

## Wpływ flufenazyny i risperidonu na przebudowę kości u szczurów owariektomizowanych

Effect of fluphenazine and risperidone on bone remodeling in ovariectomized rats

Maria Pytlik, Justyna Fronczek-Sokół

### STRESZCZENIE

#### WSTĘP

Neuroleptyki typowe (flufenazyna) oraz w mniejszym stopniu atypowe (risperidon) na skutek zwiększonego wydzielania prolaktyny mogą powodować rozwój osteoporozy. W dostępnym piśmiennictwie brakuje wyników badań eksperymentalnych dotyczących działania neuroleptyków na układ kostny w warunkach niedoboru estrogenów. Celem pracy było zbadanie wpływu flufenazyny i risperidonu na przebudowę kości u szczurów owariektomizowanych.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na samicach szczurów szczepu Wistar podzielonych na grupy: NOVX – szczury kontrolne nieowariektomizowane; OVX – szczury kontrolne owariektomizowane; OVX+R – szczury owariektomizowane otrzymujące risperidon w dawce 1 mg/kg; OVX+F<sub>1</sub> – szczury owariektomizowane otrzymujące flufenazynę w dawce 1 mg/kg; OVX+F<sub>5</sub> – szczury owariektomizowane otrzymujące flufenazynę w dawce 5 mg/kg. Leki podawano sondą dożołądkowo (*po*) raz dziennie przez 28 dni. Przebudowę kości po stosowaniu neuroleptyków oceniano na podstawie masy kości, masy substancji mineralnych oraz parametrów makrometrycznych i histomorfometrycznych.

#### ADRES

##### DO KORESPONDENCJI:

Dr hab. n. farm. Maria Pytlik  
Katedra i Zakład Farmakologii  
Wydziału Farmaceutycznego  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach  
ul. Jagiellońska 4  
41-200 Sosnowiec  
tel./fax +48 32 364 15 40  
e-mail: mariapytlik@gmail.com  
fronczekj84@op.pl

#### WYNIKI

Flufenazyna podawana w dawce 5 mg/kg, w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie szczurów kontrolnych owariektomizowanych (OVX), spowodowała znaczący statystycznie spadek masy kości udowej, kości piszczelowej i kręgu L-4, a także przyrostu na grubość i szerokość osteoidu od strony okostnej w trzonie kości piszczelowej oraz szerokości beleczek kostnych w nasadzie kości udowej. W obu badanych dawkach flufenazyna wykazała znaczący statystycznie spadek pola powierzchni przekroju poprzecznego trzonu kości piszczelowej, a także masy substancji mineralnych w kości udowej, piszczelowej oraz kręgu L-4. Risperidon u szczurów z niedoborem estrogenów nie wykazał istotnych statystycznie zmian w ocenianych parametrach kości w odniesieniu do grupy kontrolnej owariektomizowanej.

**WNIOSKI**

Flufenazyjna nasiliła zmiany w układzie kostnym wywołane niedoborem estrogenów w kości o strukturze gąbczastej oraz zbitej w sposób zależny od dawki. Risperidon nie intensyfikował zmian w układzie kostnym szczurów wywołanych niedoborem estrogenów.

**SŁOWA KLUCZOWE**

flufenazyjna, risperidon, kości, osteopenia, szczury owarietomizowane

**ABSTRACT****INTRODUCTION**

Typical neuroleptics (fluphenazine), and to a less extent atypical neuroleptics (risperidone), can induce osteoporosis because of the increased secretion of prolactin. The available literature lacks experimental results on the effect of neuroleptics on the skeletal system in conditions of estrogen deficiency. The aim of this study was to investigate the effect of fluphenazine and risperidone on bone remodeling in ovariectomized rats.

**MATERIAL AND METHODS**

The experiments were conducted on female Wistar rats divided into groups: NOVX – non-ovariectomized control rats, OVX – ovariectomized control rats, OVX+R – ovariectomized rats receiving risperidone (1 mg/kg), OVX+F<sub>1</sub> – ovariectomized rats receiving fluphenazine (1 mg/kg), OVX+F<sub>5</sub> – ovariectomized rats receiving fluphenazine (5 mg/kg). The tested drugs were administered by a stomach tube (*po*) once daily for 28 days. Bone remodeling after the use of neuroleptics was assessed based on the bone mass, bone mineral mass, macrometric parameters and histomorphometric parameters.

**RESULTS**

Fluphenazine administered at the dose of 5 mg/kg, compared with the results obtained in ovariectomized control rats (OVX), significantly decreased mass of the femur, tibia and L-4 vertebra, as well as periosteal transverse growth and width of periosteal osteoid in the tibial diaphysis and the width of trabeculae in the femoral epiphysis. Fluphenazine in both doses caused statistically significant reduction of the transverse cross-section area of the tibial diaphysis, and decreases in bone mineral mass in the femur, tibia and L-4 vertebra. After risperidone administration no statistically significant differences in the examined bone parameters were observed in comparison to the ovariectomized control rats.

**CONCLUSIONS**

Fluphenazine dose dependently augmented the changes in the skeletal system caused by estrogen deficiency in both cancellous and cortical bone. Risperidone did not intensify changes in the rats bones induced by estrogen deficiency.

**KEY WORDS**

fluphenazine, risperidone, bones, osteopenia, ovariectomized rats

**WSTĘP**

Schizofrenia jest przewlekłą chorobą psychiczną, na którą choruje około 1% populacji.

Jej objawy pojawiają się najczęściej w okresie dorastania lub wczesnej dorosłości. U większości chorych przebiega ona z naprzemiennymi okresami poprawy i pogorszenia, dlatego też konieczne jest prowadzenie długotrwałego

## MATERIAŁ I METODY

leczenia podtrzymującego, niejednokrotnie do końca życia [1,2]. W leczeniu schizofrenii stosuje się neuroleptyki, wykazujące działanie przeciwpsychotyczne. Wyróżnia się wśród nich neuroleptyki typowe (flufenazyne) oraz atypowe (risperidon). Neuroleptyki typowe blokują receptory  $D_2$  w układzie limbicznym, nigrostriatalnym i guzowo-przysadkowym, natomiast atypowe głównie w szlaku mezo limbicznym i mezo korykalnym. Ponadto neuroleptyki atypowe silnie blokują receptory  $5-HT_2$ .

