

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program

Klinická biochemie

Vliv vybraných léků na kostní metabolismus

The effect of selected drugs on bone metabolism

Mgr. Iva Karešová

Školitel: prof. MUDr. Vladimír Palička, CSc., dr. h. c.

Hradec Králové, 2023

Prohlášení autora

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2023

Iva Karešová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc., dr. h. c. za odborné vedení, rady, cenné připomínky, a především za vstřícnost, trpělivost a podporu, kterou mi vždy poskytl po celou dobu mého doktorského studia.

Mé velké poděkování patří i MUDr. Juliovi Šimko, Ph.D., za možnost konzultací, cenné rady a připomínky během sepisování publikací. Děkuji kolegyni a zároveň kamarádce RNDr. Soně Fekete, Ph.D. za předání zkušeností s metodikou měření a podporu během studia. Mé díky patří také RNDr. Evě Čermákové a prof. Ing. Janovi Kremláčkovi, Ph.D., za pomoc při statistickém zpracování výsledků. Dále děkuji svým kolegům a vedení Ústavu klinické biochemie a diagnostiky.

Speciální poděkování patří manželovi a našim dětem.

Tato disertační práce byla finančně podpořena projektem MZ ČR – RVO (FNHK, 00179906), granty Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové SVV-2015-260181, SVV-2016-260289, SVV-2022-260544, programem PROGRES Q40/01 a programem Cooperatio, vědní oblasti DIAG.

Obsah

1. Úvod.....	12
2. Kost.....	13
2.1 Anatomie kosti a funkční morfologie kosti	13
2.2 Klasifikace kostí.....	13
2.3 Složení kosti	14
2.3.1 Kostní matrix.....	14
2.3.2 Buňky kostní tkáně.....	15
2.4 Kostní modelace.....	17
2.5 Remodelace kosti.....	18
2.6 Regulace kostní remodelace	20
2.6.1 Systémová regulace	20
2.6.2 Lokální regulace.....	24
2.7 Markery kostního obratu.....	27
2.7.1 Markery kostní formace	28
2.7.2 Markery kostní resorpce	30
3. Osteoporóza a měření kostní minerální denzity (BMD).....	33
4. Epilepsie	35
4.1 Zonisamid	37
4.2 Pregabalin a gabapentin.....	38
4.3 Levetiracetam.....	38
5. Cíle disertační práce	40
6. Experimentální část.....	41
6.1 Experimentální zvířata.....	41
6.2 Antiepileptika	41
6.3 Experiment	41
6.4 Materiál a analýza	42
6.4.1 Kostní homogenát.....	43
6.4.2 Stanovení koncentrace léků v séru	44
6.4.3 Měření kostní minerální denzity	45
6.4.4 Testování mechanické odolnosti kostní tkáně.....	47
6.4.5 Statistická analýza a vyhodnocení dat.....	48

7. Výsledky.....	49
7.1 Vliv orchidektomie na kostní metabolismus u potkanů	49
7.2 Vliv zonisamidu na kostní metabolismus u potkanů	52
7.3 Vliv gabapentinu na kostní metabolismus u potkanů.....	57
7.4 Vliv pregabalínu na kostní metabolismus u potkanů.....	61
7.5 Vliv levetiracetamu na kostní metabolismus u potkanů	66
8. Diskuze	72
8.1 Vliv orchidektomie na kostní metabolismus u potkanů	72
8.2 Vliv zonisamidu na kostní metabolismus u potkanů	73
8.3 Vliv gabapentinu a pregabalínu (gabapentinoidů) na kostní metabolismus u potkanů	75
8.4 Vliv levetiracetamu na kostní metabolismus u potkanů	77
9. Závěr.....	80
10. Seznam použité literatury.....	82
11. Přílohy-publikace zahrnuté v disertační práci.....	93
11.1 Příloha č. 1	93
11.2 Příloha č. 2	102
11.3 Příloha č. 3	108

Seznam použitých zkratk

AED	antiepileptika (antiepileptic drugs)
ALP	alkalická fostatáza
BALP	kostní izoforma alkalické fosfatázy
BLCs	kost lemující buňky (Bone-linig cells)
BMD	kostní minerální hustota
BMP	kostní morfogenetický protein
BMU	základní mnohobuněčné jednotky kosti (basic multicellular unit)
BSP	kostní sialoprotein
CT	kalcitonin
CTX-I	C-terminální telopeptid kolagenu typu I
CYP450	cytochrom p450
DPD	deoxypyridinolin
DXA	dvouenergiové rentgenové absorpctiometrie
E1	estron
E2	17 β -estradiol
E3	estriol
E4	estetrol
ELISA	enzymová imunoanalýza
ER	estrogenový receptor
GABA	kyselina gamaaminomáselná
GAG	glykosaminoglykanové zbytky
GBP	gabapentin

GH	růstový hormon
GHBP	vazebný protein GH
GHR	receptor pro GH
ICTP	C-terminální telopeptid kolagenu I
IGF-I	inzulinu podobný růstový faktor I (insuline-like growth factor I)
IGFBP	vazebný protein IGF
IL	interleukin
LEV	levetiracetam
M-CSF	faktor stimulující kolonie makrofágů
NTX-I	N-terminální telopeptid kolagenu typu I
OC	osteokalcin
OHP	hydroxyprolin
OPG	osteoprotegerin
OPGL	osteoprotegerin ligand
ORX	kontrolní skupina potkaních samců po provedené orchidektomii krmená SLD
PDGF	růstový faktor odvozený od destiček
PGB	pregabalin
PGE2	prostaglandin E
PICP	C-terminální propeptid prokolagenu typu I
PINP	N-terminální propeptid prokolagenu typu I
PTH	parathormon
PYD	pyridinolin
RANK	receptor aktivující nukleární faktor kappa B
RANKL	ligand vázající se na receptor aktivující nukleární faktor kappa B

SD	směrodatná odchylka
SHAM	kontrolní skupina potkaních samců krmená SLD
SLD	standardní laboratorní dieta
TGF- β	transformující růstový faktor beta
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TRAP	tartarát rezistentní kyselá fosfatáza
WHO	Světová zdravotnická organizace
ZNS	zonisamid

Souhrn

Vzhledem ke stárnutí populace a prodlužující se délce života představuje osteoporóza závažný celosvětový zdravotní problém. V současné době se odhaduje, že osteoporózou trpí více než 200 milionů lidí. Zlomeniny v důsledku osteoporózy jsou hlavní příčinou morbidit a mortality starších lidí (Compston et al., 2019). Řada důkazů naznačuje souvislost mezi antiepileptiky a kostními abnormalitami. Prevalence osteoporózy a osteopenie u dlouhodobě léčených epileptiků je vysoká. Více než 50 % pacientů s epilepsií má nízkou hodnotu kostní minerální denzity (BMD) (Ko et al., 2020).

Cílem této disertační práce bylo posouzení vlivu orchidektomie a vybraných nových antiepileptik (zonisamid, gabapentin, pregabalin, levetiracetam) na kostní metabolismus u mladých potkanů kmene Wistar.

