

# Beta-hydroksy-beta-metylomaślan (HMB) – czynnik wpływający na właściwości wytrzymałościowe tkanki kostnej u szczurów

MAREK BIEŃKO, RADOSŁAW PIOTR RADZKI, MAŁGORZATA KAPICA,  
IWONA PUZIO, RAFAŁ FILIP\*, MARTA PAWŁOWSKA

Katedra Biochemii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

\*Pracownia Chorób Metabolicznych i Degeneracyjnych Tkanki Kostnej Instytutu Medycyny Wsi,  
ul. Jaczewskiego 2, 20-950 Lublin

Bieńko M., Radzki R. P., Kapica M., Puzio I., Filip R., Pawłowska M.

## Influence of beta-hydroxy beta-methylbutyrate (HMB) on the structural strength of bones

### Summary

HMB, or „beta-hydroxy beta-methylbutyrate”, is a metabolite of the Leucine amino acid and is produced naturally by the human body. HMB is produced from ketoisocaproate (KIC) – a metabolite of leucine – by the KIC-dioxygenase enzyme.

The aim of the study was to determine the effect of beta-hydroxy beta-methylbutyrate (HMB) on the structural strength of bones and the mineral density (BMD) of femur and lumbar vertebrae bones (L2-L4) in rats with established osteopenia. The experiment was conducted on 30 female Wistar rats, aged 3 months with an initial body weight of approximately 250 g. The femur was isolated on day 60 of the experiment and the three point bending test and BMD were performed. The lumbar vertebrae (L2-L4) were also investigated.

The study revealed that beta-hydroxy and beta-methylbutyrate added to drinking water has a positive effect on BMD in femur, lumbar vertebrae and bone strength in ovariectomized Wistar rats.

**Keywords:** beta-hydroxy beta-methylbutyrate, rats, bone

Współczesne badania udowodniły, że stany stresowe, pooperacyjne, niedożywienie, a także nieprawidłowo dobrana lub źle zbilansowana dieta prowadzą do ujemnego bilansu azotu w organizmie z równoczesnym zahamowaniem wzrostu całego organizmu, zaś odpowiednio podawana glutamina i jej pochodne przeciwdziałają takim konsekwencjom (3, 7-10, 12, 13, 20, 22).

Uwzględniając systemowe działanie glutaminy i jej pochodnych metabolitów, które stymulują procesy wzrostowe, można przypuszczać, że działanie to może być skierowane pośrednio lub bezpośrednio na rozwój układu kostnego. Z dotychczas przeprowadzonych badań wynika, że stosowanie kwasu  $\alpha$ -ketoglutarynowego w istotny sposób poprawia gęstość mineralną tkanki kostnej (BMD) oraz parametry wytrzymałościowe kości samic szczurów w warunkach osteopenii i osteoporozy, wywoływanych brakiem hormonów jajnikowych (1, 3, 19).

Oprócz glutaminy i jej pochodnych ważną, złożoną rolę w regulacji procesów kalcyfikacji pełnią również proteoglikany. Jest to heterogenna grupa białek wielkocząsteczkowych, składających się z rdzenia białkowego i siarczanów glikozoaminoglikanów oraz oligosacharydów o krótszej cząsteczce. Proteoglikany są biał-

kami macierzy zewnątrzkomórkowej, syntetyzowanej przez osteoblasty, bądź też są absorbowane z osocza i deponowane w macierzy kości. Zaliczamy do nich: agrekan (główny proteoglikan chrząstki), biglikan, dekorynę, bogatą w leucynę – fibromodulinę oraz stosunkowo niedawno wyizolowany z kości długich bydła proteoglikan – osteoadcherynę. Białka te uczestniczą również w utrzymaniu struktury i funkcji chrząstki stawowej. Jednym z interesujących związków jest beta-hydroksy-beta-metylomaślan (HMB), naturalnie produkowany metabolit leucyny i kwasu 2-ketoizokaproнового (KIC). Beta-hydroksy-beta-metylomaślan używany jest przez sportowców i osoby obciążone wysiłkiem fizycznym. HMB wzmacnia system immunologiczny oraz wydatnie obniża poziom cholesterolu. Podczas intensywnego treningu HMB przeciwdziała zniszczeniom mięśni, minimalizuje redukcję białek oraz pomaga w naprawie tkanki mięśniowej. Podobne efekty jego działania obserwowano również w badaniach na zwierzętach (17). HMB skutecznie wspomaga przyrost siły i masy mięśni przy jednoczesnej redukcji tkanki tłuszczowej. Wykazuje także silne właściwości anaboliczne, dzięki czemu może stać się prawdziwą alternatywą dla niedozwolonych środków dopingujących (12, 21).