Konsekwencją różnic w mechanizmach działania neuroleptyków typowych i atypowych są także różnice w działaniach niepożądanych. Neuroleptyki typowe powodują polekowy zespół Parkinsona oraz silne zaburzenia hormonalne (hiperprolaktynemię), natomiast neuroleptyki atypowe wykazują słaby wpływ na układ pozapiramidowy i tylko nieznacznie hiperprolaktynemię.

Dotychczasowe badania kliniczne wykazały, że u chorych leczonych neuroleptykami częściej niż w populacji ogólnej występują osteoporozyczne złamania kości oraz obniżona wartość BMD (*bone mineral density*) [3,4,5]. Za główną przyczynę obniżenia BMD u tych chorych uważa się hiperprolaktynemię, która w sposób pośredni doprowadza do hipogonadyzmu, a w konsekwencji do obniżenia poziomu hormonów płciowych we krwi [3,6,7]. Niedobór hormonów płciowych u osób leczonych przeciwpsychotycznie może stać się przyczyną rozwoju osteoporozy – układowej choroby szkieletu charakteryzującej się niską masą kostną, zaburzoną mikroarchitekturą tkanki kostnej oraz zmniejszoną wytrzymałością mechaniczną kości, ze zwiększonym ryzykiem złamań kości [4,5,6,8,9].

Podobne zmiany w układzie kostnym występują u kobiet po menopauzie na skutek zaniku hormonalnej funkcji jajników [8,9]. Dotychczas słabo został poznany wpływ neuroleptyków typowych i atypowych na przebudowę tkanki kostnej u kobiet w okresie pomenopauzalnym. W dostępnym piśmiennictwie brakuje także wyników badań eksperymentalnych dotyczących działania tych leków na układ kostny w warunkach niedoboru estrogenów w doświadczalnym modelu osteoporozy. Celem pracy było zbadanie wpływu flufenazyne i risperidonu na przebudowę kości u szczurów owariektomizowanych.

Badania przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach, na 40 trzymiesięcznych samicach szczurów szczepu Wistar o wyjściowej masie ciała 200–250 g. Szczury podzielono na grupy: NOVX – szczury kontrolne nieowariektomizowane; OVX – szczury kontrolne owariektomizowane; OVX+R – szczury owariektomizowane otrzymujące risperidon w dawce 1 mg/kg; OVX+F<sub>1</sub> – szczury owariektomizowane otrzymujące flufenazyne w dawce 1 mg/kg; OVX+F<sub>5</sub> – szczury owariektomizowane otrzymujące flufenazyne w dawce 5 mg/kg.

Szczury, z wyjątkiem grupy NOVX, poddano zabiegowi obustronnego usunięcia jajników (obustronnej owariektomii) w znieczuleniu ogólnym ketaminą (Bioketan, Vetoquinol Biowet) w dawce 100 mg/kg z ksylazyną (Rometar, SPOFA) w dawce 10 mg/kg, podanymi dootrzewnowo (*ip*). Po 7 dniach od zabiegu owariektomii rozpoczęto podawanie leków. Flufenazyne (Fluphenazine hydrochloride, Sigma-Aldrich) w dawce 1 mg/kg lub 5 mg/kg oraz risperidon (Rispolept, roztwór doustny 1 mg/ml, Janssen Pharmaceutica) w dawce 1 mg/kg podawano szczurom sondą dożołądkowo *po* raz dziennie przez 28 dni. Szczury grup kontrolnych NOVX i OVX w tym samym czasie otrzymywały wodę w objętości 2 ml/kg (*po*). Zwierzętom wszystkich grup 24 godziny przed rozpoczęciem podawania leków oraz 24 godziny przed ich uśmierceniem podawano chlorowoderek tetracykliny (Tetracycline hydrochloride, Sigma-Aldrich) w dawce 20 mg/kg w objętości 1 ml/kg (*ip*). Tetracyklina była fluorescencyjnym markerem przyrostu kości piszczelowej na grubość [10].

Po 28 dniach stosowania leków w pełnym znieczuleniu ogólnym (ketaminą z ksylazyną) szczury uśmiercono przez przerwanie ciągłości rdzenia kręgowego, a następnie u każdego wyizolowano prawe i lewe kości udowe oraz piszczelowe, a także kręgi L-4. Lewe kości po oczyszczeniu z tkanki mięśniowej ważono z dokładnością do 0,1 mg, a następnie mineralizowano w temperaturze 640°C przez 48 godzin. Przebudowę tkanki kostnej szczurów z niedoborem estrogenów, którym podawano flufenazyne w dawkach 1 lub 5 mg/kg oraz risperidon w dawce 1 mg/kg, oceniano na podstawie masy kości, masy substancji mineralnych

w kościach, stosunku masy substancji mineralnych do masy kości, badań makrometrycznych (pomiar długości i średnicy lewych kości udowych i piszczelowych) oraz histomorfometrycznych, wykonanych na preparatach histologicznych sporządzonych z nieodwapnionej prawej kości piszczelowej i udowej. Z kości piszczelowej, używając piły diamentowej, sporządzono trzy skrawki przekroju poprzecznego, rozpoczynając od miejsca przyrośnięcia strzałki (kość zbita), natomiast z kości udowej dwa skrawki przekroju podłużnego nasady dalszej (kość gąbczasta). Uzyskane skrawki szlifowano na zmatowionym szkle, a następnie barwiono.

Analiza histomorfometryczna preparatów histologicznych została przeprowadzona z wykorzystaniem zestawu obejmującego mikroskop firmy Nikon typu Optiphot-2 o zakresie światła widzialnego i ultrafioletowego, kamerę typu RGB (Cohu) oraz komputer z oprogramowaniem Lucia G 4.51 służącym do cyfrowych pomiarów histologicznych. Pomiar histomorfometryczny pozwoliły ocenić wpływ badanych neuroleptyków na procesy przebudowy tkanki kostnej o strukturze gąbczastej (pomiar szerokości beleczek kost-

nych w nasadzie i przynasadzie dalszej kości udowej) oraz zbitej (pomiar przyrostu kości piszczelowej na grubość i szerokości osteoidu od strony okostnej i śródkostnej oraz pola powierzchni przekroju poprzecznego trzonu, części korowej i jamy szpikowej kości piszczelowej).