Byl potvrzen negativní vliv provedené orchidektomie potkanů na kostní tkáň po 12 týdnech. Orchidektomie vedla k statisticky významnému snížení BMD a měla negativní vliv na mechanickou odolnost kostí. Naše výsledky potvrzují, že mladý potkan po provedené orchidektomii může být považován za vhodný zvířecí model pro studium osteopenie.

Po 12 týdnech podávání nových antiepileptik (zonisamid, gabapentin, pregabalin, levetiracetam) nebyl potvrzen statisticky významný vliv na BMD u orchidektomovaných potkanů ani u gonadálně intaktních potkanů. Ve skupině orchidektomovaných potkanů byl po podávání levetiracetamu zjištěn významný vzestup kostních markerů-BALP, CTX-I a RANKL, u gabapentinu a pregabalinu významný vzestup markeru kostního obratu RANKL. U gonadálně intaktních potkanů bylo po užívání levetiracetamu naměřeno statisticky významné zvýšení markerů BALP a CTX-I, u pregabalinu byl zjištěn významný vzestup kostního markeru sklerostinu. U žádného z novějších výše uvedených antiepileptik nebyl potvrzen statisticky významný vliv na mechanickou odolnost kostí u orchidektomovaných potkanů ani u gonadálně intaktních potkanů.

Dlouhodobé podávání novějších antiepileptik (zonisamid, gabapentin, pregabalin, levetiracetam) lze považovat za méně rizikové z hlediska zdraví kostí.

Summary

With an aging population and increasing life expectancy, osteoporosis represents a major global health problem. Currently it is estimated that more than 200 million people suffer from osteoporosis. Fractures due to osteoporosis are the major cause of morbidity and mortality in the elderly (Compston et al., 2019). A large body of evidence suggests an association between AEDs and bone abnormalities. The prevalence of osteoporosis and osteopenia in long-term treated epileptics is high. More than 50% of patients with epilepsy have low bone mineral density (BMD) (Ko et al., 2020).

The aim of the dissertation was to evaluate the effect of orchidectomy and the effect of selected new antiepileptic drugs (zonisamide, gabapentin, pregabalin, levetiracetam) on bone metabolism in young Wistar rats.

The negative effect on bone tissue after rat orchidectomy was confirmed after 12 weeks. Orchidectomy led to a statistically significant reduction in BMD and had a negative effect on the biomechanical properties of bones. Our results confirm that young rats after orchidectomy can be considered a suitable animal model for the study of osteopenia.

After 12 weeks of administration of new antiepileptic drugs (zonisamide, gabapentin, pregabalin, levetiracetam), there was no statistically significant effect on BMD in orchidectomised rats or gonadally intact rats. In the orchidectomised rat group, a significant increase in bone markers – BALP, CTX-I and RANKL – was confirmed after the use of levetiracetam, and a significant increase in bone turnover marker RANKL was observed after the use of gabapentin and pregabalin. In gonadally intact rats, a statistically significant increase in the markers BALP and CTX-I was measured after the use of levetiracetam, while a significant increase in the bone marker sclerostin was observed with pregabalin. None of the more recent antiepileptic drugs mentioned above has been confirmed to have a statistically significant effect on the biomechanical properties of bone in either orchidectomised rats or gonadally intact rats.

Long-term administration of the newer antiepileptic drugs (zonisamide, gabapentin, pregabalin, levetiracetam) can be considered as less risky for health.

1. Úvod

Kost je metabolicky aktivní tkáň, která je neustále přestavována, což umožňuje růst v dětství a obnovu i adaptaci kostry v dospělosti. Během kostní remodelace je kostra dospělého člověka obnovena přibližně jednou za deset let. Homeostáza kostí je složitý proces, na kterém je podílejí dva hlavní typy buněk. Osteoklasty, které mají za funkci resorpci kostní tkáně a osteoblasty tvořící novou kostní tkáň. Diferenciace a aktivita těchto dvou typů buněk musí být přísně koordinována, aby bylo zachováno zdraví a integrita skeletu po celý život (Balogh et al., 2018). Za fyziologických podmínek kostní homeostázy je osteoklastická činnost úzce spjata s osteoblastickou činností tak, aby erodovaná kost byla zcela nahrazena novou kostí. Narušení této homeostatické rovnováhy ve prospěch nadměrné aktivity osteoklastů vede k abnormální remodelaci kostí a rozvoji kostních onemocnění, jako je osteoporóza (Al-Bari et al., 2020).

Osteoporóza je progresivní systémové onemocnění skeletu charakterizované úbytkem kostní hmoty a poškozením mikroarchitektury kostní tkáně vedoucí ke zvýšení křehkosti kostí a následnému zvýšení rizika zlomenin. Zlomeniny v důsledku osteoporózy jsou hlavní příčinou morbidit a mortality starších lidí (Compston et al., 2019). Vzhledem ke stárnutí populace a prodlužující se délce života představuje osteoporóza závažný celosvětový zdravotní problém. V současné době se odhaduje, že osteoporózou trpí více než 200 milionů lidí (Sözen et al., 2017).

Řada důkazů naznačuje souvislost mezi antiepileptiky (AED, antiepileptic drugs) a kostními abnormalitami včetně snížení denzity kostního minerálu (BMD) a s tím spojeného zvýšeného rizika zlomenin. Toto riziko je vyšší u uživatelů AED indukující jaterní enzymy ve srovnání s uživateli AED neindukující jaterní enzymy. Léčba AED je často podávána po dobu několika let nebo celoživotně. Je velmi důležité mít znalosti a porozumět možným metabolickým odchylkám spojeným s užíváním AED, protože většina účinků na kosti zůstává dlouho subklinická a může trvat roky, než se projeví klinicky (Arora et al., 2016; Pack, 2003; Barnsley et al., 2021).

2. Kost

2.1 Anatomie kosti a funkční morfologie kosti

Kost je specifická pojivová tkáň s vysoce mineralizovanou architekturou a strukturou. Zastává mnoho nezbytných funkcí v lidském těle. Slouží jako mechanická opora, poskytuje ochranu mozku a splanchnickým orgánům a je místem hematopoézy. Kost je také primárním zdrojem a zásobárnou anorganických iontů, zejména fosfátu a vápníku, které se mohou aktivně podílet na homeostáze minerálů a energetickém metabolismu v těle (Shi et al., 2020).

Povrch kosti je tvořen vrstvou kolagenního vaziva, které se na vnitřní straně nazývá endost a na vnější straně periost. Obě struktury se skládají z vnější vazivové tkáně a vnitřní buněčné vrstvy tvořené osteoprogenitorovými buňkami a preosteoblasty. Endost je mnohem tenčí než periost a zajišťuje výživu kosti. Je také zdrojem nových osteoblastů, které jsou potřebné k růstu a remodelaci kosti. Periost je tvořen hustým kolagenním vazivem s četnými fibroblasty, kolagenními vlákny, cévami a je zde velké množství nervových zakončení. Kolagenní vlákna, která vycházejí z vnější vrstvy periostu přímo do kostní matrix a pevně ukotvují periost ke kostní tkáni se nazývají Sharpeyova vlákna (Buck et al., 2012).

2.2 Klasifikace kostí

Kostní tkáň se dělí na dva typy: Primární nezralá vláknitá kost a sekundární zralá lamelární kost.