Celem przeprowadzonych badań było określenie działania beta-hydroksy-beta-metylomaślanu na układ kostny w warunkach osteopenii.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 30 samicach szczurów rasy Wistar w wieku ok. 2-3 miesięcy i średniej masie ciała około 250 g, utrzymywanych w standardowych warunkach laboratoryjnych ze stałym dostępem do wody i karmy. Pasza podawana podczas doświadczenia była standardową paszą bytową, produkowaną przez mieszalnię pasz Agropol Motycz k. Lublina, stosowaną w żywieniu zwierząt laboratoryjnych.

Przez okres 14 dni zwierzęta poddawane były aklimatyzacji do warunków zwierzętarni (temperatura  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 12 h/12 h cykl dzień/noc, wilgotność  $55\% \pm 5\%$ ). Po tym czasie wykonane zostały zabiegi operacji rzekomych (SHO;  $n = 10$ ) i owariotomii (OVX;  $n = 20$ ). Zabiegi chirurgiczne przeprowadzono w znieczuleniu ogólnym, uzyskanym po podaniu Rometaaru (Leciva, Czechy), Ketaminy (Biowet-Puławy, Polska) oraz Atropiny (Pofa-Warszawa, Polska) w dawkach, odpowiednio, 2, 10 oraz 0,05 mg/kg m.c. Bezpośrednio po zabiegach chirurgicznych, na czas rekonwalescencji, zwierzęta umieszczono pojedynczo w oddzielnych klatkach na okres 7 dni. Po tym czasie zwierzęta przeniesiono z klatek pooperacyjnych do klatek hodowlanych i przez 60 dni czekano na rozwój osteopenii. Następnie przez 60 dni podawano grupie doświadczalnej (OVX + HMB,  $n = 10$ ) *ad libitum* roztwór beta-hydroksy-beta-metylomaślanu (HMB) (EAS Inc. Golden CO, USA) w wodzie do picia w ilości 1900 mg/1 dm<sup>3</sup>. Pozostałe grupy zwierząt (OVX,  $n = 10$ ; SHO,  $n = 10$ ) otrzymywały wodę czystą, bez dodatku HMB. Wodę codziennie wymieniano na świeżą, kontrolując jednocześnie jej spożycie. Średnia dzienna dawka HMB na jednego szczura wynosiła 55 mg.

Po 120 dniach doświadczenia zwierzęta uśmiercano przez dekapitację po wcześniejszym uśpieniu w dwutlenku węgla. Do dalszych analiz pobrano kości udowe, które poddano badaniu w zakresie gęstości mineralnej kości (BMD) oraz parametrów wytrzymałościowych.

Kości szczurów poddawano działaniu obciążeń dynamicznych z zastosowaniem aparatu Instron 4302 (Instron Corporation, Norwood MA, USA) połączonego z komputerem rejestrującym w postaci wykresu zależność między siłą działającą prostopadle do długiej osi kości a odkształceniem, wykorzystując tzw. 3-punktowy test zginania (4-6, 18). Zastosowano głowicę pomiarową o zakresie działania 0-1 kN. Za kryterium oceny przyjęta została siła obciążenia przy stałej prędkości głowicy pomiarowej  $V = 10$  mm/min. Kości do badań umieszczono na podporach o rozstawie odpowiadającym 40% długości kości, celem uniknięcia podparcia w częściach przynasadowych.

**Tab. 1. Parametry wytrzymałościowe oraz gęstość mineralna (BMD) trzonu kości udowej i kręgów L2-L4 samic szczurów grupy kontrolnej i grup doświadczalnych ( $\bar{x} \pm \text{SE}$ )**

	BMD (g/cm <sup>2</sup> ) kość udowa	BMD (g/cm <sup>2</sup> ) L2-L4	Siła maksymalna (N/mm)	Granica sprężystości (N/mm)
SHO ( $n = 10$ )	0,254 $\pm$ 0,0045 <sup>a</sup>	0,226 $\pm$ 0,0072 <sup>a</sup>	137,4 $\pm$ 0,996 <sup>a</sup>	92,2 $\pm$ 2,38 <sup>a</sup>
OVX ( $n = 10$ )	0,234 $\pm$ 0,0090 <sup>b</sup>	0,214 $\pm$ 0,0016 <sup>b</sup>	121,9 $\pm$ 1,345 <sup>b</sup>	66,5 $\pm$ 1,28 <sup>b</sup>
OVX + HMB ( $n = 10$ )	0,249 $\pm$ 0,0031 <sup>ab</sup>	0,224 $\pm$ 0,0040 <sup>ab</sup>	142,1 $\pm$ 1,021 <sup>ab</sup>	78,3 $\pm$ 1,41 <sup>ab</sup>