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej testem t-Studenta dla danych niezależnych. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  SEM. Wyniki otrzymane w grupie kontrolnej OVX porównano z wynikami w grupie kontrolnej NOVX, natomiast wyniki w każdej z grup szczurów otrzymujących leki OVX+F<sub>1</sub>; OVX+F<sub>2</sub>; OVX+R porównano z wynikami uzyskanymi w grupie szczurów kontrolnych OVX. Różnice uznano za istotne statystycznie przy  $p < 0,05$ .

WYNIKI

1. Przyrost masy ciała, masa kości, masa substancji mineralnych oraz stosunek masy substancji mineralnych/100 mg masy kości po stosowaniu flufenazyny i risperidonu u szczurów owariektomizowanych

**Tabela I.** Przyrost masy ciała, masa kości, masa substancji mineralnych oraz stosunek masy substancji mineralnych/100 mg masy kości po stosowaniu flufenazyny i risperidonu. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  SEM

**Table I.** Body weight gain, bone mass, bone mineral mass and bone mineral mass/100 mg bone mass ratio after the use of fluphenazine and risperidone. Results are presented as the arithmetic means  $\pm$  SEM

Parametry	I NOVX	II OVX	III OVX+R	IV OVX+F1	V OVX+F5	
Przyrost masy ciała [g]	16,50 $\pm$ 5,10	<b>49,31 <math>\pm</math> 3,39<sup>***</sup></b>	<b>31,24 <math>\pm</math> 3,21<sup>oo</sup></b>	<b>20,91 <math>\pm</math> 2,53<sup>ooo</sup></b>	<b>12,11 <math>\pm</math> 4,28<sup>ooo</sup></b>	
Masa kości (mg)	kość udowa	733,54 $\pm$ 21,17	743,94 $\pm$ 17,56	709,95 $\pm$ 6,54	693,23 $\pm$ 21,15	<b>672,56 <math>\pm</math> 14,91<sup>oo</sup></b>
	kość piszczelowa	522,63 $\pm$ 16,74	531,17 $\pm$ 9,43	507,11 $\pm$ 3,76	498,11 $\pm$ 14,36	<b>491,38 <math>\pm</math> 10,67<sup>o</sup></b>
	kręgosłup L-4	264,39 $\pm$ 6,93	268,77 $\pm$ 7,11	249,54 $\pm$ 11,31	251,41 $\pm$ 13,61	<b>243,44 <math>\pm</math> 7,31<sup>o</sup></b>
Masa kości (mg/100 g mc.)	kość udowa	303,43 $\pm$ 5,45	<b>264,33 <math>\pm</math> 4,67<sup>***</sup></b>	275,12 $\pm$ 4,31	275,06 $\pm$ 3,52	277,51 $\pm$ 4,57
	kość piszczelowa	216,05 $\pm$ 3,61	<b>188,77 <math>\pm</math> 2,32<sup>***</sup></b>	196,51 $\pm$ 2,76	<b>197,70 <math>\pm</math> 2,61<sup>o</sup></b>	<b>202,95 <math>\pm</math> 4,79<sup>o</sup></b>
	kręgosłup L-4	109,39 $\pm$ 1,29	<b>95,62 <math>\pm</math> 2,87<sup>***</sup></b>	96,45 $\pm$ 3,68	99,50 $\pm$ 3,39	100,56 $\pm$ 3,32
Masa substancji mineralnych (mg)	kość udowa	314,57 $\pm$ 8,27	310,10 $\pm$ 7,37	298,79 $\pm$ 3,51	<b>283,34 <math>\pm</math> 8,52<sup>o</sup></b>	<b>280,03 <math>\pm</math> 5,85<sup>oo</sup></b>
	kość piszczelowa	230,87 $\pm$ 5,70	226,91 $\pm$ 4,41	219,96 $\pm$ 2,48	<b>209,53 <math>\pm</math> 5,88<sup>o</sup></b>	<b>209,41 <math>\pm</math> 4,55<sup>o</sup></b>
	kręgosłup L-4	90,49 $\pm$ 3,55	87,70 $\pm$ 1,40	<b>79,81 <math>\pm</math> 1,85<sup>oo</sup></b>	<b>77,40 <math>\pm</math> 3,89<sup>o</sup></b>	<b>78,81 <math>\pm</math> 2,39<sup>oo</sup></b>
Stosunek masy substancji mineralnych/100 mg masy kości	kość udowa	42,92 $\pm$ 0,38	<b>41,68 <math>\pm</math> 0,08<sup>***</sup></b>	42,09 $\pm$ 0,42	40,88 $\pm$ 0,37	41,66 $\pm$ 0,42
	kość piszczelowa	44,26 $\pm$ 0,53	<b>42,72 <math>\pm</math> 0,25<sup>*</sup></b>	43,38 $\pm$ 0,46	42,08 $\pm$ 0,39	42,64 $\pm$ 0,43
	kręgosłup L-4	34,17 $\pm$ 0,62	32,80 $\pm$ 1,21	32,22 $\pm$ 0,81	30,86 $\pm$ 0,74	32,42 $\pm$ 0,67

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  – różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wynikami u szczurów NOVX; °  $p < 0,05$ ; oo  $p < 0,01$ ; ooo  $p < 0,001$  – różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wynikami u szczurów OVX

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  – significantly different from the NOVX control rats; °  $p < 0,05$ ; oo  $p < 0,01$ ; ooo  $p < 0,001$  – significantly different from the OVX control rats

Niedobór estrogenów na skutek obustronnej owariektomii spowodował statystycznie istotny wzrost przyrostu masy ciała zwierząt o 198,83% w odniesieniu do wyników uzyskanych w grupie szczurów kontrolnych nieowariektomizowanych (tab. I). W porównaniu z wynikami grupy kontrolnej owariektomizowanej leki podawane szczurom owariektomizowanym, tj. flufenazyne (1 mg/kg lub 5 mg/kg) oraz risperidon (1 mg/kg), spowodowały statystycznie istotne zmniejszenie przyrostu masy ciała odpowiednio o 57,60% lub 75,45% oraz 36,64% (tab. I). Niedobór estrogenów u szczurów owariektomizowanych wywołał statystycznie istotny spadek masy kości udowej, piszczelowej oraz kręgu L-4/100 g m. c. odpowiednio o 12,89%, 12,62% i 12,59%, a także znaczący statystycznie spadek stosunku masy substancji mineralnych/100 mg masy kości piszczelowej o 3,48% i udowej o 2,82% w odniesieniu do grupy szczurów kontrolnych nieowariektomizowanych.