Primární kost se vyskytuje v rané fázi ontogeneze a při regeneraci kostí, později je nahrazena lamelární kostní tkání.

Zralá lamelární kost se podle lokalizace a zátěže dělí na dva strukturální podtypy- kompaktní (kortikální) kost a trabekulární (spongiózní) kost. Lidská kostra se skládá přibližně z 20 % z trabekulární kosti a z 80 % z kortikální kosti (Chappard et al., 2008; Barnsley et al., 2021). Kortikální kost je tvořena lamelami ze svazků paralelně uspořádaných kolagenních vláken v amorfní mezibuněčné hmotě. Lamely jsou koncentricky uspořádány kolem centrálního (Haversova) kanálku, který obsahuje

krevní kapiláry a nervová vlákna. Osteon, neboli Haversův systém je základní stavební jednotkou kosti. Pro komunikaci s ostatními Haversovými kanálky slouží šikmé Volkmannovy kanálky, které zajišťují přívod cév a nervových vláken z periostu k Haversovým kanálkům. Volkmannovy kanálky nejsou obaleny lamelami (Cowan et al., 2023).

Kompaktní a spongiózní kost jsou si velmi podobné svým buněčným a molekulárním složením, ale výrazně se liší svou funkcí a mechanickými vlastnostmi (Grabowski, 2009). Kompaktní kost je hustá, tvrdá kostní tkáň s nízkou mírou kostního obratu, přibližně 3 % ročně. Udržuje mechanickou pevnost a integritu kosti. Naproti tomu trabekulární kost, která se nachází především v dutině dlouhých kostí a obratlích, má rychlost kostního obratu přibližně 26 % za rok, má nižší obsah mineralizovaných látek a je metabolicky aktivnější. Klinicky významné je, že většina osteoporotických zlomenin se vyskytuje v trabekulární kosti, která podléhá remodelaci mnohem více než kortikální kost (Barnsley et al., 2021).

Kompaktní kost tvoří diafýzu dlouhých kostí. Jedná se o systémem paralelně uspořádaných osteonů, povrch sestává z rovnoběžně probíhajících kostních lamel. Spongiózní kost se vyskytuje v epifýzách dlouhých kostí a krátkých kostech. Je tvořena lamelózně uspořádanými trámci kostí, vytvářejími prostorovou síť. Tvar této sítě se mění v průběhu celého života díky působení různých mechanických sil (Brandi, 2009).

2.3 Složení kosti

Složení kostí se liší s ohledem na věk, anatomické umístění, způsobu stravování a vlivu onemocnění. Obecně se kost dospělého člověka skládá z buněk a extracelulární kostní matrix, která tvoří 90 % celkového objemu kosti.

2.3.1 Kostní matrix

Kostní matrix obsahuje organické (35 %) a anorganické (65 %) složky, vodu (5-10 %) a lipidy (1-5 %).

Anorganická složka

Anorganickou složku tvoří převážně vápník a fosfor ve formě hydroxyapatitu, zbytek tvoří uhličitan vápenatý, fluorid vápenatý a hořečnatý. Obsah minerálních látek je rozhodující pro mechanické vlastnosti kosti. Všechny minerální látky dodávají kostní tkáni pevnost. S klesajícím obsahem minerálů v kosti klesá pevnost kosti a zvyšuje se riziko zlomenin (Lin et al., 2020; Wang et al., 2010).

Organická složka

Organická matrix, tvořená osteoblasty, se skládá především z kolagenu typu I (přibližně 90 %). Jedná se o trojitou šroubovici tvořenou jedním řetězcem α_2 a dvěma řetězci α_1 . Organická matrix obsahuje také proteoglykany, které jsou charakterizovány přítomností glykosaminoglykanových (GAG) zbytků kovalentně vázaných na proteinové jádro. Mezi 5 typů GAG zbytků, které se v proteoglykanech vyskytují, patří keratansulfát, chondroitinsulfát, heparansulfát, kyselina hyaluronová a dermatansulfát. Součástí organické matrix jsou také glykoproteiny obsahující kovalentně připojené molekuly sacharidů na bílkovinném řetězci v různých kombinacích a polohách (osteokalcin, osteonektin, kostní sialoprotein, osteopontin) a růstové faktory. Mezi růstové faktory řadíme zejména kostní morfogenetické proteiny, rodinu transformujících růstových faktorů, interleukin-1, interleukin-6. Všechny tyto faktory hrají důležitou roli v osteogenezi, mineralizaci a remodelaci kostí. Organická matrix dává kosti její tvar a zajišťuje odolnost vůči tahovým silám (Shi et al., 2020; Buck et al., 2012; Lin et al., 2020).

2.3.2 Buňky kostní tkáně

Kost má schopnost sebeobnovy, dokáže při metabolických nárocích pružně uvolňovat zásoby minerálů a přetvářet strukturu na základě mechanických podnětů. Na tvorbě, resorpci a udržování kosti se podílejí různé typy buněk: osteoblasty, osteocyty a osteoklasty (Shi et al., 2020). Kostní buňky tvoří asi 10 % celkového objemu kosti. Vznikají ze dvou buněčných linií: z mezenchymálních kmenových buněk, které se následně diferencují v osteoblasty a osteocyty, a osteoklastů, které jsou hematopoetického původu (Buck et al., 2012).

Osteoblasty

Osteoblasty pocházejí z multipotentních mezenchymálních kmenových buněk (MSC). Aby mohly plnit svou úlohu, musí MSC nejprve migrovat do místa aktivní kostní resorpce, kde se prolifерují a diferencují v aktivní osteoblasty. Migrace MSC je regulována růstovými faktory uloženými v kostní matrix a uvolňovanými během kostní resorpce. Zejména se jedná o transformující růstový faktor beta 1 (TGF- β 1), růstový faktor odvozený od destiček (PDGF), kostní morfogenetický protein 2 (BMP2) a kostní morfogenetický protein 4 (BMP4) (Balogh et al., 2018).

Osteoblasty jsou mononukleární buňky kubického tvaru s četnými výběžky, kterými jsou v kontaktu s dalšími osteoblasty. Nacházejí se na povrchu tvořících se kostních trámčů, uspořádané jako jednovrstevný epitel v řadě vedle sebe, ale postupně se zanořují do nově tvořené kosti. Osteoblasty tvoří 4-6 % všech kostních buněk. Z funkčního hlediska jsou osteoblasty dobře známy pro své výrazné kostitvorné schopnosti prostřednictvím syntézy a ukládání organické matrix a účasti na následné mineralizaci kosti. Během tohoto procesu osteoblasty produkují kolagen, převážně kolagen typu I, nekolagenní proteiny a proteoglykany, které tvoří organickou matrix. Osteoblasty také vykazují aktivitu kostní izoformy alkalické fosfatázy (BALP), která přispívá k mineralizaci kosti. Životnost osteoblastů je 1 až 10 týdnů. Část osteoblastů se mění na osteocyty (cca 15 %) a část na tzv. kost lemující buňky (bone lining cells), zbytek podléhá apoptóze. (Balogh et al., 2018; Shi et al., 2020).

