

OVEREKTOMİZE RATLARDA KEMİK DAYANIKLILIĞI ÜZERİNE D VİTAMİNİ, OMEGA-3 VE EGZERSİZİN ETKİSİ

THE EFFECT OF VITAMIN D, OMEGA-3 AND EXERCISE ON BONE RESISTANCE IN OVERECTOMIZED RATS

Gülnur TAŞÇI BOZBAŞ, MD¹, Figen Sevil KİLİMCİ, MD², Hale UYAR HAZAR, MD³,
Fatih HAZAR, MD⁴, Gülcan GÜRER, MD¹, Buket DEMİRCİ, MD⁵

¹Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon AD.; Aydın - Türkiye

²Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Anatomi AD.; Aydın - Türkiye

³Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksekokulu; Aydın - Türkiye

⁴Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Beden Eğitimi ve Spor Yüksekokulu; Aydın - Türkiye

⁵Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Klinik Farmakoloji AD; Aydın - Türkiye

Özet

Giriş: Osteoporoz, düşük kemik kütlesi ve bozulmuş kemik mikromimarisi ile karakterize kronik bir hastalıktır. Osteoporozun kırık riskinde meydana getirdiği artışa bağlı olarak morbidite ve mortalite riskinde artış ve yaşam kalitesinde bozukluk meydana gelmektedir.

Materyal-metod: Çalışmada 35 adet dişi Wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlar 5 gruba ayrılarak 4 grup overektomize edildi ve bir gruba sham cerrahi uygulandı. Cerrahi sonrası 12 hafta boyunca gruplardan birine vitamin D (1000 IU/kg/hafta), birine omega-3 (ω -3) (0,8 mL/kg/hafta) verildi. Bir gruba ise haftada 3 gün 45 dakika egzersiz (treadmill) programı uygulandı. 12 haftalık tedavi sonrası sıçanlar sakrifiye edilerek sağ femurlar 3-D bending testi için çıkarıldı.

Sonuçlar: D vitamini ve egzersiz gruplarında biyomekanik parametrelerindeki değişiklik menapoz grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Omega-3 grubunda kemik dayanıklılık parametrelerinde anlamlı değişiklik saptanmadı ($p > 0.05$).

Tartışma: Postmenapozal osteoporozda kemik dayanıklılığını artırmada D vitamini ve egzersiz oldukça etkili olmasına karşılık, omega-3'ün herhangi bir etkisi bulunamamıştır.

Anahtar kelimeler: Postmenapozal osteoporoz, D vitamini, egzersiz, omega-3.

Abstract

Introduction: Osteoporosis is a chronic disease characterized by low bone mass and impaired bone microarchitecture. Increased morbidity and mortality risk and decreased quality of life due to increased risk of osteoporosis fracture. In this study, we aimed to investigate the effectiveness of vitamin D, exercises and omega-3 in overectomized rats.

Material-method: In this study, 35 female Wistar rats were used. These rats were divided into 5 groups. Four of 5 groups were overectomized and one group underwent sham surgery. One group received vitamin D (1000 IU / kg / week) and one omega-3 (ω -3) (0.8 mL / kg / week) for 12 weeks postoperatively. One group received a treadmill program of 45 minutes 3 days a week. After 12 weeks of treatment, rats were sacrificed and right femurs of rats were separated for 3-D bending testing.

Results: Biomechanical parameters were significantly significant in vitamin D and exercise groups compared to menopause group ($p < 0.05$). There was no significant change in bone endurance parameters in the omega-3 group ($p > 0.05$).

Discussion: Although vitamin D and exercise were highly effective in increasing bone endurance in postmenopausal osteoporosis, omega-3 was not effective enough.

Key words: Postmenopausal osteoporosis, vitamin D, exercises, omega-3.

* Yazışma Adresi (Adress for Correspondance):

Gülnur Taşçı Bozbaş, MD

Aydın Adnan Menderes Üniversitesi,

Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı

Aydın - Türkiye

Tel: 0505 831 32 24

e-mail: gulnurtb@yahoo.com

Giriş

Osteoporoz, düşük kemik kütlesi ve bozulmuş kemik mikromimarisi ile karakterize kronik bir hastalıktır. Osteoporozun kırık riskinde meydana getirdiği artışa bağlı olarak morbidite ve mortalite riskinde artış ve yaşam kalitesinde azalma meydana gelmektedir (1,2). Osteoporoz tedavisinin temel amacı hastayı kırıklardan korumak ve böylelikle yaşam kalitesini yükseltmektir.

