

ABSTRACT

Osteoporosis, a metabolic bone disease, is characterised by low bone mass and disturbed microarchitecture, significantly increasing the risk of fractures. Until recently, it was believed to affect mainly women, especially during their postmenopausal period. Nowadays, it is increasingly diagnosed in men as well. In both women and men, bone tissue atrophy changes are most often caused by reduced gonadal hormone activity, but their nature and course differ. Unlike estrogen levels in women, androgen levels in men decline more slowly. This process accelerates only after the age of 65-70, resulting in bone tissue atrophy changes appearing later in men. However, complications resulting from osteoporotic fractures lead to higher mortality in men. Diagnosis and treatment of osteoporosis in men also present challenges. There is still no database of densitometric measurements for a large male population, necessitating the calculation of T-score and Z-score values based on measurements made for women. Additionally, some anti-osteoporotic drugs approved for use in women cannot be used in men due to lack of approval. Despite the implementation of new osteoporosis therapies in men, there is also a noticeable increase in interest in traditional medicine and the search for alternative methods of preventing and treating metabolic bone diseases. An alternative approach may involve the use of phytochemicals. Among them, phytoestrogens stand out, whose osteoprotective effects are well-documented, as well as less-known phytoandrogens. Pine pollen, used in traditional Chinese medicine for thousands of years, is a rich source of phytoandrogens and DHEA. Modern research has shown that it exhibits immunomodulatory, anticancer, antioxidant, and anti-inflammatory effects. Therefore, the aim of the undertaken research was to determine the osteotropic effect of various doses of pine pollen, administered orally, on bone tissue metabolism in male rat models of orchidectomy-induced bone atrophy. Considering the importance of the muscular system for proper skeletal function and the intensification of muscle catabolic processes after gonadectomy, parallel studies were also

conducted on the effect of various doses of pine pollen on the surface and density of leg muscles, as well as the accumulation of fat tissue in them.

In the experiment, male Wistar rats were used - 40 individuals, out of which 8 individuals underwent sham gonadectomy (SHO), while the remaining underwent orchidectomy (ORX). The ORX males were randomly divided into 4 groups (n=8). After a seven-day recovery period, the SHO group and one ORX group received saline solution, while the remaining ORX groups received testosterone (7mg/kg b.w./7 days s.c.) and pine pollen at two doses (50 and 150 mg/kg b.w./24h p.o.) respectively. After 60 days, the animals were euthanized, and the left tibiae were isolated and cleaned of soft tissues. The right pelvic limbs were separated from the trunk at the hip joint, along with the skin and muscles. Blood plasma was also collected for biochemical analysis. The analysis of the entire skeleton and isolated tibiae was conducted using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) method. Densitometric and structural parameters of the trabecular bone tissue of the proximal tibia were determined using peripheral quantitative computed tomography (pQCT). At the midshaft of the examined bones, the above-mentioned parameters of cortical bone tissue, as well as geometric features of the shaft, were assessed. The expected mechanical strength of the bones was also determined using pQCT. The structure and distribution of trabecular bone beams of the trabecular bone tissue were also evaluated using micro-computed tomography (μ CT). Using the three-point bending test method, the actual mechanical strength of the tibiae was determined in terms of maximum force measurement, Young's modulus of elasticity, and work done to the elastic limit. Measurements of muscle cross-sectional area (mCSA), muscle density (MD), intramuscular adipose tissue (IMAT), and subcutaneous adipose tissue (SAT) were also conducted using the pQCT method. Additionally, concentrations of biochemical markers of bone tissue metabolism (CTX-I, OC, bALP) were determined.

The results of the conducted studies demonstrate the osteoprotective effect of pine pollen, depending on its dosage. The use of a dose of 150 mg/kg b.w. in rats with developing bone atrophy completely inhibited the atrophic changes in bones induced by the lack of gonadal hormone influence. This dependency was observed both in cortical and trabecular bone tissue. Similarly, administering a dose of 50 mg/kg b.w. to orchidectomized rats showed a protective effect on bones. However, it was less pronounced and only affected the trabecular bone tissue. A higher dose of pine pollen inhibited the catabolic effect of orchidectomy on the femoral muscles, as evidenced by maintaining their density and surface area at the level of the supposedly operated group and the group receiving testosterone. Its limiting effect on the accumulation of intramuscular and subcutaneous adipose tissue was also noted. It is worth emphasizing the osteoprotective efficacy of pine pollen, especially when administered in larger doses, which demonstrates its potential for usage in the prevention of osteoporosis development in men and males of other animal species.

STRESZCZENIE

Osteoporoza będąca metaboliczną chorobą tkanki kostnej, manifestuje się niską masą kostną i zaburzoną mikroarchitekturą, co w konsekwencji znacząco zwiększa ryzyko złamań. Do niedawna uważano, iż dotyczy ona głównie kobiet, w szczególności w okresie pomenopauzalnym. Obecnie coraz częściej diagnozowana jest również u mężczyzn. Zarówno u kobiet, jak i mężczyzn zmiany zanikowe tkanki kostnej najczęściej warunkowane są zmniejszoną aktywnością hormonalną gonad, ale ich charakter i przebieg są odmienne. W przeciwieństwie do estrogenów u kobiet, poziom androgenów u mężczyzn maleje wolniej. Proces ten ulega przyspieszeniu dopiero po 65-70 roku życia, co powoduje, że zmiany zanikowe tkanki kostnej u mężczyzn zazwyczaj pojawiają się później. Jednak powikłania wynikające ze złamań osteoporotycznych skutkują większą śmiertelnością mężczyzn. Trudności niosą ze sobą również diagnostyka i leczenie osteoporozy u mężczyzn. Wciąż nie

istnieje baza danych pomiarów densytometrycznych dużej populacji męskiej, co wymusza konieczność wyliczanie wartości T-score i Z-score w oparciu bazę pomiarów stworzoną dla kobiet. Dodatkowo część leków antyosteoporotycznych, mających dopuszczenie do stosowania u kobiet, ze względu na brak dopuszczenia nie mogą być stosowane u mężczyzn.