Osteocyty

Osteocyty jsou nejhojněji zastoupenou skupinou buněk, tvoří 90 % všech kostních buněk. Vznikají z osteoblastů obklopených organickou matrix. Fungují jako primární mechanosenzory a hrají klíčovou roli při iniciaci remodelace kosti. Tvoří lakuny a jsou spojeny s ostatními osteocyty a kostním povrchem kanálky, umožňující kosti reagovat na stimul ve velkém rozsahu. Signalizují nutnost reparace na nejvíce namáhaných místech kosti, udržují homeostázu vápníku. Životnost osteocytů je kolem 25 let (Balogh et al., 2018; Shi et al., 2020).

Kost lemující buňky

Kost lemující buňky (Bone-lining cells, BLCs) jsou hojně zastoupeným, avšak málo prozkoumaným typem buněk v kostech. Jedná se o neaktivní osteoblasty vyznačující se dlouhým štíhlým vzhledem a nacházející se na povrchu kosti. Podílejí se na normální kostní remodelaci a jsou zdrojem aktivních osteoblastů. Např. krátkodobá léčba parathormonem může vyvolat přeměnu BLC na aktivní osteoblasty. Předpokládá se, že kost lemující buňky hrají roli v kostní remodelaci tím, že brání nevhodné interakci prekurzorů osteoklastů s povrchem kosti (Lee et al., 2021).

Osteoklasty

Osteoklasty jsou velké vícejaderné buňky, které pocházejí z buněk monocytomakrofágové linie. Nejdůležitější vlastností osteoklastů je jejich schopnost resorbovat plně mineralizovanou kost. Resorpce začíná aktivací osteoklastů, která vyžaduje, aby se osteoklasty připojily k povrchu kosti. K resorpci kosti pak dochází v resorpčních jamkách tzv. Howshipových lakunách, která jsou místem uvolňování proteolytických enzymů a kyselin za účelem degradace matrix a rozpouštění minerálů. Po procesu degradace se osteoklasty stávají neaktivními nebo přímo odumírají prostřednictvím buněčné apoptózy. Je známo mnoho hormonů a cytokinů, které regulují tvorbu a aktivitu osteoklastů, včetně ligandu vázajícího se na receptor aktivující nukleární faktor kappa B (RANKL), osteoprotegerinu, interleukinu-1, interleukinu-6, faktoru stimulujícího kolonie makrofágů, parathormonu, 1,25-dihydroxyvitamínu D a kalcitoninu (Buck et al., 2012; Shi et al., 2020).

2.4 Kostní modelace

Proces kostní modelace je zodpovědný za tvorbu a udržování tvaru kosti. Kostní modelace probíhá odstraněním části kosti z jednoho místa a tvorbou kosti na jiných místech nezávislým působením osteoblastů a osteoklastů. K modelaci dochází nejen během růstu, ale také nízkou měrou po celý život, v reakci na mechanickou zátěž (Langdahl et al., 2016).

2.5 Remodelace kosti

Udržování kostní struktury je neustálý proces s dynamickou rovnováhou mezi kostní formací a resorpcí. Nejprve dochází k odstranění staré kostní tkáně osteoklasty a nahrazení nově vytvořenou kostní tkání osteoblasty. Rovnováha mezi oběma fázemi je klíčová pro udržení kostní hmoty (Siddiqui et al., 2014; Barnsley et al., 2021). Poruchy v tomto procesu mohou podporovat buď zvýšený nebo snížený kostní obrat. Hustota kostního minerálu je nejvyšší mezi 20.-30. rokem a poté postupně klesá (Svalheim 2011). Kostra dospělého člověka je kompletně remodelována každých 10 let (Langdahl et al., 2016). Kostní remodelace slouží k udržení mechanické integrity kostí a regulaci kalciofosfátového metabolismu. U zdravých jedinců se každý rok tímto procesem obnoví cca 10 % kostry. Remodelace probíhá jak v kosti trámčité, tak i v kortikální kosti. K remodelaci dochází v tzv. základních mnohobuněčných jednotkách kosti (BMU-basic multicellular unit) a celý cyklus trvá 120-200 dní. Je odhadováno, že se každoročně aktivují 3–4 miliony remodelačních jednotek, z čehož je aktuálně aktivních asi 1 milion. Cyklus remodelace probíhá v pěti po sobě jdoucích fázích: aktivace, resorpce, reverze, formace a ukončení (Kenkre et al., 2018).

Aktivace

První fáze remodelace kosti zahrnuje detekci iniciačního remodelačního signálu. Signálem může být přímé mechanické namáhání kosti, které vede ke strukturálnímu poškození nebo působení hormonů (např. estrogeneru nebo parathormonu) na osteocyty, které jsou v přímém kontaktu s kost lemuujícími buňkami. Aktivace klidového povrchu kosti je zprostředkována osteocyty, které exprimují peptid tzv. ligand vázající se na receptor aktivující nukleární faktor kappa B (RANKL-receptor activator of nuclear factor kappa B ligand), který interaguje s receptorem aktivujícím nukleární faktor kappa B (RANK) na prekurzorech osteoklastů, které se následně diferencují v mnohojaderné osteoklasty. Exprese faktoru stimulujícího kolonie makrofágů (M-CSF) v osteoblastech rovněž podporuje diferenciaci prekurzorů osteoklastů. Osteoblasty produkují řadu chemokinů, které aktivují prekurzory osteoklastů, a matrixové metaloproteinázy, které degradují nemineralizovaný osteoid a odhalují adhezni místa pro uchycení osteoklastů (Barnsley et al., 2021).

Resorpce

Osteoklasty zodpovídají za kostní resorpci. Pumpují vodíkové protony, které jsou tvořeny karboanhydrázou II do resorpčního oddílu tzv. Howshipové lakuny, kde rozpouštějí kostní minerál. Následně je kostní matrix bohatá na kolagen degradována proteázami jako je kyselá fosfatáza, katepsiny, glykosidáza, sulfatáza, kolagenáza. Resorpční fáze je ukončena programovanou buněčnou smrtí osteoklastů, která zajišťuje, že nedochází k nadměrné resorpci kosti (Kenkre et al., 2018; Barnsley et al., 2021).