Menapoz sonrası kadınlarda hormonal değişikliklere bağlı olarak kemik remodelingi artmakta ve kemik kütlesinde keskin bir düşüş ortaya çıkmaktadır (1,3). Dişi sıçanlara yapılan overektomi ile endojen östrojen konsantrasyonlarında belirgin bir azalma meydana gelmekte, daha sonra kemik kaybını arttıran negatif bir kemik yeniden şekillenme dengesi ortaya çıkmaktadır (4). Hayvan modelinde overektominin neden olduğu kemik kaybı ile kadınlarda postmenopozal osteoporozun patofizyolojisi arasındaki benzerlikler, overektomize (OVX) sıçanların, bu durumun önlenmesinde yardımcı olabilecek ajanların araştırılması için kabul edilmiş bir model olmasını sağlamıştır (5,6).

Kemik dayanıklılığını kemiğin boyutu, şekli ve içeriği belirlemektedir. Kemiğin bu özelliklerini ve bunların birbiriyle olan etkisini açıklamada kemik kalitesi terimi kullanılmaktadır. Kemik kalitesindeki klinik olarak anlamlı bir değişiklik, kemiğin biyomekanik performansını değiştirmektedir. Üç nokta bükme testi gibi kemiğe yönelik biyomekanik testler kemik kalitesinin ve kırık riskinin direkt göstergesidir (7).

Gerek osteoporoz, gerekse osteoporotik kırıkların sıklığının ve bunlara bağlı sağlık giderlerinin giderek artması nedeniyle araştırmalar kemik yoğunluğunu ve kalitesini arttırmaya yönelik non-farmakolojik tedavilere odaklanmıştır. Biz de çalışmamızda postmenopozal osteoporoz modelinde D vitamini, egzersiz, omega-3'ün (ω -3) kemik biyomekanik parametreleri üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Materyal Metod

Çalışmada 4-5 aylık 35 adet dişi Wistar sıçan kullanıldı. Sıçanlar Adnan Menderes Üniversitesi (ADU) Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden temin edildi ve tüm çalışma ADU Hayvan Etik Komitesinin kurallarına uygun olarak yapıldı (HADYEK; 64583101/2014/083). Sıçanlardan rastgele 28 tanesine intraperitoneal ketamin ve xylasine (sırasıyla 50 mg/kg ve 5 mg/kg) anestezisi yapıldı. Göğüs kafesi traş edilip temizlendikten sonra abdomene doğru 1,5 cm'lik insizyon yapıldı ve overler çevre yağ dokusu ile birlikte çıkarıldı. İnsizyon sütüre edilerek sıçanlar yara iyileşmesi için 1 hafta bırakıldı. Daha sonra overektomize edilen sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı. Gruplardan biri tedavisiz bırakıldı (M grubu). 12 hafta boyunca gruplardan birine D vitamini (Dvit grubu- Vit D; 1000 IU/kg/hafta) (Devit-3° oral solüsyon, Deva, İstanbul, Türkiye), birine omega-3 (ω -3 grubu - 0.8 mL/kg/hafta) (Omega-3 "700", EPA/DHA: 360/240 Solgar Holdings Inc., NJ, USA) verildi (8-11). Diğer bir gruba ise haftada 3 gün 45



Şekil 1 | Treatmilde egzersiz düzeneği.

dakika treadmillde egzersiz yaptırıldı (Egz grubu) (Resim 1). İlk ayrılan 7 sıçana menopoz modelimizin gerçekleşip gerçekleşmediği gösterebilmek için sadece abdominal insizyon yapılarak kapatıldı (K grubu).