Mimo wdrażania wciąż nowych terapii osteoporozy u mężczyzn, zauważalny jest również wzrost zainteresowania medycyną tradycyjną i poszukiwaniem alternatywnych metod zapobiegania i leczenia osteopatii metabolicznych. Taką alternatywą może być wykorzystanie fitozwiązków. Wśród nich wyróżniają się fitoestrogeny, których działanie osteoprotekcyjne jest dobrze udokumentowane oraz znacznie mniej poznane fitoandrogeny. Bogatym źródłem fitoandrogenów, a także DHEA jest pyłek sosnowy, stosowany w tradycyjnej medycynie chińskiej od tysięcy lat. Współczesne badania dowiodły, że wykazuje on działanie immunomodulujące, przeciwnowotworowe, przeciwutleniające, oraz przeciwzapalne. Dlatego celem podjętych badań było określenie osteotropowego wpływu różnych dawek pyłku sosnowego, podawanego p.o. na metabolizm tkanki kostnej w warunkach rozwoju zmian zanikowych kości samców szczurów poddanych orchidektomii. Uwzględniając znaczenie układu mięśniowego dla prawidłowego funkcjonowania kośćca oraz intensyfikację procesów katabolicznych mięśni po gonadektomii, równoległe podjęto badania nad wpływem różnych dawek pyłku sosnowego na powierzchnię oraz gęstość mięśni podudzia, a także kumulację w nich tkanki tłuszczowej.

W doświadczeniu użyto samców szczurów szczepu Wistar – 40 sztuk, z których 8 osobników poddano pozornej gonadektomii (SHO), a u pozostałych wykonano zabieg orchidektomii (ORX). Samce ORX zostały podzielone losowo na 4 grupy (n=8). Po siedmiodniowej rekonwalescencji grupa samców SHO oraz jedna grupa samców ORX otrzymywały płyn fizjologiczny pozostałe grupy ORX otrzymywały odpowiednio testosteron (7mg/kg m.c./7 dni s.c.) i pyłek sosnowy w dwóch dawkach (50 i 150 mg/kg m.c./24h p.o.). Po

upływie 60 dni zwierzęta poddano eutanazji, a następnie lewe kości piszczelowe wyizolowano i oczyszczono z tkanek miękkich. Prawe kończyny miednicze oddzielone zostały od tułowia w stawie biodrowym w całości wraz ze skórą i mięśniami. Do badań biochemicznych zabezpieczone zostało również osocze krwi. Przy użyciu metody desytmetrycznej (DXA) przeprowadzona została analiza całego szkieletu oraz izolowanych kości piszczelowych. Z wykorzystaniem obwodowego ilościowego tomografu komputerowego (pQCT) w bliższej części przynasadowej określone zostały parametry densytometryczne i strukturalne tkanki kostnej gąbczastej kości piszczelowych. W połowie długości trzonu badanych kości oceniane były ww. parametry tkanki kostnej zbitej, a także cechy geometryczne trzonu. Za pomocą pQCT określona została również przewidywana wytrzymałość mechaniczna kości. Struktura i rozmieszczenie beleczek kostnych tkanki kostnej gąbczastej podlegała również ocenie z użyciem mikrotomografii komputerowej (μ -CT). Wykorzystując metodę trójpunktowego testu ugięcia określona została rzeczywista wytrzymałość mechaniczna kości piszczelowych w zakresie pomiaru siły maksymalnej, modułu elastyczności Younga oraz wykonanej pracy do granicy sprężystości. Metodą pQCT przeprowadzone zostały również pomiary powierzchni przekroju poprzecznego mięśni (mCSA), gęstości mięśni (MD), powierzchni tkanki tłuszczowej wewnątrzmięśniowej (IMAT) oraz tkanki tłuszczowej podskórnej (SAT). Określone zostały również stężenia biochemicznych wskaźników metabolizmu tkanki kostnej (CTX-I, OC, bALP).

Wyniki przeprowadzonych badań dowodzą osteoprotekcyjnego wpływu pyłku sosnowego, zależnie od zastosowanej dawki. Użycie u szczurów z rozwijającymi się zmianami zanikowymi tkanki kostnej dawki 150 mg/kg m.c całkowicie hamowało zmiany zanikowe kości wywołane brakiem wpływu hormonów gonadalnych. Zależność taka wykazana została zarówno w obrębie tkanki kostnej zbitej, jak i gąbczastej.

Również podawanie orchidektomizowanym szczurom dawki 50 mg/kg m.c. zaznaczyło się ochronnym wpływem na kości. Był on jednak słabiej wyrażony i dotyczył wyłącznie tkanki kostnej gąbczastej. Wyższa dawka pyłku sosnowego hamowała kataboliczny wpływ orchidektomii na mięśnie podudzia, czego wyrazem było utrzymanie ich gęstości i wielkości powierzchni na poziomie grupy operowanej rzekomo i grupy otrzymującej testosteron. Odnotowany został również jego ograniczający wpływ na kumulację śródmięśniowej i podskórnej tkanki tłuszczowej. Na podkreślenie zasługuje fakt osteoprotekcyjnej skuteczności pyłku sosnowego, szczególnie podawanego w większych dawkach, co dowodzi możliwości jego wykorzystania w profilaktyce rozwoju osteoporozy u mężczyzn, jak i samców innych gatunków zwierząt.