Flufenazyne w dawce 5 mg/kg statystycznie istotnie zmniejszyła masę kości udowej o 9,69%, a także masę substancji mineralnych w kości udowej o 9,79%. Statystycznie istotne zmniejszenie o 8,61% masy substancji mineralnych w kości udowej zaobserwowano także po stosowaniu mniejszej dawki flufenazyne. Masa substancji mineralnych po stosowaniu flufenazyne w dawkach 1 mg/kg i 5 mg/kg uległa również statystycznie znaczącemu spadkowi w kości piszczelowej odpowiednio o

18,82% i 17,58% oraz w kręgu L-4 o 11,74% i 10,13%. Risperidon nie wykazywał znaczącego wpływu na masę kości oraz masę substancji mineralnych zawartych w kości udowej i piszczelowej, natomiast znacząco zmniejszył o 8,99% masę substancji mineralnych w kręgu L-4 (tab. I).

## 2. Parametry makrometryczne i histomorfometryczne w kościach udowych i piszczelowych po stosowaniu risperidonu i flufenazyne u szczurów owariektomizowanych

Niedobór estrogenów u szczurów owariektomizowanych spowodował statystycznie istotne zwiększenie długości kości udowej i piszczelowej odpowiednio o 2,39% i 2,27% w porównaniu z wynikami grupy kontrolnej (NOVX) (tab. II). Risperidon w dawce 1 mg/kg oraz flufenazyne w dawkach 1 mg/kg i 5 mg/kg podawane szczurom owariektomizowanym wywoływały statystycznie znaczące zmniejszenie długości kości piszczelowej w odniesieniu do wyników uzyskanych w grupie szczurów kontrolnych owariektomizowanych, odpowiednio o 1,73%, 2,52% i 2,64% (tab. II). Flufenazyne w dawce 5 mg/kg statystycznie znacząco zmniejszyła długość kości udowej o 2,74% w porównaniu z wynikami uzyskanymi u szczurów owariektomizowanych. Risperidon i flufenazyne stosowane w obu dawkach nie zmieniały statystycznie znacząco średnicy kości udowej.

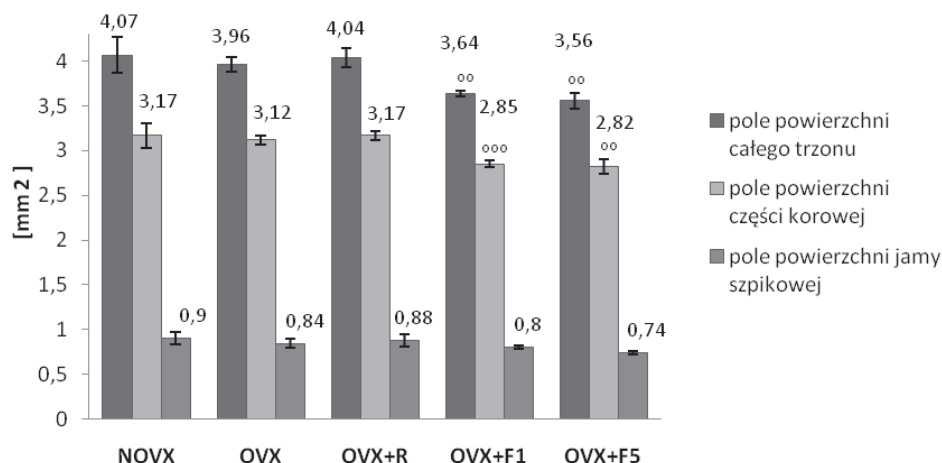
**Tabela II.** Długość i średnica kości udowej i piszczelowej po stosowaniu flufenazyne i risperidonu. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM

**Table II.** The length and diameter of the femur and tibia after the use of flufenazine and risperidone. Results are presented as the arithmetic means ± SEM

Parametry		I NOVX	II OVX	III OVX+R	IV OVX+F <sub>1</sub>	V OVX+F <sub>5</sub>
Długość kości (mm)	kość udowa	34,11 ± 0,26	<b>34,92 ± 0,23*</b>	34,37 ± 0,15	34,15 ± 0,26	<b>33,97 ± 0,15<sup>oo</sup></b>
	kość piszczelowa	37,91 ± 0,28	<b>38,78 ± 0,27*</b>	<b>38,10 ± 0,14<sup>o</sup></b>	<b>37,80 ± 0,13<sup>oo</sup></b>	<b>37,75 ± 0,29<sup>o</sup></b>
Średnica kości (mm)	kość udowa	3,29 ± 0,06	3,35 ± 0,06	3,33 ± 0,04	3,23 ± 0,06	3,27 ± 0,05
	kość piszczelowa	2,76 ± 0,03	2,69 ± 0,02	2,78 ± 0,05	2,36 ± 0,34	2,70 ± 0,05

<sup>o</sup> p < 0,05 – różnica statystycznie znamiennej w porównaniu z wynikami u szczurów NOVX; <sup>o</sup> p < 0,05; <sup>oo</sup> p < 0,01 – różnica statystycznie znamiennej w porównaniu z wynikami u szczurów OVX

\* p < 0,05 – significantly different from the NOVX control rats; <sup>o</sup> p < 0,05; <sup>oo</sup> p < 0,01 – significantly different from the OVX control rats