Objaśnienie: a i b różnice istotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) pomiędzy grupą kontrolną a grupami doświadczalnymi

Kości charakteryzowane były następującymi parametrami wytrzymałościowymi:

- wartością średnią siły maksymalnej, obliczoną z wartości określających tzw. punkt złamania, w którym następuje dezintegracja struktury kości (granica wytrzymałości);
- wartością średnią siły w punkcie przekraczania granicy sprężystości, obliczoną z tzw. punktów sprężystości wyznaczonych odchyleniem stycznej od linii obrazującej zależność między siłą a odkształceniem.

Gęstość mineralna (BMD – Bone Mineral Density) kości udowej oraz kręgów lędźwiowych (L2-L4) oceniono aparatem DEXA firmy Norland model Excell Plus (Fort Atkinson WI, USA) wykorzystującym technologię skolimowanej wiązki promieniowania rentgenowskiego przy użyciu programu umożliwiającego badanie małych zwierząt (Small Subject Scan). Urządzenie pomiarowe kalibrowano, za pomocą specjalnych fantomów, przed każdorazową serią pomiarową (2).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem testu t-Studenta. Oceniano istotność różnic średnich wartości badanych parametrów pomiędzy grupami SHO, OVX oraz OVX + HMB. Podjęte badania uzyskały zgodę Lokalnej Komisji Etycznej.

### Wyniki i omówienie

Dwumiesięczny okres braku wpływu hormonów jajnikowych przejawiał się w grupie zwierząt poddanych zabiegom owariotomii (OVX) spadkiem gęstości mineralnej kości (BMD) w stosunku do grupy kontrolnej (SHO). Zaobserwowano również obniżenie wartości wskaźników wytrzymałościowych charakteryzujących odporność kości na działanie sił odkształcających (tab. 1). Gęstość mineralna tkanki kostnej w grupie poddanej owariotomii była o 7,8% niższa niż w grupie SHO. Również gęstość mineralna kręgów była niższa o 5,3% w grupie OVX w stosunku do kontroli. Parametry wytrzymałościowe tkanki kostnej (siła maksymalna, granica sprężystości) samic w grupie OVX wykazały istotny spadek wartości w stosunku do grupy SHO. Wartości były niższe o 11,2% oraz 27,8%.

Podawanie beta-hydroksy-beta-metylomaślanu (HMB) w wodzie do picia, spowodowało zahamowanie dalszego spadku wartości BMD i czynników wytrzymałościowych. Gęstość mineralna kości udowej w grupie OVX + HMB wzrosła o 6,0% w stosunku do OVX. Podobną tendencję zaobserwowano w przypadku gęstości mineralnej kręgów lędźwiowych. Grupa zwierząt poddanych owariotomii i otrzymujących HMB miała tylko o 0,9% niższe wartości niż grupa kontrolna.

Wartości siły maksymalnej u zwierząt grupy doświadczalnej były wyższe o 3,3% w stosunku do zwierząt grupy kontrolnej. Podawanie beta-hydroksy-beta-metylomaślanu w korzystny sposób wpłynęło również na wartości granicy sprężystości u zwierząt poddanych owariotomii. Zaobserwowano wzrost wartości tego parametru o 15,0% w stosunku do grupy OVX (tab. 1).

Macierz kostna składa się z substancji organicznych i nieorganicznych. Głównym składnikiem organicznym kości jest kolagen. Rodzina kolagenu składa się z 15 typów białek i zwykle, z uwagi na budowę molekularną, jest dzielona na dwie grupy – kolageny tworzące włókna (fibrylarne – kolagen typu I, II, III, V, XI) i nie tworzące włókien (niefibrylarne – pozostałe). Obecny w kości kolagen typu I jest głównym białkiem, z którego zbudowane są włókna przenoszące obciążenia mechaniczne. Podobną funkcję pełnią włókna kolagenu typu V. Kolagen znajdujący się w macierzy kostnej jest głównie kolagenem typu I, składającym się z dwóch łańcuchów  $\alpha 1$  i jednego łańcucha  $\alpha 2$ , chociaż spotykane są również inne typy – V, VI, VIII i XII. Stanowi on 90% białek kości – pozostałymi są białka niekolagene: osteokalcyna (kostne białko Gla), osteonektyna (SPARC secreted protein acidic and rich in cysteine – kwaśne wydzielnicze białko bogate w cysteinę), sialoproteina kostna, proteoglikany – biglikan, dekoryna oraz osteopontyna (23).