12 haftalık tedavi sonrasında ketamin (50 mg/kg) ve ksiazin (5 mg/kg) anestezisi altında sıçanlar sakrifiye edildi. Sıçanların sağ femurları periostlarına zarar verilmeden çıkarılarak serum fizyolojik ile ıslatılmış gazlı bezlere sarıldı ve -25°C'de derin dondurucuda muhafaza edildi. Mekanik test öncesi oda sıcaklığında çözdürüldü (12,13). Üç nokta bükme testi, Adnan Menderes Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (ADÜ-TARBİYOMER) bulunan Zwick-Roell cihazı kullanılarak yapıldı (Resim 2). Üç nokta bükme testi için kemikler cihaz üzerine, her bir kemik için ayrı ayrı belirlenen mesnet aralığında ve kaudo-kranial yönde yük uygulanacak şekilde yerleştirildi (14). Sonrasında 2 N ön yükleme ile 2 mm/dakika



Şekil 2 | Üç nokta bükme testi için kullanılan Zwick-Roell cihazı.

hızında kemik kırılıncaya kadar yükleme yapıldı. Test öncesi kemiklerin uzunlukları ve mekanik test sonrasında kraniokaudal, medio-lateral endosteal ve periosteal çap ölçümleri yapıldı. Ölçülen bu çaplar kullanılarak atalet momenti (I_{max}) değeri hesaplandı (13,15). Kemik kırıldıktan sonra maksimum kırılma kuvveti kuvvet- deformasyon eğrisinden elde edildi. Bu eğri kullanılarak maksimum kuvvet (F_{max}), ve katılık değerleri hesaplandı (15,16). Elastik modulus (EM) değeri hesaplandı. Biyomekanik ölçüm sonucunda mediolateral ve kraniokaudal kortikal kalınlık (sırasıyla K_{ML} ve K_{KK}), F_{max} , I_{max} , EM ve sertlik değerleri kemik dayanıklılığını değerlendirmede kullanıldı (12).

Sonuçlar

Sıçanların ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel farklılık yoktu ($p>0.05$). M grubunda K_{kk} , EM ve sertlik değerleri K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p<0.05$). Tedavi uygulanan gruplardaki biyomekanik parametreler incelendiğinde; D vit grubunda M grubuna göre K_{ML} , K_{KK} , I_{max} , EM ve sertlik değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p<0.05$). Egz grubu ise M grubu ile karşılaştırıldığında K_{ML} , K_{KK} , EM ve sertlik parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı anlamlı değişiklik gözlemlendi ($p<0.05$). $\omega-3$ grubunda ise kemik biyomekanik parametrelerinin hiçbirinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 1).

Tartışma

Kadınlarda östrojen 1,25 dihidroksivitamin D sentezini uyarak barsaklardan kalsiyum emilimini artırır, parathormonun kemikler üzerindeki rezorbtif etkisini modüle eder ve kalsitonin sentezini artırır (17). Menapozla birlikte ortaya çıkan östrojen düzeyindeki düşüşe bağlı olarak kemik kaybının ortaya çıktığı düşünülmektedir. Çalışmamızda da OVX ratlarda kemik kalitesinin sağlıklı ratlara göre azaldığını saptadık. Bu sonuçlar Çömelekoğlu ve arkadaşlarının belirttiği parametreler ile benzer olup, postmenapozal osteoporoz modelimizde kemik kırık riskinde artışın ortaya çıktığını göstermektedir (18).

Tablo 1 | Kemiğin biyomekanik parametrelerindeki değişiklikler (K_{ML} : Mediolateral kortikal kalınlık; K_{KK} : Kraniokaudal kortikal kalınlık; F_{max} : Maksimum kuvvet; I_{max} : Atalet momenti; EM : Elastik modulus).

	Kontrol grubu	Menapoz grubu	Dvitamini grubu	Egzersiz grubu	Omega-3 grubu
K_{ML}	0.8±0.1	0.8±0.1	0.9±0.1*	0.9±0.2*	0.8±0.2
K_{KK}	0.8±0.1	0.7 ±0.1a	0.8±0.1*	0.9±0.1*	0.7±0.1
F_{max}	113.5±11.8	104.7±11.3	110.7±7.9	110.5±5.1	110.1±6.1
I_{max}	5.37±0.7	5.9±1.1	8.0±1.4*	6.7±1.06	6.3±1.4
EM	4.1±1.0	2.86±0.9 ^a	2.9±0.4*	3.84±0.5*	3.7±1.4
Sertlik	197.7±40.9	130.7±32.5 ^a	175.6±13.1*	181.7±16.2*	165.2±28.8