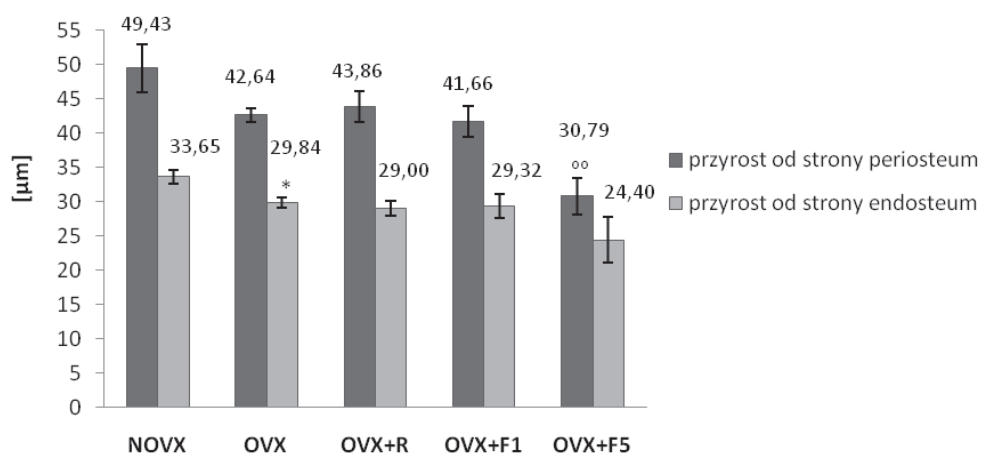


**Ryc. 1.** Pole powierzchni przekroju poprzecznego trzonu, części korowej oraz jamy szpikowej kości piszczelowej po stosowaniu flufenazyny i risperidonu. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  SEM. <sup>oo</sup> p < 0,01; <sup>ooo</sup> p < 0,001 – różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wynikami u szczurów OVX.

**Fig. 1.** Transverse cross-section area of the tibial diaphysis, cortical bone and marrow cavity after the use of fluphenazine and risperidone. Results are presented as the arithmetic means  $\pm$  SEM. <sup>oo</sup> p < 0.01; <sup>ooo</sup> p < 0.001 – significantly different from the OVX control rats.

W porównaniu z wynikami w grupie szczurów kontrolnych owariektomizowanych flufenazyna w dawkach 1 mg/kg oraz 5 mg/kg spowodowała statystycznie istotne zmniejszenie pola powierzchni części korowej kości piszczelowej, odpowiednio o 8,86% i 9,57%,

a także znaczące zmniejszenie pola powierzchni przekroju poprzecznego całego trzonu kości piszczelowej o 8,06% i 10,14% (ryc. 1). Risperidon nie zmienił znacząco statystycznie pola powierzchni przekroju poprzecznego kości piszczelowej.

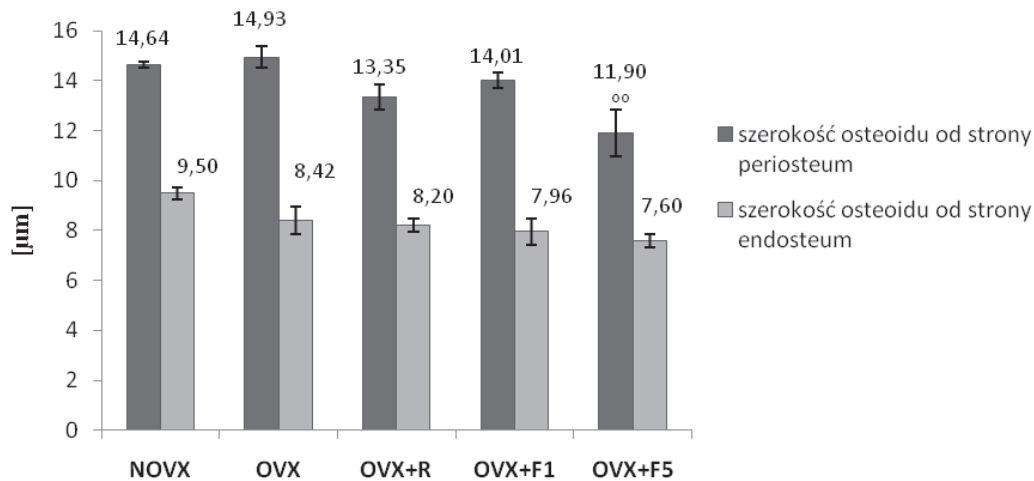


**Ryc. 2.** Przyrost kości piszczelowej na grubość od strony *periosteum* i *endosteum* po stosowaniu flufenazyny i risperidonu. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne  $\pm$  SEM. \* p < 0,05 – różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wynikami u szczurów NOVX. <sup>oo</sup> p < 0,01 – różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wynikami uzyskanymi u szczurów OVX.

**Fig. 2.** Periosteal and endosteal transverse growth of the tibia after the use of fluphenazine and risperidone. Results are presented as the arithmetic means  $\pm$  SEM. \* p < 0.05 – significantly different from the NOVX control rats. <sup>oo</sup> p < 0.01 – significantly different from the OVX control rats.

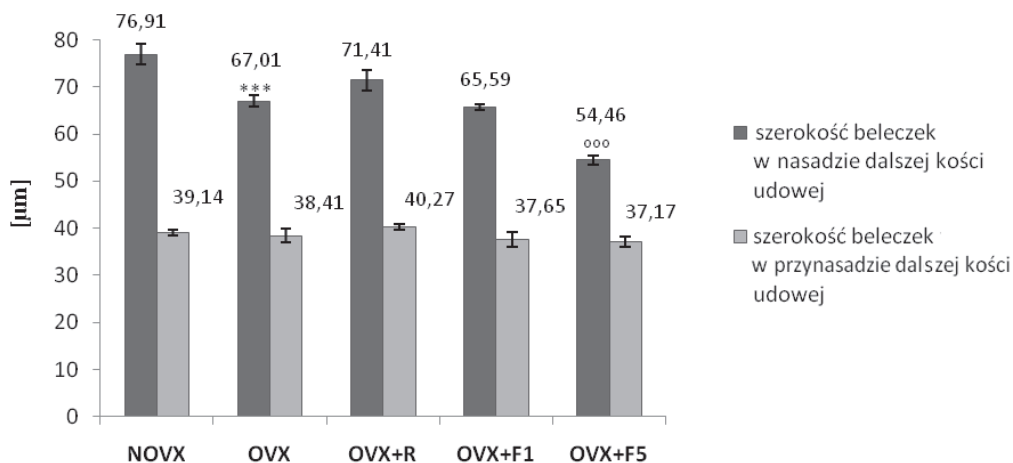
Niedobór estrogenów u szczurów ovariectomizowanych spowodował istotny statystycznie spadek o 11,31% przyrostu kości piszczelowej na grubość od strony jamy szpikowej oraz o 12,87% szerokości beleczek w nasadzie dalszej kości udowej (ryc. 2 i 4). Flufenazyna w dawce 5 mg/kg spowodowała w obrębie kości o strukturze zbitej statystycznie istotne zmniejszenie przyrostu na grubość oraz sze-