Reverzní fáze

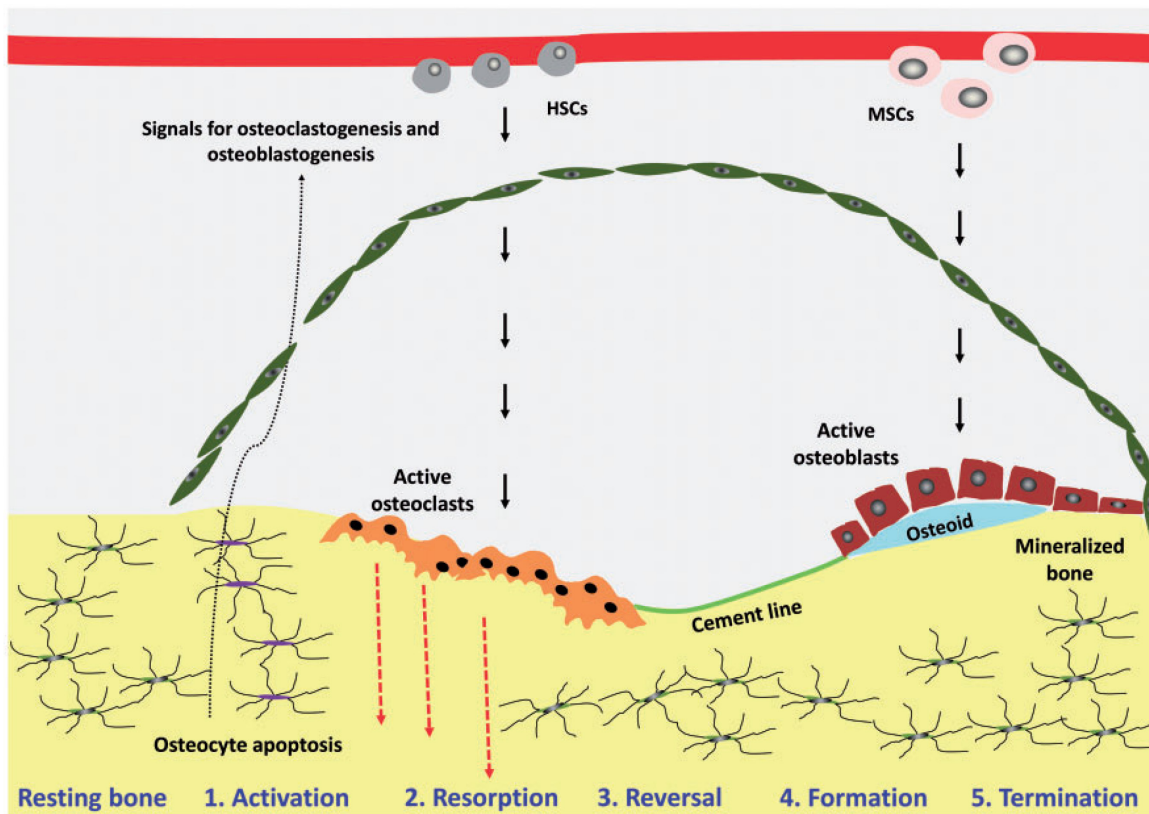
Reverzní fáze neboli fáze zvratu začíná osteoklastickou signalizací, která přetrvává přibližně 4 až 5 týdnů a je v konečném důsledku zodpovědná za klíčové propojení osteoklastické a osteoblastické aktivity pozorované v místech remodelace. Do míst resorbované kosti nasedají osteoblasty a připravuje se novotvorba kosti (Kenkre et al., 2018; Barnsley et al., 2021).

Fáze tvorby

Fáze tvorby trvá přibližně 4 měsíce. Osteoblasty syntetizují a vylučují osteoidní matrix bohatou na kolagen typu 1 a podílejí se na regulaci mineralizace osteoidu. Tvorba kosti je dokončena, když je osteoid postupně mineralizován zabudováním hydroxyapatitu. Na konci tvorby kosti je přibližně 10 až 15 % zralých osteoblastů obklopeno novou kostní matrix a diferencuje se v osteocyty. Osteocyty hrají klíčovou roli při signalizaci konce remodelace. V klidovém stavu osteocyty exprimují sklerostin, který brání signalizaci WNT v osteoblastech (Kenkre et al., 2018; Barnsley et al., 2021).

Terminace

Remodelační cyklus končí sérií dosud neurčených ukončovacích signálů. Znovu se obnoví klidový povrch kosti až do dalšího cyklu. (Barnsley et al., 2021).



Obr. 1: Znárodnění remodelace kosti (Kenkre et al., 2018)

2.6 Regulace kostní remodelace

Metabolismus kostní tkáně je regulován mnoha endokrinními a parakrinními signály.

2.6.1 Systémová regulace

2.6.1.1 Hormony regulující hladinu vápníku

Parathormon (PTH)

PTH je hormon syntetizovaný a vylučovaný příštítnými tělísky. Parathormon je nejdůležitějším regulátorem homeostázy vápníku. Udržuje koncentraci vápníku v séru stimulací kostní resorpce, zvyšuje renální tubulární reabsorpci vápníku a renální produkci kalcitriolu. PTH může mít na kost katabolické i anabolické účinky. Účinek PTH na indukci tvorby osteoklastů je zprostředkován přes osteoblasty stimulací RANKL a inhibicí exprese mRNA osteoprotegerinu (OPG). Nízká koncentrace PTH stimuluje

tvorbu kosti a naopak při kontinuální sekreci vysokých hladin PTH dochází k resorpci kosti (Siddiqui et al., 2016; Hadjidakis et al., 2006).

Calcitriol (1,25(OH)₂ Vitamin D₃)

Kalcitriol, nazývaný také 1,25 dihydroxyvitamín D, se tvoří z vitamínu D₃ nejprve 25-hydroxylací v játrech a následnou 1-hydroxylací v ledvinách. Kalcitriol je nezbytný pro zvýšení střevní absorpce vápníku a fosforu, reabsorpci vápníku v ledvinách, a tím podporuje mineralizaci kostí. Kromě toho má významné anabolické účinky na kost aktivací osteoblastů k syntéze kolagenu a inhibicí osteoklastické aktivity. Tvorba kalcitriolu je regulována PTH v závislosti na koncentraci vápníku v krvi. Vitamin D není esenciálním prvkem potravy a může se vytvářet v kůži působením ultrafialového slunečního záření z 7-dehydrocholesterolu. Nedostatek vitamínu D způsobuje patologickou mineralizaci kosti a vede k onemocnění, které se u dětí nazývá křivice a u dospělých osteomalacie (Ko et al., 2020; Office of the Surgeon General, 2004).

Kalcitonin (CT)

Kalcitonin (CT) je hormon o 32 aminokyselinách, který je vylučován parafolikulárními (C-buňkami) štítné žlázy. Kalcitonin má opačný účinek než PTH. Kalcitonin může blokovat kostní resorpci přímou inaktivací osteoklastů. Snižuje hladinu vápníku v séru nejen omezením kostní resorpce, ale i zvýšením příjmu vápníku trávicím traktem. Nadbytek nebo nedostatek kalcitoninu u dospělých nezpůsobuje problémy s udržením koncentrace vápníku v krvi nebo pevností kostí. (Ko et al., 2020; Office of the Surgeon General, 2004; Siddiqui et al., 2016).

2.6.1.2 Pohlavní hormony

Ženské a mužské pohlavní hormony jsou velmi důležité pro regulaci růstu kostry, udržování kostní hmoty a pevnosti kostí.