^a kontrol grubuna göre $p<0.05$

* menopoz grubuna göre $p<0.05$

Postmenapozal dönemde kemik rezorpsiyonu artarak kan kalsiyumu yükselmekte, kalsiyum düzeyindeki artışa bağlı olarak parathormon sentezi baskılanmakta ve böylece 1,25 dihidroksivitamin D sentezi azalmaktadır. Serum D vitamini düzeyleri düşeceği için kalsiyum emilimi bozularak kalsiyum dengesi daha da bozulmaktadır (17). D vitamini suplementasyonunun postmenapozal osteoporozda kırık riski üzerine etkisine dair farklı görüşler mevcuttur. Lips ve ark.'ları D vitamini kırık üzerine etkisinin değerlendirildiği 14 randomize kontrollü çalışmayı incelediklerinde, 8 çalışmada kırık riskine etkisinin görülmediğini, 4 çalışmada kırık riskinin azaldığını ve iki çalışmada sınırdaki etki elde edildiğini gözlemişler (19). Cranney ve ark.'ları 13 randomize kontrollü çalışmayı incelediklerinde; 300-800 IU/gün D vitamini kırık gelişimini azaltmadığını saptamışlar (d2) (20). Bizim çalışmamızda ise 12 hafta boyunca 1000 IU/kg/hafta dozunda D vitamini uygulamasının kemiğin biyomekanik parametrelerinde düzelme sağladığını ve kemik dayanıklılığını artırarak kırık riskini azalttığını saptadık.

Kemiklere mekanik yüklenme sağlayan egzersizlerin kemikte osteosit apoptozisinin azalmasını ve osteoblast farklılaşmasının uyarılmasını sağlayarak kemik matriksinin korunmasını sağladığı bilinmektedir (21). Bu durum özellikle puberte döneminde erişkin doruk kemik kütlelerine ulaşıldığı için ergenlikte maksimum kemik kütlelerinin elde edilmesi açısından çok önemlidir (21). Genç yaşlarda yapılan düzenli sporun ileri yaşlarda femur boynu fraktür riskini azaltıyor olması, erken yaşlarda yapılan aktivitelerin önemini göstermektedir (22). Egzersizin postmenopozal kadınlarda kemik yapısında gözlenen doğal değişikliklere karşı koyabildiği ve özellikle darbe etkili egzersizlerin kemik kaybını azalttığı düşünülmektedir (23). 50-70 yaş arası 2224 kadının değerlendirildiği, 22 randomize kontrollü çalışmanın dahil edildiği bir derlemede, yüklenmeli egzersizlerin kemik kütlelerine olumlu etki ettiği ve kemik mikromimarisini düzelttiği belirtilmiştir (Hamilton) (24). Cheng ve Uusi-Rasi çalışmalarında postmenapozal kadınlarda egzersizin kemik dayanıklılığına etki etmediğini saptamışlar (25,26). Ancak bu çalışmalar incelendiğinde hastaların yaş ortalamalarının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamızda D vitamini postmenopozal sıçanlarda kemik dayanıklılığını artırarak kırık riskini azalttığını saptadık. Özellikle femurun kortikal kalınlıklarında belirgin artış mevcuttu. Önceki çalışmalarda da postmenapozal dönemde egzersize bağlı kemik gücündeki iyileşmenin kemik boyutundaki bir artıştan ziyade endokortikal kemik kaybındaki azalmadan ve kortikal kalınlıktaki artıştan kaynaklandığı belirtilmiştir (27).