rokości osteoidu od strony *periosteum* odpowiednio o 35,34% i 20,30% w odniesieniu do wyników grupy szczurów kontrolnych ovariectomizowanych, natomiast w kości o strukturze beleczkowej statystycznie istotny spadek o 18,74% szerokości beleczek w nasadzie kości udowej (ryc. 2, 3 i 4). Stosowanie risperidonu nie wywołało istotnych zmian w kości o strukturze zbitej oraz gąbczastej (ryc. 2, 3, 4).



**Ryc. 3.** Szerokość osteoidu od strony *periosteum* i *endosteum* po stosowaniu flufenazyny i risperidonu. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM. °° p < 0,01 – różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wynikami u szczurów OVX.

**Fig. 3.** The width of periosteal and endosteal osteoid after the use of fluphenazine and risperidone. Results are presented as the arithmetic means ± SEM. °° p < 0.01 – significantly different from the OVX control rats.



**Ryc. 4.** Szerokość beleczek kostnych w nasadzie i przynasadzie dalszej kości udowej po stosowaniu flufenazyny i risperidonu. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± SEM. \*\*\* p < 0,001 – różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wynikami uzyskanymi u szczurów NOVX; °°° p < 0,001 – różnica statystycznie znamienna w porównaniu z wynikami uzyskanymi u szczurów OVX.

**Fig. 4.** The width of trabeculae in the distal epiphysis and metaphysis of the femur after the use of fluphenazine and risperidone. Results are presented as the arithmetic means ± SEM. \*\*\* p < 0.001 – significantly different from the NOVX control rats. °°° p < 0.001 – significantly different from the OVX control rats.

## DYSKUSJA

Obustronna owariektomia u dojrzałych płciowo samic szczurów powoduje niedobór estrogenów i jest powszechnie wykorzystywanym eksperymentalnym modelem osteoporozy, imitującym zmiany w tkance kostnej u kobiet po menopauzie na skutek zaniku hormonalnej funkcji jajników [11,12,13]. Przebudowę kości po stosowaniu flufenazyny i risperidonu oceniano u szczurów obustronnie owariektomizowanych, na podstawie masy kości, masy substancji mineralnych, stosunku masy substancji mineralnych do masy kości, makrometrycznych oraz histomorfometrycznych badań kości beleczkowej i zbitej.

W kości beleczkowej przebudowę kości, tj. resorpcję i kościotworzenie, oceniano na podstawie pomiaru szerokości beleczek kostnych w nasadzie i przynasadzie dalszej kości udowej. W kości zbitej procesy przebudowy oceniano na podstawie pomiarów szerokości osteoidu i przyrostu kości na grubość mierzonych od strony *periosteum* i *endosteum*, jak również pola powierzchni przekroju poprzecznego trzonu, części korowej i jamy szpikowej kości piszczelowej.

Niedobór estrogenów u szczurów obustronnie owariektomizowanych spowodował rozwój osteopenii w układzie kostnym z nasileniem procesów resorpcji i/lub zahamowaniem kościotworzenia. Nasilenie resorpcji i/lub zahamowanie kościotworzenia w kości gąbczastej manifestowało się znaczącym spadkiem szerokości beleczek kostnych w nasadzie kości udowej, natomiast w kości zbitej zmniejszeniem przyrostu kości piszczelowej na grubość od strony *endosteum*.

Potwierdzeniem zaburzenia procesów remodelingu kości u szczurów obustronnie owariektomizowanych, wskazującym na rozwój osteopenii, był znaczący statystycznie spadek masy kości udowej, piszczelowej oraz kręgu L-4 na 100 g mc., a także statystycznie istotne zmniejszenie stosunku masy substancji mineralnych na 100 mg kości udowej i piszczelowej.

Flufenazynę podawano szczurom owariektomizowanym w dawkach 1 mg/kg lub 5 mg/kg. Dawka 1 mg/kg odpowiadała minimalnej, natomiast 5 mg/kg maksymalnej dawce dobowej stosowanej u ludzi. Dawkę dla risperidonu 1 mg/kg ustalono opierając się na maksymalnej dawce dobowej u ludzi. Wyliczone dawki na kg mc. zostały pomnożone przez współ-

czynnik x10, z uwagi na szybszy metabolizm leków u szczurów.

Wyniki badań histomorfometrycznych wykazały, że flufenazyna intensyfikowała zmiany wywołane niedoborem estrogenów w kości beleczkowej i zbitej przez nasilenie procesów resorpcji i/lub zahamowanie kościotworzenia zależnie od stosowanej dawki. W kości beleczkowej wskazuje na to zmniejszenie szerokości beleczek kostnych w nasadzie kości udowej (znaczące po dawce 5 mg/kg), natomiast w kości zbitej istotne zmniejszenie przyrostu kości piszczelowej na grubość oraz szerokości osteoidu od strony okostnej, a także zmniejszenie pola powierzchni trzonu i części korowej kości piszczelowej, wykazane po obu dawkach flufenazyny.

