150,61 ± 21,65 <sup>b</sup>	130,36 ± 27,83 <sup>b</sup>	149,66 ± 16,74 <sup>b</sup>	118,94 ± 16,69 <sup>ab</sup>		
TG [mg/dl]	77,37 <sup>a</sup> ± 10,88	108,58 <sup>abc</sup> ± 35,98	115,06 <sup>bc</sup> ± 39,8	93,28 <sup>abc</sup> ± 25,67	109,58 <sup>abc</sup> ± 30,87	70,88 <sup>a</sup> ± 21	121,59 <sup>c</sup> ± 22,86	79,31 <sup>ab</sup> ± 18,51		
LDL [mg/dl]	8,24 <sup>a</sup> ± 2,72	23,79 <sup>b</sup> ± 6,35	25,64 <sup>b</sup> ± 7,52	25,12 <sup>b</sup> ± 8,32	24,99 <sup>b</sup> ± 6,6	24,71 <sup>b</sup> ± 7,1	25,01 <sup>b</sup> ± 5,58	21,24 <sup>b</sup> ± 6,52		
HDL [mg/dl]	85,03 <sup>a</sup> ± 11,23	124,31 <sup>b</sup> ± 24,53	119,1 <sup>b</sup> ± 20,02	117,48 <sup>b</sup> ± 15,05	124,47 <sup>b</sup> ± 15,33	109,35 <sup>ab</sup> ± 22,94	128,01 <sup>b</sup> ± 14,41	106,89 <sup>ab</sup> ± 19,64		

Objaśnienia / Explanatory notes:

ALT – aminotransferaza alaninowa / alanine aminotransferase; AST – aminotransferaza asparaginianowa / aspartate aminotransferase; GLU – glukoza / glucose; CHOL – cholesterol całkowity / total cholesterol; TG – triacyloglicerole / triglycerides; LDL – lipoproteina o małej gęstości / low-density lipoprotein; HDL – lipoproteina o dużej gęstości / high-density lipoprotein.

Pozostałe objaśnienia jak pod tab. 1. / Other explanatory notes as in Tab. 1.

Jak wspomniano wyżej, miąższ dyni zawiera dużo karotenoidów, których odpowiednie spożycie wpływa na stan zdrowotny wątroby. Karotenoidy stymulują wytwarzanie witaminy A, prowadzące do poprawy sygnalizacji retinoidowej, wpływają pozytywnie na stan antyoksydacyjny oraz wytwarzają metabolity karotenoidów stymulujące szlaki sygnałowe.[13] Sugiura i wsp. [43] zaobserwowali w badaniu kohortowym, że stężenie karotenoidów w surowicy ( $\beta$ -kryptoksantyny oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -karotenu) jest odwrotnie proporcjonalne do ryzyka wystąpienia podwyższonego stężenia ALT w surowicy, co zostało potwierdzone w niniejszych badaniach. Inulina zawarta we wzbogaconej dyni również ma korzystny wpływ na wątrobę – hamuje stan zapalny [1, 7], jak również obniża stężenie enzymów wątrobowych [42].

Stężenie glukozy we krwi szczurów w grupach żywionych z dodatkiem alendronianu potasu nie różniło się statystycznie istotnie od wartości tego parametru w grupie kontrolnej. W badaniach na myszach zaobserwowano podobny efekt [11], natomiast w badaniach z udziałem ludzi wykazano, że alendronian stosowany u kobiet w okresie menopauzy obniża poziom glukozy, a tym samym chroni przed cukrzycą typu 2 [10, 25] bądź nie ma istotnego wpływu na glikemię [40]. Wyniki otrzymane w badaniach własnych oraz w innych pracach wskazują na potrzebę wyjaśnienia mechanizmu, który jest odpowiedzialny za wpływ alendronianu na gospodarkę węglowodanową.

Otyłość androidalna związana jest ze zwiększonym ryzykiem nadciśnienia tętniczego, opornością na insulinę, stłuszczeniem wątroby, a także dyslipidemią [21]. W niniejszych badaniach we krwi szczurów po owariektomii zaobserwowano wzrost stężenia triacylogliceroli (TG). Podobnie u kobiet po menopauzie obserwuje się wzrost stężenia TG oraz ogólne pogorszenie profilu lipidowego [5]. Stężenie TG we krwi szczurów w grupach karmionych dietą ze wzbogaconą dynią charakteryzowało się porównywalnymi wartościami z grupą kontrolną. Najniższe stężenie triacylogliceroli wykazano w grupie OVXPCaL. Grupa ta cechowała się także najmniejszą zawartością tkanki tłuszczowej. Badania wskazują na związek tkanki tłuszczowej ze stężeniem triacylogliceroli we krwi. Sajuthi i wsp. [39] uważają, że genetyczna regulacja transkrypcji w tkance tłuszczowej prowadzi do wzrostu stężenia triacylogliceroli we krwi. Wraz ze wzrostem zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie rośnie również ekspresja markerów makrofagowych, co prowadzi do dyslipidemii niezależnie od otyłości [3].