Omega-3'ün kemikler üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir (28-30). Lukas ve ark.'ları $\omega-3$ 'den zengin beslenen sıçanların femur kemik mineral içeriğinde ve kortikal kemik mikromimarisinde değişiklik olmadığını belirtmişlerdir (31). Krüger ve ark.'ları da bizim sonuçlarımıza benzer şekilde $\omega-3$ 'den zengin bes-

lenen sıçanların femurlarının 3 nokta bükme testindeki biyomekanik parametrelerinde anlamlı değişiklik olmadığını saptamışlardır (32). Sun ve ark.'ları ise sıçanlara ovariektomize edilmeden önce ω -3 verilmesinin menapozun neden olduğu kemik kaybını azalttığını belirtmişlerdir (33). Bu nedenle ω -3'ün büyüme aşamasında kullanılmasının kemik sağlığı geliştirmek için daha etkili olabileceğini belirtmişlerdir (31). Bizim çalışmamızın aksine ω -3'ün postmenapozal kemik kaybını ve kırık riskini azalttığını iddia eden yayınlar da mevcuttur (34-36). Bu etki osteoklast membran fosfolipidlerinin oksidasyonuna neden olarak kemik rezorbtif PGE2 sentezini azaltmasına ve proinflatuvar sitokinleri baskılayarak, en bilinen anti-inflatuvar sitokin olan IL-10 salınımında belirgin artışa neden olmasına bağlanmıştır (31).