Potwierdzeniem nasilenia przez flufenazynę zmian przebudowy kości wywołanych niedoborem estrogenów były spadek masy kości udowej, piszczelowej i kręgu L-4 (znaczący po dawce 5 mg/kg), a także zaobserwowane po obu dawkach leku istotne zmniejszenie masy substancji mineralnych w badanych kościach. Pogorszenie przebudowy kości z utratą masy oraz masy substancji mineralnych po stosowaniu flufenazyny może być konsekwencją zwiększonego wydzielania prolaktyny, a także, zwłaszcza po stosowaniu dużej dawki (5 mg/kg), zmniejszenia aktywności ruchowej w efekcie jej kataleptycznego działania na układ pozapiramidowy [14].

Risperidon podawany szczurom owariektomizowanym w dawce 1 mg/kg nie zmieniał przebudowy tkanki kostnej wywołanej niedoborem estrogenów, na co wskazuje (poza znaczącym zmniejszeniem masy substancji mineralnych w kręgu L-4 oraz długości kości piszczelowej) brak istotnych statystycznie zmian w badanych parametrach.

Uzyskane wyniki zróżnicowanego wpływu flufenazyny i risperidonu na procesy przebudowy kości u szczurów z niedoborem estrogenów mogą być konsekwencją różnic w mechanizmach ich działania i działaniach niepożądanych.

W dostępnym piśmiennictwie brakuje wyników badań eksperymentalnych dotyczących działania neuroleptyków typowych i atypowych na tkankę kostną w warunkach niedoboru estrogenów w doświadczalnym modelu osteoporozy. Wielu badaczy prowadziło natomiast badania wpływu leków przeciwpsychotycznych na tkankę kostną u ludzi. Z przeprowadzonych badań klinicznych wyni-



ka, że u pacjentów leczonych neuroleptykami, zwłaszcza typowymi, występuje zwiększony poziom prolaktyny we krwi [3,4,7,15,16]. Hiperprolaktynemia powoduje zaburzenia pulsacyjnego wydzielania gonadoliberyny przez podwzgórze i w konsekwencji hamuje uwalnianie gonadotropin (FSH i LH) z przysadki mózgowej. Zmniejszone uwalnianie gonadotropin u kobiet prowadzi do zmniejszenia wydzielania estrogenów, co powoduje zaburzenia procesów przebudowy tkanki kostnej, podobne jak w okresie pomenopauzalnym [6].

Wyniki badań klinicznych w zakresie korelacji między hiperprolaktynemią a obniżoną wartością BMD nie są jednoznaczne. Niektórzy badacze (Meaney, Naidoo i Wyszogrodzka-Kucharska) uważają hiperprolaktynemię za główną przyczynę pogorszenia jakości tkanki kostnej po stosowaniu neuroleptyków i potwierdzają istotną zależność między jej występowaniem a obniżoną wartością BMD [5,7,17,18,19]. Inni natomiast nie zaobserwowali znaczącej korelacji między podwyższonym poziomem prolaktyny a obniżeniem BMD [15,16,20,21,22]. Bergemann wykazał, że u kobiet leczonych neuroleptykami BMD była w granicach normy, mimo występowania hiperprolaktynemii, natomiast zwiększał się obrót kostny potwierdzony wzrostem poziomu markerów kościotworzenia (osteoklacy w surowicy) oraz resorpcji kostnej (pirydynoliny i deoksypirydynoliny w moczu) [15].

Rozbieżność wyników badań klinicznych u chorych na schizofrenię może wynikać również z oddziaływania neuroleptyków, zwłaszcza typowych, na układ pozapiramidowy, co powoduje zmniejszoną aktywność ruchową. Zarówno w badaniach klinicznych, jak i eksperymentalnych dowiedziono, że niska aktywność ruchowa przyczynia się do utraty tkanki kostnej oraz rozwoju osteopenii [23,24].

Wyniki większości przeprowadzonych badań klinicznych wskazują, że neuroleptyki typowe w większym stopniu obniżają gęstość mineralną kości niż neuroleptyki atypowe, takie jak kłozapina lub olanzapina [4,22,26,25]. Pomimo że risperidon należy do grupy neuroleptyków atypowych, w badaniach klinicznych

wykazano zwiększony poziom prolaktyny we krwi oraz obniżoną gęstość mineralną kości po stosowaniu tego leku [5,16,17,25,27]. Badania te były jednak przeprowadzone na kobietach młodych w grupach o małej liczebności. Holzer i Kleinberg sugerują, że hiperprolaktynemia i obniżenie BMD po stosowaniu risperidonu mogą wystąpić dopiero po jego długotrwałym stosowaniu w dużych dawkach [27,28].

Różnice między neuroleptykami typowymi i atypowymi w oddziaływaniu na przebudowę tkanki kostnej mogą także wynikać z ich odmiennego wpływu na komórki kostne. Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały obecność na powierzchni osteoblastów i osteocytów transportera dla dopaminy (DAT) oraz receptorów serotoninowych (5-HT). W badaniach *in vivo* wykazano, że delecja DAT u myszy powoduje pogorszenie jakości tkanki kostnej gąbczastej i zbitej, natomiast w badaniach *in vitro* stwierdzono, że pobudzenie receptorów serotoninowych nasila aktywność osteoblastów [29,30]. Komoda zaobserwował, że niektóre pochodne fenotiazyny (m.in. flufenazyna) hamują proliferację osteoblastów [31].

Wyjaśnienie mechanizmów działania neuroleptyków typowych (flufenazyny) i atypowych (risperidonu) na procesy przebudowy kości na poziomie komórkowym wymaga prowadzenia odrębnych badań.

#### WNIOSKI

1. Niedobór estrogenów u szczurów obustronnie owariektomizowanych spowodował rozwój osteopenii z nasileniem resorpcji i/lub zahamowaniem kościotworzenia.
2. Flufenazyna w dawkach 1 mg/kg oraz 5 mg/kg intensyfikowała zmiany wywołane niedoborem estrogenów, głównie przez zahamowanie procesów kościotworzenia u szczurów owariektomizowanych zależnie od zastosowanej dawki.
3. Risperidon w dawce 1 mg/kg nie zmienił przebudowy tkanki kostnej wywołanej niedoborem estrogenów u szczurów.

Praca została zrealizowana w ramach badań statutowych KNW-1-023/10.