Estrogeny

Jsou identifikovány čtyři typy estrogenů: nejznámější a nejúčinnější 17 β -estradiol (E2) syntetizovaný ve vaječnících od puberty do menopauzy, estron (E1) produkovaný během menopauzy, estriol (E3) uvolňovaný během těhotenství placentou a estetrol (E4) syntetizovaný játry plodu. Estrogeny jsou jedním z hlavních hormonálních regulátorů kostního metabolismu u žen i mužů. Postmenopauzální osteoporóza je charakterizována zvýšenou osteoklastickou resorpcí kosti oproti osteoblastické tvorbě kosti, což vede k úbytku kostní hmoty (Kenkre, 2018). Estrogeny působí prostřednictvím dvou receptorů, estrogenového receptoru alfa (ER α) a beta (ER β), přičemž receptor ER α je důležitější pro regulaci kostního metabolismu. Estrogeny oslabují osteoklastogenezi a stimulují apoptózu osteoklastů. Snižují reaktivitu progenitorových buněk osteoklastů na RANKL, čímž zabraňují tvorbě aktivních osteoklastů. Kromě toho estrogeny stimulují proliferaci osteoblastů a snižují jejich apoptózu. Bylo také prokázáno, že estrogeny modulují produkci řady cytokinů podporujících obnovu kostí, včetně IL-1, IL-6, TNF- α , M-CSF a prostaglandinů (Hadjidakis et al., 2006; Siddiqui et al., 2016; Noirrit-Esclassan et al., 2021).

Androgeny

Androgeny jsou nezbytné pro růst a udržování kostry prostřednictvím jejich účinku na androgenní receptor, který je přítomen ve všech typech kostních buněk (Hadjidakis et al., 2006). Nedostatek androgenů vede u mužů ke zvýšené kostní remodelaci a úbytku kostní hmoty. Určitá část úbytku kostní hmoty je způsobena i sníženou hladinou estrogenů vznikajících konverzí testosteronu prostřednictvím enzymu aromatázy v tukových buňkách. Ve skutečnosti mají starší muži vyšší hladiny cirkulujících estrogenů než ženy po menopauze (Office of the Surgeon General, 2004; Leder et al., 2020). Nejnovější důkazy naznačují, že androgeny mohou nepřímo inhibovat aktivitu osteoklastů a resorpci kostí působením na osteoblasty/osteocyty a systém RANKL/RANK/OPG (Kenkre et al., 2018).

2.6.1.3 Hormony štítné žlázy

Osa hypotalamus-hypofýza-štítná žláza hraje důležitou roli ve vývoji kosti po dobu fetálního období, po dobu modelace v dětství a během remodelace v dospělosti. Hormony štítné žlázy stimulují resorpci i tvorbu kosti. Tyreotoxikóza je prokázanou příčinou sekundární osteoporózy a je spojena jak se zvýšenou osteoblastickou tvorbou kosti, tak se zvýšenou osteoklastickou resorpcí kosti. Dochází ke zvýšení kostního obrátu s narušeným cyklem tvorby kosti, což vede k remodelačnímu procesu upřednostňujícímu rychlou resorpci, mající za následek 10% ztrátu kosti na jeden remodelační cyklus (Kenkre et al., 2018; Siddiqui et al., 2016). Naproti tomu nedostatek hormonů štítné žlázy vede k prodloužení cyklu remodelace kosti s nízkým kostním obrátem (Kenkre et al., 2018).

2.6.1.4 Glukokortikoidy

Glukokortikoidy mohou ovlivňovat fyziologickou kostní remodelaci zvýšením kostní resorpce a snížením kostní formace. Glukokortikoidy inhibují diferenciaci a funkci osteoblastů a zvyšují jejich apoptózu. Naopak zvyšují osteoklastickou resorpci kosti snížením exprese OPG a zvýšením exprese RANKL osteoblasty a zvýšením exprese RANK v osteoklastech. Dlouhodobá léčba glukokortikoidy snižuje hustotu kostního minerálu a může vést k rozvoji glukokortikoidy indukované osteoporózy. Glukokortikoidy navíc negativně regulují sekreci androgenů a estrogenů inhibicí sekrece gonadotropinů a v konečném důsledku zvyšují kostní resorpci. Vyvolávají také negativní bilanci vápníku snížením střevní absorpce vápníku a jeho zvýšené vylučování močí (Kenkre et al., 2018; Siddiqui et al., 2016; Hadjidakis et al., 2006).

2.6.1.5 Růstový hormon (GH), inzulínu podobný růstový faktor I (IGF-I)

Růstový hormon (GH) je peptidový hormon o 191 aminokyselinách tvořený předním lalokem hypofýzy. Jedná se o důležitý regulátor růstu kostry, lidé s nedostatkem GH mají narušený longitudinální růst kostí. Supplementace GH u dospělých a dětí s jeho nedostatkem má pozitivní účinky na skelet, včetně zvýšení BMD a markerů kostního obrátu. GH spolu se svým vazebným proteinem (GHBP) stimuluje proliferaci

osteoblastů a produkci kolagenu buď přímo prostřednictvím GH receptoru (GHR) a/nebo nepřímo stimulací jaterní a kosterní exprese IGF-I a vazebného proteinu IGF (IGFBP) (Siddiqui et al., 2016; Office of the Surgeon General, 2004).

Inzulínu podobný růstový faktor I (IGF-I) je polypeptidový anabolický hormon obsahující 70 aminokyselinových zbytků. Je vytvářen ve velkém množství v játrech, kde je jeho syntéza závislá na růstovém hormonu a uvolňován do oběhu. K produkci dochází i lokálně v jiných tkáních, zejména v kostech, rovněž pod kontrolou růstového hormonu. Produkci IGF-I v osteoblastech stimuluje také PTH, hormony štítné žlázy a estrogeny, naopak glukokortikoidy působí inhibičně. Hraje klíčovou roli ve všech aspektech vývoje skeletu a remodelace kostí podporou proliferace, diferenciaci a funkce chondrocytů, osteoblastů a osteoklastů (Lee et al., 2021; Office of the Surgeon General, 2004). Primární funkcí IGF-I je udržování kostní hmoty a homeostázy skeletu během remodelace (Siddiqui et al., 2016). Studie potvrdily, že IGF-I pozitivně koreluje s kostní densitou a v krvi pacientů s osteoporózou je významně snížen (Feng et al., 2021). U myší vyřazení IGF-I bylo spojeno s poklesem počtu osteoblastů a sníženou schopností tvorby kostí (Salih et al., 2005). V předpubertálním období určuje longitudinální růst kostí a získání maximální kostní hmoty. V osteoblastech působí IGF-I stimulačně na novotvorbu kostí zvýšením tvorby kolagenu typu I a syntézou osteoprotegerinu. Pravděpodobně podporuje také tvorbu RANKL v osteoblastech a tím stimuluje osteoklastogenezi (Ueland 2005).