Sonuç olarak çalışmamızda, postmenapozal osteoporozda D vitamini ve egzersizin kemik dayanıklılığını artırdığını saptadık. Ancak ω -3'ün etkinliğini değerlendirmek için farklı doz ve sürelerde kullanımının etkilerinin araştırıldığı yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- Shen D, Zhang X, Li Z, Bai H, Chen L. Effects of omega-3 fatty acids on bone turnover markers in postmenopausal women: systematic review and meta-analysis. *Climacteric*. 2017;20(6):522-7
- Selçuk E, Tetik BK, Sönmez B, Tekindal M. Assessment of the knowledge, attitudes and behaviours of postmenopausal women about osteoporosis. *Ankara Medical Journal*. 2015;15(3): 2-4
- Watkins BA, Li Y, Seifert MF. Dietary ratio of n-6/n-3 PUFAs and docosahexaenoic acid: actions on bone mineral and serum biomarkers in ovariectomized rats. *J Nutr Biochem*. 2006;17(4):282-9.
- Wronski TJ, Cintron M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1988;43:179-83.
- Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991;15:175-91
- Barlet JP, Coxam V, Davicco MJ, Gaumet N. Animal models of postmenopausal osteoporosis. *Reprod Nutr Dev* 1994;34:221-36.
- Hernandez CJ, Keaveny TM. A biomechanical perspective on bone quality. *Bone* 2006;39:1173-81.
- Alfawaz HA, Bhat RS, Al-Ayadhi L, El-Ansary AK. Protective and restorative potency of Vitamin D on persistent biochemical autistic features induced in propionic acid-intoxicated rat pups. *BMC Complement Altern Med*. 2014; 25(14):416
- Li W, Wang QL, Liu X, Dong SH, Li HX, Li CY, et al. Combined use of vitamin D3 and metformin exhibits synergistic chemopreventive effects on colorectal neoplasia in rats and mice. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2015; 8(2):139-48
- Lluís L, Taltavull N, Muñoz-Cortés M, Sánchez-Martos V, Romeu M, Giralt M, et al. Protective effect of the omega-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic acid/Docosahexaenoic acid 1:1 ratio on cardiovascular disease risk markers in rats. *Lipids in Health and Disease* 2013, 12:140
- Mehta AA, Agrawal AD, Appanna V, Chaudagar KK. Vitamin D improves corticosteroid efficacy and attenuates its side-effects in an animal model of asthma. *Can J Physiol Pharmacol*. 2015; 93(1): 53-61
- Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993;14:595-608
- An YH, Draughon RA. Mechanical Properties and Testing Method of Bone. In: An YH, Friedman RJ, editors. *Animal models in orthopaedic research*. Boca Raton: CRC Press;1999. p. 139-68.
- Saffar KPA, Pour NJ, Rajaai SM. How does the bone shaft geometry affect its bending properties? *Am J Applied Sci* 2009;6:463-70.
- Sevil F, Kara ME. The effects of ovariectomy on bone mineral density, geometrical, and biomechanical characteristics in the rabbit femur. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2010;23:31-6.
- Hirano T, Burr DB, Turner CH, Sato M, Cain RL, Hock JM. Anabolic effects of human biosynthetic parathyroid hormone fragment, LY333334, on remodeling and mechanical properties of cortical bone in rabbits. *J Bone Miner Res* 1999;14:536-45.
- Bozbaş GT. Osteoporozda kalsiyum ve D vitamini tedavisi. *Lokomotor*. 2004;8(32):147-51
- Comelekoglu U, Bagis S, Yalin S, Ogenler O, Yildiz A, Sahin NO, et al. Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin Rheumatol*. 2007;26(3):380-4.
- Lips P, Bouillon R, van Schoor NM, Vanderschueren D, Verschueren S, Kuchuk N et al. Reducing fracture risk with calcium and vitamin D. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010 Sep;73(3):277-85.
- Cranney A, Weiler HA, O'Donnell S, Puil L. Summary of evidence-based review on vitamin D efficacy and safety in relation to bone health. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):513-9.
- Atalay E. Osteoporoz ve egzersiz. *Spor hekimliği Dergisi*. 2015;50:139-49
- Joakimsen RM, Magnus JH, Fønnebø V. Physical activity and predisposition for hip fractures: a review. *Osteoporos Int*. 1997;7:503-13.
- Kohrt WM, Bloomfield SA, Little KD, Nelson ME, Yingling VR. American College of Sports Medicine Position Stand: physical activity and bone health. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36:1985-96
- CJ Hamilton, VJ Swan, and SA Jamal. The effects of exercise and physical activity participation on bone mass and geometry in postmenopausal women: a systematic review of pQCT studies. *Database of Abstracts of Reviews of Effects (DARE): Quality-assessed Reviews*
- Cheng S, Sipila S, Taaffe DR, Puolakka J, Suominen H. Change in bone mass distribution induced by hormone replacement therapy and high-impact physical exercise in post-menopausal women. *Bone*. 2002;31:126-35.
- Uusi-Rasi K, Kannus P, Cheng S, Sievanen H, Pasanen M, Heinonen A, et al. Effect of alendronate and exercise on bone and physical performance of postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Bone*. 2003;33:132-43.
- Turner CH, Robling AG. Mechanisms by which exercise improves bone strength. *J Bone Miner Metab*. 2005;23Suppl:16-22.
- Farr JN, Blew RM, Lee VR, Lohman TG, Going SB. Associations of physical activity duration, frequency, and load with volumetric BMD, geometry, and bone strength in young girls. *Osteoporos Int*. 2011;22:1419-30
- Weaver CM, Gordon CM, Janz KF, Kalkwarf HJ, Lappe JM, Lewis R, et al. The National Osteoporosis Foundation's position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations. *Osteoporos Int* 2016;27:1281-386
- Rousseau JH, Kleppinger A, Kenny AM. Self-reported dietary intake of omega-3 fatty acids and association with bone and lower extremity function. *J Am Geriatr Soc* 2019;57:1781-8
- Lukas R, Gigliotti JC, Smith BJ, Altman S, Tou JC. Consumption of different sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids by growing female rats affects long bone mass and microarchitecture. *Bone*. 2011;49(3):455-62.
- Kruger MC, Schollum LM. Is docosahexaenoic acid more effective than eicosapentaenoic acid for increasing calcium bioavailability? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;73:327-34.
- Sun L, Tamaki H, Ishimaru T, Teruya T, Ohta Y, Katsuyama N, et al. Inhibition of osteoporosis due to restricted food intake by the fish oils DHA and EPA and perilla oil in the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68:2613-5.
- Shen CL, Yeh JK, Rasty J, Li Y, Watkins BA. Protective effect of dietary long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on bone loss in gonad-intact middle-aged male rats. *British J Nutr*, 2006; 95: 462-8
- Shen CL, Yeh JK, Rasty J, Chyy MC, Dunn DM, Li Y, et al. Improvement of bone quality in gonad-intact middle-aged male rats by long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid. *Calcif Tis Int*, 2007; 80(4): 286-3
- Watkins BA, Li Y, Seifert MF. Dietary ratio of n-6/n-3 PUFAs and DHA: actions on bone mineral and serum biomarkers in ovariectomized rats. *J Nutr Biochem*, 2006; 17(4): 282-9.