Owariektomia wpłynęła na wzrost stężenia cholesterolu całkowitego we krwi szczurów, a spożywanie dyni z wapniem i alendronianem widocznie hamowało wzrost wartości tego parametru, choć nie zaobserwowano istotnych zmian między grupami. Podobne zależności obserwowano w przypadku cholesterolu frakcji LDL i HDL. Wyniki badań dotyczących związku gospodarki wapnia z profilem lipidowym są sprzeczne. Cho i wsp. [12], He i wsp. [20] oraz Yao i wsp. [47] wskazują na dodatnią korelację stężenia wapnia w surowicy krwi z zawartością cholesterolu całkowitego



i triacylogliceroli oraz ujemną – z cholesterolem frakcji LDL. Natomiast Wu i wsp. [46] nie wykazali takich zależności. Ghahremanloo i wsp. [19] w 2017 r. zaobserwowali, że ekstrakt z miąższu dyni ma istotny wpływ na gospodarkę lipidową, a jego spożycie zmniejsza stężenie triacylogliceroli i cholesterolu frakcji LDL, a także zwiększa stężenie cholesterolu HDL. Związkami bioaktywnymi dyni, które prawdopodobnie są odpowiedzialne za poprawę profilu lipidowego są trigonellina i kwas nikotynowy. Song i wsp. [41] odnotowali, że zastosowanie mieszanki polisacharydów pochodzących z dyni skutecznie normowało stężenie lipidów w surowicy myszy karmionych dietą wysokotłuszczową. Także inulina zawarta we wzbożonej dyni jest związkiem, którego spożycie wpływa pozytywnie na profil lipidowy. Spożycie inuliny prowadzi do wzrostu produkcji SCFA, zwiększenia wydalania cholesterolu i soli żółciowych z kałem oraz zmniejszenia syntezy lipidów *de novo* poprzez hamowanie ekspresji genów enzymów wątrobowych [30, 31, 38]. Przedstawione wyżej mechanizmy mogły mieć związek z wynikami uzyskanymi w badaniach własnych, które wskazują na korzystne działanie wzbożonej dyni na stężenie lipidów w surowicy szczurów.

### Wnioski

1. Wykazano, że dieta z dodatkiem dyni wzbożonej w mleczan wapnia wpływała na obniżenie stężenia triacylogliceroli i aminotransferazy alaninowej we krwi szczurów poddanych owariektomii.
2. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że dynia wzbożona w mleczan wapnia metodą odwadniania osmotycznego jest składnikiem diety odpowiednim do tego, aby poprawić parametry lipidowe i normalizować parametry funkcji wątroby w warunkach symulujących stan menopauzy u szczurów.
3. Konieczne jest przeprowadzenie badań klinicznych z udziałem ludzi w celu potwierdzenia wyników uzyskanych w badaniach *in vivo*.

*Badanie zostało sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki numer grantu: 2018/29/B/NZ9/00461].*

### Literatura

- [1] Abhari K., Saadati S., Yari Z., Hosseini H., Hedayati M., Abhari S., Alavian S.M., Hekmatdoost A.: The effects of *Bacillus coagulans* supplementation in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized, placebo-controlled, clinical trial. Clin. Nutr. ESPEN, 2020, 39, 53-60.
- [2] Abrams S.A., Hawthorne K.M., Aliu O., Hicks P.D., Chen Z., Griffin I.J.: An inulin-type fructan enhances calcium absorption primarily via an effect on colonic absorption in humans. J. Nutr., 2007, 137, 2208-2212.
- [3] Ahlin S., Sjöholm K., Jacobson P., Andersson-Assarsson J.C., Walley A., Tordjman J., Poitou C., Prifti E., Jansson P.A., Borén J., Sjöström L., Froguel P., Bergman R.N., Carlsson L.M.S., Olsson