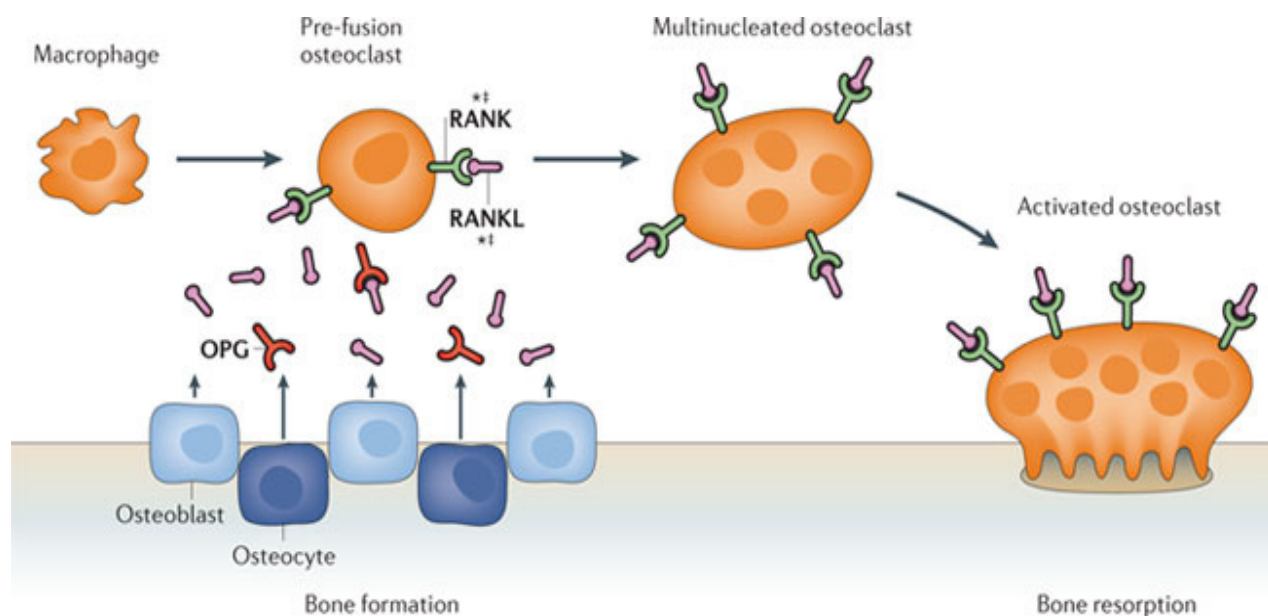
2.6.2 Lokální regulace

2.6.2.1 Signální dráha RANKL/RANK/OPG

Identifikace signální dráhy RANKL/RANK/OPG v 90. letech 20. století znamenala zásadní průlom v pochopení regulace osteoklastogeneze v remodelačním cyklu (Kenkre et al., 2018).

Osteoblastické buňky produkují faktor stimulujiícího kolonie makrofágů (M-CSF- makrophage colony stimulating factor) a ligand vázající se na receptor aktivující nukleární faktor kappa B (RANKL- receptor activator of nuclear factor kappa B ligand), které se vážou na receptory na prekurzorech osteoklastů, stimuluji jejich proliferaci a diferenciaci a zvyšují aktivitu osteoklastů. RANKL je nový člen rodiny ligandů tumor

nekrotizujícího faktoru (TNF), označovaný také jako TRANCE (TNF-related activation-induced cytokine) nebo osteoprotegerin ligand (OPGL). RANKL interaguje s receptorem na prekurzorech osteoklastů zvaným RANK (receptor aktivující nukleární faktor kappa B). Interakce RANKL/RANK vede k aktivaci, diferenciaci a fúzi hematopoetických buněk linie osteoklastů, které tak zahájí proces resorpce. Kromě toho také prodlužuje přežívání osteoklastů potlačením jejich apoptózy. Účinky RANKL jsou blokovány osteoprotegerinem (OPG), sekrečním dimerním glykoproteinem patřícím do rodiny receptorů TNF s molekulovou hmotností 120 kDa. OPG funguje jako antagonist pro RANKL a je produkován především buňkami osteoblastové linie, ale může být produkován i jinými buňkami v kostní dřeni. Po navázání OPG na RANKL se zablokuje schopnost tohoto ligandu vázat se na RANK. OPG reguluje kostní resorpci tím, že inhibuje konečnou diferenciaci a aktivaci osteoklastů a indukuje jejich apoptózu. Snížená produkce OPG způsobuje osteoporózu (Kenkre et al., 2018; Hadjidakis 2006). Parathormon, interleukin-11, prostaglandin E2 (PGE2) a 1,25-dihydroxyvitamín D zvyšují expresi RANKL na povrchu osteoblastů, a tím indukují aktivitu osteoklastů. (Lee et al., 2021). Poměr RANKL-OPG je důležitým regulátorem kostní hmoty a integrity skeletu (Balogh et al., 2018).



Obr. č. 2: Signální dráha RANKL/RANK/OPG (Richards et al., 2012)

2.6.2.2 Kostní morfogenetické proteiny (BMPs)

Kostní morfogenetické proteiny (BMPs-Bone morphogenetic proteins) jsou sekretované signální molekuly patřící do nadrodiny růstových faktorů TGF- β (transforming growth factor- β). U lidí bylo identifikováno více než 20 členů, které hrají různou funkci v průběhu procesů embryogeneze, kostní tvorby, hematopoézy a neurogeneze (Bragdon et al 2011). BMPs jsou syntetizovány jako neaktivní velké polypeptidy o přibližně 400-525 aminokyselinách, které obsahují signální peptidy na svých amino koncích a zralé polypeptidy na karboxylových koncích. BMPs jsou homodimery o velikosti 30 až 38 kDa a všechny mají podobné sekvence. Monomery BMPs obsahují sedm cysteinů, z nichž šest tvoří intramolekulární disulfidové vazby. Zbývající sedmý cysteinový zbytek se podílí na dimerizaci s jiným monomerm BMPs prostřednictvím kovalentní disulfidové vazby, čímž vzniká biologicky aktivní dimerní ligand pro aktivaci receptoru BMPs (Katagiri et al., 2016; Chen et al., 2004). BMPs účinkují prostřednictvím dvou typů serin-threoninových kinázových transmembránových receptorů, receptorů typu I (Receptor typu IA a IB) a typu II. Navázáním BMP na receptor typu II dojde k fosforylaci a následné aktivaci receptoru typu I. Po navázání BMP na receptor typu I dochází k fosforylaci transkripčních faktorů Smad1/Smad5/Smad8, které spolu se Smad4 vytváří komplex. Tento komplex se přesouvá do jádra buňky, kde navozuje transkripci cílových genů (Katagiri et al., 2016; Wang et al 2014). Poprvé byla aktivita BMPs popsána v polovině 60. let minulého století, kdy byla zjištěna jejich schopnost indukovat ektopickou kostní tvorbu. BMPs zaujmají klíčovou roli při diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk na osteoblastickou linii. Navíc se BMPs podílejí na enchondrální osifikaci a chondrogenézi. Bylo zjištěno, že BMP-2, -4, -5, -6 a -7 mají silnou osteogenní schopnost a jejich signalizace je nezbytná pro remodelaci kostí a udržení kostní hmoty prostřednictvím aktivace receptorů BMP typu IA a IB (Siddiqui et al., 2016; Lademann et al., 2020). BMP-2, enormně zvyšuje expresi osteokalcinu a krátkodobá exprese BMP-2 je dostatečná k indukci tvorby kosti. Ztráta BMP-2 i BMP-4 vedla k závažnému narušení osteogeneze (Siddiqui et al., 2016).