Strukturalna integralność tkanki kostnej jest wynikiem równowagi między procesami tworzenia a resorpcji kości. Niedobór estrogenów w okresie wygasania czynności gonad przesuwa tę równowagę w kierunku procesów resorpcji, co doprowadza do przyspieszenia utraty masy kostnej. Przeciwdziałanie polegające na zwolnieniu procesów tej utraty lub jej całkowite zablokowanie jest niezmiernie ważne, ponieważ utracona masa kostna jest w dużej mierze niemożliwa do odtworzenia. Wiadomo, że u ludzi ponad 50% masy kostnej utraconej w okresie pomenopauzalnym przypada na pierwsze siedem lat jej trwania. Największe znaczenie ma bezpośredni wpływ estrogenów na osteoklasty. W okresie niedoboru estrogenów obserwuje się wzrost liczby i aktywności osteoklastów, co prowadzi do nasilonej resorpcji beleczek kostnych (15, 16).

Nieznany jest wpływ beta-hydroksy-beta-metylomaślanu (HMB) na układ kostno-szkieletowy. Można jednakże przypuszczać, na podstawie oddziaływania proteoglikanów, że niewykluczona jest możliwość stosowania HMB, w warunkach osteopenii, na poprawienie właściwości wytrzymałościowych oraz gęstości mineralnej tkanki kostnej. Drugi prawdopodobny mechanizm może być związany z antycholesterolowym działaniem beta-hydroksy-beta-metylomaślanu, który, podobnie jak w przypadku statyn, może mieć wpływ na metabolizm tkanki kostnej. Statyny bowiem, hamując reduktazę hydroksymetyloglutarylo-CoA (HMG-CoA) (w łańcuchu przemian kwasu mewalonowego), przyspieszają także apoptozę osteoklastów, hamują resorpcję kości i osteoklastogenezę *in vitro*, a ponadto pobudzają kościotworzenie, wzmagając ekspresję genu dla białka morfogenetycznego kości (BMP-2) (11, 14, 16). Ze względu na brak piśmiennictwa dotyczącego wpływu beta-hydroksy-beta-metylomaślanu (HMB) na układ kostny, jak również ze względu na charakter wyników uzyskanych we wstępnym doświadczeniu, należy kontynuować w przyszłości podjęte badania w celu wyjaśnienia rodzaju oddziaływania HMB na tkankę kostną oraz

możliwości jego ewentualnego wykorzystania w zapobieganiu i leczeniu zaburzeń metabolizmu układu kostnego u zwierząt i ludzi.