- B., Svensson P.A.: Macrophage gene expression in adipose tissue is associated with insulin sensitivity and serum lipid levels independent of obesity. *Obesity*, 2013, 21 (12), E571-E576.
- [4] Ambikairajah A., Walsh E., Cherbuin N.: Lipid profile differences during menopause: A review with meta-analysis. *Menopause*, 2019, 26, 1327-1333.
- [5] Ambikairajah A., Walsh E., Tabatabaei-Jafari H., Cherbuin N.: Fat mass changes during menopause: A metaanalysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2019, 221 (5), 393-409.
- [6] Balk E.M., Adam G.P., Langberg V.N., Earley A., Clark P., Ebeling P.R., Mithal A., Rizzoli R., Zerbinì C.A.F., Pierroz D.D., Dawson-Hughes B.: Global dietary calcium intake among adults: A systematic review. *Osteoporos Int.*, 2017, 28, 3315-3324.
- [7] Bao T., He F., Zhang X., Zhu L., Wang Z., Lu H., Wang T., Li Y., Yang S., Wang H.: Inulin exerts beneficial effects on non-alcoholic fatty liver disease via modulating gut microbiome and suppressing the lipopolysaccharide-toll-like receptor 4-M $\psi$ -Nuclear factor- $\kappa$ B-nod-like receptor protein 3 pathway via gut-liver axis in mice. *Front Pharmacol.*, 2020, 11, #558525.
- [8] Bonnick S., Broy S., Kaiser F., Teutsch C., Rosenberg E., DeLucca P., Melton M.: Treatment with alendronate plus calcium, alendronate alone, or calcium alone for postmenopausal low bone mineral density. *Curr. Med. Res. Opin.*, 23, 1341-1349.
- [9] Burri B.J., La Frano M.R., Zhu C.: Absorption, metabolism, and functions of  $\beta$ -cryptoxanthin. *Nutr. Rev.*, 2016, 74, 69-82.
- [10] Chan D.C., Yang R.S., Ho C.H., Tsai Y.S., Wang J.J., Tsai K.T.: The use of alendronate is associated with a decreased incidence of type 2 diabetes mellitus – A population-based cohort study in Taiwan. *PLoS One*, 2015, 10 (4), #0123279.
- [11] Chen S.-Y., Yu H.-T., Kao J.-P., Yang C.-C., Chiang S.-S., Mishchuk D.O., Mau J.-L., Slupsky C.M.: An NMR metabolomic study on the effect of alendronate in ovariectomized mice. *PLoS One*, 2014, 9, #106559.
- [12] Cho G.J., Shin J.H., Yi K.W., Park H.T., Kim T., Hur J.Y., Kim S.H.: Serum calcium level is associated with metabolic syndrome in elderly women. *Maturitas*, 2011, 68, 382-386.
- [13] Clugston R.D.: Carotenoids and fatty liver disease: Current knowledge and research gaps. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell. Biol. Lipids*, 2020, 1865, #158597.
- [14] Costa G., Vasconcelos Q., Abreu G., Albuquerque A., Vilarejo J., Aragão G.: Changes in nutrient absorption in children and adolescents caused by fructans, especially fructooligosaccharides and inulin. *Arch. Pediatr.*, 2020, 27, 166-169.
- [15] El-Zeftawy M., Ali S.A.E.M., Salah S., Hafez H.S.: The functional nutritional and regulatory activities of calcium supplementation from eggshell for obesity disorders management. *J. Food Biochem.*, 2020, 44 (8), #13313.
- [16] Funcke J.B., Scherer P.E.: Beyond adiponectin and leptin: Adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. *J. Lipid Res.*, 2019, 60, 1648-1697.
- [17] Gallagher C., Tella S.: Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2014, 142, 155-170.
- [18] Ganesan G., Vijayaraghavan P.: Urinary N-telopeptide: The new diagnostic test for osteoporosis. *Surg. J.*, 2019, 5 (1), e1-e4.
- [19] Ghahremanloo A., Hajipour R., Hemmati M., Moossavi M., Mohaqiq Z.: The beneficial effects of pumpkin extract on atherogenic lipid, insulin resistance and oxidative stress status in high-fat diet-induced obese rats. *J. Complement. Integr. Med.*, 2017, 15 (2), #20170051.
- [20] He L., Qian Y., Ren X., Jin Y., Chang W., Li J., Chen Y., Song X., Tang H., Ding L., Guo D., Yao Y.: Total serum calcium level may have adverse effects on serum cholesterol and triglycerides among female university faculty and staffs. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2014, 157, 191-194.
- [21] Hodson L., Banerjee R., Rial B., Arlt W., Adiels M., Boren J., Marinou K., Fisher C., Mostad I.L., Stratton I.M., Barrett P.H.R., Chan D.C., Watts G.F., Harnden K., Karpe F., Fielding B.A.:

- Menopausal status and abdominal obesity are significant determinants of hepatic lipid metabolism in women. *J. Am. Heart Assoc.*, 2015, 4 (10), #002258.
- [22] Huang T.-H., Mühlbauer R.C., Tang C.-H., Chen H.-I., Chang G.-L., Huang Y.-W., Lai Y.-T., Lin H.-S., Yang W.-T., Yang R.-S.: Onion decreases the ovariectomy-induced osteopenia in young adult rats. *Bone*, 2008, 42, 1154-1163.
- [23] Jung S.R., Kim S.H., Ahn N.Y., Kim K.J.: Changes of bone metabolism based on the different interventions with exercise type or additional intake material in ovariectomized rats. *J. Exerc. Nutr. Biochem.*, 2014, 18, 111-117.
- [24] Jürimäe J., Mäestu E., Mengel E., Rimmel L., Purge P., Tillmann V.: Association between dietary calcium intake and adiposity in male adolescents. *Nutrients*, 2019, 11 (7), #1454.
- [25] Karimi Fard M., Aminorroaya A., Kachuei A., Salamat M.R., Hadi Alijanvand M., Aminorroaya Yamini S., Karimifar M., Feizi A., Amini M.: Alendronate improves fasting plasma glucose and insulin sensitivity, and decreases insulin resistance in prediabetic osteopenic postmenopausal women: A randomized triple-blind clinical trial. *J. Diabetes Investig.*, 2019, 10, 731-737.
- [26] Ko Y.-J., Wu J.-B., Ho H.-Y., Lin W.-C.: Antiosteoporotic activity of *Davallia formosana*. *J. Ethnopharmacol.*, 2012, 139, 558-565.
- [27] Krupa-Kozak U., Świątecka D., Bączek N., Brzóska M.M.: Inulin and fructooligosaccharide affect: *In vitro* calcium uptake and absorption from calcium-enriched gluten-free bread. *Food Funct.*, 2016, 7, 1950-1958.
- [28] Kulczyński B., Suliburska J., Rybarczyk M., Gramza-Michałowska A.: The effect of osmotic dehydration conditions on the calcium content in plant matrices. *Food Chem.*, 2021, 343, #128519.
- [29] Lee M.Y., Kim H.Y., Singh D., Yeo S.H., Baek S.Y., Park Y.K., Lee C.H.: Metabolite profiling reveals the effect of dietary *Rubus coreanus* vinegar on ovariectomy-induced osteoporosis in a rat model. *Molecules*, 2016, 21 (2), #149.
- [30] Li L., Li P., Xu L.: Assessing the effects of inulin-type fructan intake on body weight, blood glucose, and lipid profile: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Sci. Nutr.*, 2021, 9, 4598-4616.
- [31] Liu F., Prabhakar M., Ju J., Long H., Zhou H.-W.: Effect of inulin-type fructans on blood lipid profile and glucose level: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2017, 71, 9-20.
- [32] Lizcano F., Guzmán G.: Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause. *Biomed. Res. Int.*, 2014, #757461.
- [33] Manolagas S.C.: From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr. Rev.*, 2010, 31, 266-300.
- [34] Monteleone P., Mascagni G., Giannini A., Genazzani A.R., Simoncini T.: Symptoms of menopause – Global prevalence, physiology and implications. *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2018, 14, 199-215.
- [35] Rani V., Deep G., Singh R.K., Palle K., Yadav U.C.S.: Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.*, 2016, 148, 183-193.
- [36] Raschka L., Daniel H.: Mechanisms underlying the effects of inulin-type fructans on calcium absorption in the large intestine of rats. *Bone*, 2005, 37, 728-735.
- [37] Reeves P.G., Suppl M.: Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet 1, 2. *Exp. Biol.*, 1997, 127, 838-841.
- [38] Reis S.A., Conceição L.L., Rosa D.D., Dias M.M., Peluzio M.: Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile. *Nutr. Hosp.*, 2014, 31, 528-534.
- [39] Sajuthi S.P., Sharma N.K., Comeau M.E., Chou J.W., Bowden D.W., Freedman B.I., Langefeld C.D., Parks J.S., Das S.K.: Genetic regulation of adipose tissue transcript expression is involved in modulating serum triglyceride and HDL-cholesterol. *Gene*, 2017, 632, 50-58.