## PIŚMIENICTWO

1. Rybakowski J. Leki psychotropowe w profilaktyce chorób afektywnych i schizofrenii. Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa 1995: 13–26.
2. McIlwain M., Harrison J., Wheeler A.J., Russel B.R. Pharmacotherapy for treatment – resistant schizophrenia. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2011; 7: 135–149.
3. Halbreich U. Osteoporosis, schizophrenia and antipsychotics. The need for a comprehensive multifactorial evaluation. *CNS Drugs* 2007; 21: 641–657.
4. Hummer M., Malik P., Gasser R.W. i wsp. Osteoporosis in patients with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 2005; 162: 162–167.
5. Wyszogrodzka-Kucharska A., Rabe-Jabłońska J. Ocena gęstości mineralnej kości u chorych na schizofrenię leczonych lekami przeciwpsychotycznymi II generacji. *Psychiatr. Pol.* 2005; 6: 1173–1184.
6. Bolanowski M., Kałużny M. Zaburzenia metabolizmu i gęstości kości w hiperprolaktynemii. *Terapia* 2005; 2: 15–17.
7. Meaney A.M., Smith S., Howes O.D., O'Brien M., Murray R.M., O'Keane V. Effects of long-term prolactin raising antipsychotic medication on bone mineral density in patients with schizophrenia. *Br. J. Psychiatr.* 2004; 184: 503–508.
8. Rizzoli R., Bonjour J.P., Ferrari S.L. Osteoporosis, genetics and hormones. *J. Mol. Endocrinol.* 2001; 26: 79–94.
9. Skrzypulec V., Rozmus-Warcholińska W., Walasek A. Osteoporoza – patogeneza i profilaktyka. *Wiad. Lek.* 2004; 57: 295–299.
10. Sherrard D.J., Maloney N.A. Single-dose tetracycline labeling for bone histomorphometry. *Am. J. Clin. Pathol.* 1989; 19: 682–687.
11. Wronski T.J., Yen C.F. The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cell Mater suppl.* 1991; 1: 69–74.
12. Kalu D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991; 15: 175–191.
13. Mosekilde L. Assessing bone quality — Animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone* 1995; 17: 343–352.
14. Elliot P.J., Close S.P., Walsh D.M., Hayes A.G., Marriott A.S. Neuroleptic-induced catalepsy as a model of Parkinson's disease. Effect of dopaminergic agents. *J. Neural. Transm. Park. Dis. Dement. Sect* 1990; 2: 79–89.
15. Bergemann N., Parzer P., Mundt C., Auler B. High bone turnover but normal bone mineral density in women suffering from schizophrenia. *Psychol. Med.* 2008; 26: 1–7.
16. Abraham G., Paing W., Kaminski J., Joseph A., Kohegy E., Josiassen R.C. Effects of elevated serum prolactin on bone mineral density and bone metabolism in female patients with schizophrenia: A prospective study. *Am. J. Psychiatr.* 2003; 160: 1618–1620.
17. Wyszogrodzka-Kucharska A., Rabe-Jabłońska J. Zaburzenia wydzielania prolaktyny u chorych na schizofrenię leczonych lekami przeciwpsychotycznymi II generacji. *Psychiatr. Pol.* 2005; 6: 1143–1155.
18. Wyszogrodzka-Kucharska A., Rabe-Jabłońska J. Zaburzenia gospodarki wapniowo-fosforanowej u chorych na schizofrenię leczonych lekami przeciwpsychotycznymi II generacji. *Psychiatr. Pol.* 2005; 6: 1157–1173.
19. Naidoo U., Goff D.C., Klubanski A. Hyperprolactinemia and bone mineral density: the potential impact of antipsychotic agents. *Psychoneuroendocrinology* 2003; 28: 97–108.
20. Howes O.D., Wheller M.J., Meaney A.M. i wsp. Bone mineral density and its relationship to prolactin levels in patients taking antipsychotic treatment. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2005; 25: 259–261.
21. Liu-Seifert H., Kinon B.J. Ahl J., Lambertson S. Osteopenia associated with increased prolactin and aging in psychiatric patients treated with prolactin elevating antipsychotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1032: 297–298.
22. Bilici M., Cakirbay H., Guler M., Tosun M., Ulgen M., Tan U. Classical and atypical neuroleptics and bone mineral density in patients with schizophrenia. *Intern. J. Neurosci.* 2002; 112: 817–828.
23. Atalay A., Yildirim M., Gokce-Kutsal Y., Onur R., Ariyurek M. Prospective use of dual energy X-ray absorptiometry in a model of immobilization and exercise in rats: the preliminary results. *Rheumatol. Int.* 2008; 28: 939–941.
24. Sievänen H. Immobilisation and bone structure in humans. *Arch. Biochem. Biophys.* 2010; 503: 146–152.
25. Becker D., Liver O., Mester R., Rapoport M., Weizman A., Weiss M. Risperidone but not olanzapine decreases bone mineral density in female premenopausal schizophrenia patients. *J. Clin. Psychiatr.* 2003; 64: 761–766.
26. Meaney A.M., O'Keane V. Bone mineral density changes over a year in young females with schizophrenia: relationship to medication and endocrine variables. *Schizophr. Res.* 2007; 93: 136–143.
27. Holzer L., Eap C.B. Risperidone – induced symptomatic hyperprolactinemia in adolescents. *J. Clin. Psychopharm.* 2006; 26: 167–171.
28. Kleinberg D.L., Davis J.M., De Coster R., Van Baelen B., Brecher M. Prolactin levels and adverse effects in patients treated with risperidone. *J. Clin. Psychopharmacol.* 1999; 19: 57–61.
29. Bliziotis M., Eshleman A., Zang X.W., Wren K. Neurotransmitter action in osteoblasts: Expression of a functional system of serotonin receptor activation and reuptake. *Bone* 2001; 29: 477–486.
30. Bliziotis M., Gunnes M., Eshleman A., Wren K. The role of dopamine and serotonin in regulating bone mass and strength: studies on dopamine and serotonin transporter null mice. *J. Musculoskel. Neuron. Interact.* 2002; 2: 291–295.
31. Komoda T., Nagata A., Kiyoki M. i wsp. Inhibitory effect of phenothiazine derivatives on bone in vivo and osteoblastic cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 1985; 34: 3885–3889.