## Piśmiennictwo

1. *Bieńko M., Radzki R. P., Puzio I., Filip R., Pierzynowski S. G., Studziński T.*: AKG a potential therapeutic drug agent in the treatment of osteoporose like skeletal system disorders. *Bone* 2003, 32, 223-223.
2. *Bonnick S. L.*: Techniki densytometrii kości we współczesnej medycynie, [w:] Osteoporoza. Zasady rozpoznawania i leczenia. Rosen C. J. (wyd.) Springer, PWN, Warszawa 1998, 103-129.
3. *Coghlin Dickson T. M., Wong R. M., offrin R. S., Shizuru J. A., Johnston L. J., Hu W. W., Blume K. G., Stockerl-Goldstein K. E.*: Effect of oral glutamine supplementation during bone marrow transplantation. *J. Parenter. Enteral Nutr.* 2000, 24, 61-66.
4. *Ferretti J. L., Capozza R. F., Mondelo N., Montuori E., Zanchetta J. R.*: Determination of femur structural properties by geometric and material variables as a function of body weight in rats. Evidence of a sexual dimorphism. *Bone* 1993, 14, 265-270.
5. *Ferretti J. L., Capozza R. F., Mondelo N., Zanchetta J. R.*: Interrelationships between densitometric, geometric, and mechanical properties of rat femora: inferences concerning mechanical regulation of bone modeling. *J. Bone Miner. Res.* 1993, 8, 1389-1396.
6. *Ferretti J. L., Mondelo N., Capozza R. F., Cointy G. R., Zanchetta J. R., Montuori E.*: Effects of large doses of olpadronate (dimethyl-pamidronate) on mineral density, cross-sectional architecture, and mechanical properties of rat femurs. *Bone* 1995, 16, 285S-293S.
7. *Furst P.*: New developments in glutamine delivery. *J. Nutr.* 2001, 131, 2562S-2568S.
8. *Griffiths R. D.*: Glutamine: establishing clinical indications. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 1999, 2, 177-182.
9. *Griffiths R. D., Jones C., Palmer T. E.*: Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. *Nutrition* 1997, 13, 295-302.
10. *Hammarqvist F., Wernerman J., Ali R., von der D. A., Vinnars E.*: Addition of glutamine to total parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis, and improves nitrogen balance. *Ann. Surg.* 1989, 209, 455-461.
11. *Hatano H., Maruo A., Bolander M. E., Sarkar G.*: Statin stimulates bone morphogenetic protein-2, aggrecan, and type 2 collagen gene expression and proteoglycan synthesis in rat chondrocytes. *J. Orthop. Sci.* 2003, 8, 842-848.
12. *May P. E., Barber A., D'Olimpio J. T., Hourihane A., Abumrad N. N.*: Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. *Am. J. Surg.* 2002, 183, 471-479.
13. *Mertes N., Schulzki C., Goeters C., Winde G., Benzing S., Kuhn K. S., Van A. H., Stehle P., Furst P.*: Cost containment through L-alanyl-L-glutamine supplemented total parenteral nutrition after major abdominal surgery: a prospective randomized double-blind controlled study. *Clin. Nutr.* 2000, 19, 395-401.
14. *Mundy G., Garrett R., Harris S., Chan J., Chen D., Rossini G., Boyce B., Zhao M., Gutierrez G.*: Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999, 286, 1946-1949.
15. *Notelovitz M.*: Overview of bone mineral density in postmenopausal women. *J. Reprod. Med.* 2002, 47, 71-81.
16. *Ohno T., Shigetomi M., Ihara K., Matsunaga T., Hashimoto T., Kawano H., Sugiyama T., Kawai S.*: Skeletal reconstruction by vascularized allogeneic bone transplantation: effects of statin in rats. *Transplantation* 2003, 76, 869-871.
17. *Ostaszewski P., Kostiuk S., Balasinska B., Jank M., Papet I., Glomot F.*: The leucine metabolite 3-hydroxy-3-methylbutyrate (HMB) modifies protein turnover in muscles of laboratory rats and domestic chickens in vitro. *J. Anim. Physiol. and Anim. Nutr.* 2000, 84, 1-8.
18. *Radzki R. P., Bieńko M., Puzio I., Filip R., Kapica M., Studziński T.*: Wpływ flutamidu i testosteronu na cechy wytrzymałościowe, architektoniczne oraz gęstość mineralną kości udowej i ramiennej kurcząt brojlerów. *Med. Wet.* 2004, 60, 1137-1248.
19. *Radzki R. P., Bieńko M., Puzio I., Filip R., Pierzynowski S. G.*: Does alpha-ketoglutarate protect skeleton in conditions of estrogen deficiency in rats? *Bone* 2003, 5, 223-223.
20. *Shabert J. K., Winslow C., Lacey J. M., Wilmore D. W.*: Glutamine-antioxidant supplementation increases body cell mass in AIDS patients with weight loss: a randomized, double-blind controlled trial. *Nutrition* 1999, 15, 860-864.
21. *Slater G., Jenkins D., Logan P., Lee H., Vukovich M., Rathmacher J. A., Hahn A. G.*: Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) supplementation does not affect changes in strength or body composition during resistance training in trained men. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 2001, 11, 384-396.
22. *Tapiero H., Mathe G., Couvreur P., Tew K. D.*: II. Glutamine and glutamate. *Biomed. Pharmacother.* 2002, 56, 446-457.
23. *Wiberg C., Hedbom E., Khairullina A., Lamande S. R., Oldberg A., Timpl R., Morgelin M., Heinigard D.*: Biglycan and decorin bind close to the n-terminal region of the collagen VI triple helix. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 18947-18952.

Adres autora: dr Marek Bieńko, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin;  
e-mail: marek.bienko@ar.lublin.pl