- [40] Schwartz A.V., Schafer A.L., Grey A., Vittinghoff E., Palermo L., Lui L.-Y.L., Wallace R.B., Cummings S.R., Black D.M., Bauer D.C., Reid I.R.: Effects of antiresorptive therapies on glucose metabolism: Results from the FIT, HORIZON-PFT, and FREEDOM trials. *J. Bone Miner. Res.*, 2013, 28, 1348-1354.
- [41] Song H., Sun Z.: Hypolipidaemic and hypoglycaemic properties of pumpkin polysaccharides. *3 Biotech.*, 2017, 7, #159.
- [42] Stachowska E., Portincasa P., Jamiol-Milc D., Maciejewska-Markiewicz D., Skonieczna-Żydecka K.: The relationship between prebiotic supplementation and anthropometric and biochemical parameters in patients with nafld – a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients*, 2020, 12 (11), #3460.
- [43] Sugiura M., Nakamura M., Ogawa K., Ikoma Y., Yano M.: High serum carotenoids are associated with lower risk for developing elevated serum alanine aminotransferase among Japanese subjects: The Mikkabi cohort study. *Br. J. Nutr.*, 2016, 115, 1462-1469.
- [44] Takahashi T.A., Johnson K.M.: Menopause. *Med. Clin. North Am.*, 2015, 99, 521-534.
- [45] Wawrzyniak N., Suliburska J.: Nutritional and health factors affecting the bioavailability of calcium: A narrative review. *Nutr. Rev.*, 2021, 79 (12), 1307-1320.
- [46] Wu F., Pahkala K., Juonala M., Rovio S.P., Sabin M.A., Rönnemaa T., Smith K.J., Jula A., Lehtimäki T., Hutri-Kähönen N., Kähönen M., Laitinen T., Viikari J.S.A., Raitakari O.T., Magnussen C.G.: Childhood and long-term dietary calcium intake and adult cardiovascular risk in a population with high calcium intake. *Clin. Nutr.*, 2021, 40, 1926-1931.
- [47] Yao Y., He L., Jin Y., Chen Y., Tang H., Song X., Ding L., Qi Q., Huang Z., Wang Q., Yu J.: The relationship between serum calcium level, blood lipids, and blood pressure in hypertensive and normotensive subjects who come from a Normal University in East of China. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2013, 153, 35-40.

#### **EFFECT OF CALCIUM-ENRICHED PUMPKIN ON SELECTED BIOCHEMICAL BLOOD PARAMETERS IN RATS AFTER OVARIETOMY**

##### **S u m m a r y**

Calcium deficiency has been often noted in the diet of women, therefore it is important to search for new sources of this essential mineral. One of the innovative products is a calcium-enriched pumpkin. Supplying the body with easily assimilable calcium may have a decreasing effect on the symptoms associated with menopause.

The objective of the research study was to determine the effect of calcium lactate-enriched, osmotically dehydrated pumpkin used to feed the ovariectomised rats on the changes in biochemical parameters of their blood. The research study was conducted on the 12-week-old female Wistar rats. The animals were divided into 8 groups (n = 10), 7 of which had ovariectomy. The rats were fed a standard diet that was modified depending on the group: 1) control K(-) – a standard diet (not modified), 2) control K(+) of ovariectomised rats – a standard diet (not modified), 3) OVXDEF – a calcium-deficient diet, 4) OVXP – a not enriched pumpkin diet, 5) OVXCaL – a calcium lactate diet, 6) OVXPCaL – a calcium lactate-enriched pumpkin diet, 7) OVXCaLA – a calcium lactate diet with potassium alendronate added, 8) OVXPCaLA – a calcium-enriched pumpkin diet with alendronate added. 12 weeks after the intervention, an analysis of the bodies of rats was performed; next, the animals were decapitated and their blood was drawn for analysis. In the blood serum there were determined: the lipid profile, ALT and AST aminotransferases and glucose. It was proved that the ovariectomy significantly impacted the increase in the body-

weight of rats, fat content, ALT level and it adversely impacted the lipid profile. Furthermore, it was reported that the calcium-enriched pumpkin significantly reduced the levels of alanine aminotransferase and triglycerides in the blood of rats after ovariectomy. The overall conclusion is that the calcium lactate-enriched pumpkin normalises the parameters of liver function and the lipid parameters in rats after ovarian removal surgery.

**Key words:** enriched pumpkin, calcium, ovariectomy, lipid profile, transaminases ☒