2.6.2.3 Sklerostin

Sklerostin je malý glykoprotein exprimovaný genem SOST v osteocytech, který je znám jako negativní regulátor tvorby kosti. Ačkoli byl sklerostin původně popsán jako antagonist BMP, nyní je studován především jako negativní regulátor signalizace Wnt. Signalizace Wnt se ukázala jako důležitá regulační dráha při osteogenní diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk. Indukce signální dráhy Wnt podporuje tvorbu kosti, zatímco inaktivace této dráhy vede k osteopenickým stavům (Kim et al., 2013). Navázáním sklerostinu na své receptory na povrchu buněk osteoblastů se spustí následná kaskáda intracelulární signalizace, jejímž konečným účinkem je inhibice osteoblastické tvorby kosti. Bylo prokázáno, že sloučeniny, které inhibují sklerostin, stimulují tvorbu kosti a snižují kostní resorpci, přičemž dochází k výraznému zvýšení BMD. Produkci sklerostinu osteocyty inhibuje parathormon, mechanická zátěž, estrogen a cytokiny včetně prostaglandinu E2. Produkci sklerostinu zvyšuje kalcitonin (Lewiecki, 2014; Appelman-Dijkstra et al., 2014; Wang et al., 2021).

2.7 Markery kostního obratu

Markery kostního obratu umožňují hodnotit resorpci a tvorbu kostí měřením jejich koncentrace v krvi a/nebo moči a odráží aktivitu kostní remodelace, přičemž samy nemají žádnou kontrolní nebo regulační funkci v kostním metabolismu (Eastell et al., 2017; Vasikaran et al., 2011). Ideální kostní marker je specifický pro kostní tkáň a pro jeho analýzu je k dispozici přesná a precizní laboratorní metoda (Hlaing et al., 2014). V klinické praxi je hlavní indikací ke stanovení kostních markerů monitorování efektu léčby. Mohou být nápomocné také při hodnocení rizika vzniku zlomenin spolu s měřením hodnoty BMD a zhodnocením dalších klinických rizikových faktorů (Vasikaran, 2008). Rozlišujeme markery novotvorby kosti reflektující enzymatickou aktivitu osteoblastů a syntézu bílkovin kostní matrix a markery odbourávání kosti, které reflektují enzymatickou aktivitu osteoklastů a degradaci bílkovin kostní matrix (Hlaing et al., 2014). Výhodou kostních markerů je jejich dostupnost a snadný odběr naopak nevýhodou je biologická a cirkadiánní variabilita.

2.7.1 Markery kostní formace

2.7.1.1 Kostní alkalická fosfatáza (BALP)

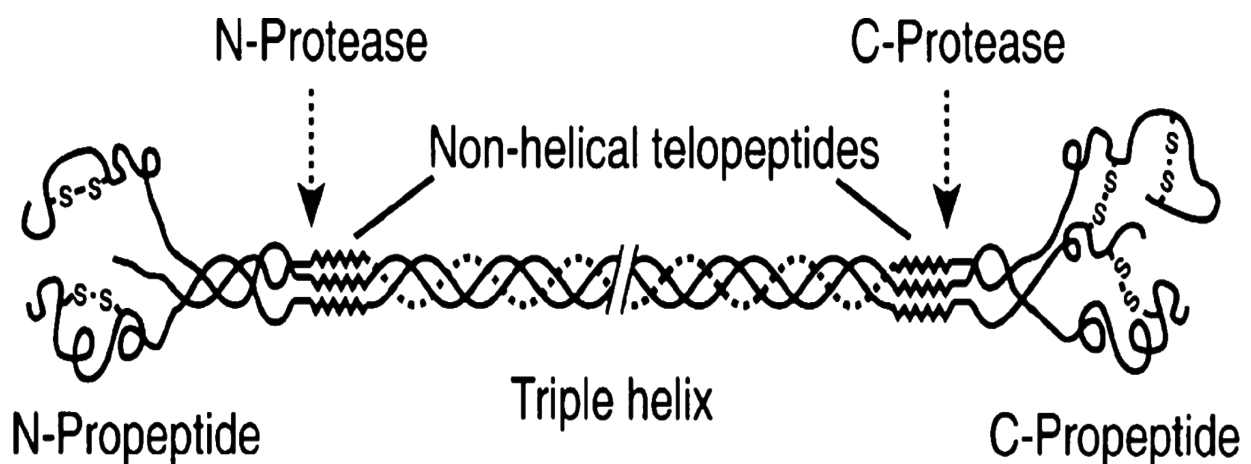
Kostní alkalická fosfatáza (BALP) je jedním z nejčastěji používaných biochemických markerů tvorby kosti. Je produkována osteoblasty a její hladina pozitivně koreluje s mírou tvorby kosti měřenou histomorfometricky. Kostní ALP má nízkou biologickou variabilitu a není ovlivněna příjmem potravy ani funkcí ledvin (Hlaing et al., 2014). Rozlišujeme 4 izoenzymy alkalické fosfatázy (ALP) – střevní, embryonální, placentární a tkáňově nespecifické (kostní, jaterní a ledvinová izoforma enzymu). Kostní izoenzym je klíčový při mineralizaci osteoidu. U zdravých jedinců převažuje jaterní a kostní ALP, které tvoří přibližně 90 % celkové ALP (Brady et al., 2018). Fyziologicky zvýšené hodnoty nalézáme u dětí a v adolescenci.

2.7.1.2 Osteokalcin (OC)

Osteokalcin (OC) je malý nekolagenní protein, který je po kolagenu hlavní bílkovinou kostní matrix. Je syntetizovaný osteoblasty a jeho syntéza je stimulována 1,25-dihydroxyvitamínem D. Před uvolněním do extracelulární matrix prochází OC gama-karboxylací, během které se kyselina gama-karboxyglutamová váže v polohách 17, 21 a 24. Na této reakci se podílí gama-karboxyláza a je nutná přítomnost vitamínu K. Proces karboxylace vede ke konformační změně proteinu, která umožňuje vazbu OC s hydroxyapatitem a mineralizaci kostní matrix. Pouze 10-30 % syntetizovaného osteokalcinu se dostane do oběhu a zbytek zůstává vázán v kostní matrix. Při nedostatku vitamínu K se tvoří nefunkční nekarboxylovaný osteokalcin. Nekarboxylovaný osteokalcin představuje 1/3 celkového osteokalcinu. Během resorpce, kdy dochází k destrukci kostní matrix, přechází část osteokalcinu, který je vázán na kost, do cirkulace. OC má v cirkulaci krátký poločas (5 min) a je rychle degradován na fragmenty. OC má malou molekulu a snadno proniká zdravým glomerulem, z tohoto důvodu roste jeho plazmatická koncentrace u pacientů s renální insuficiencí (Hlaing et al., 2014; Moser et al., 2019).

2.7.1.3 N-terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP) a C-terminální propeptid prokolagenu typu I (PICP)

Propeptidy prokolagenu typu I vznikají při syntéze kolagenu typu I, který tvoří 90% organické kostní matrix. Kolagen typu I je odvozen od svého prekursoru, prokolagenu, který je syntetizován osteoblasty. Molekula prokolagenu obsahuje amino- a karboxy-terminální zakončení, která jsou při extracelulárním štěpení enzymaticky odstraněna, čímž vzniká kolagen typu I. Výsledkem tohoto štěpení je uvolnění N-koncového propeptidu prokolagenu typu I (PINP) a C-koncového propeptidu prokolagenu typu I do cirkulace (PICP). Výsledný kolagen je tvořený dvěma řetězci $\alpha 1$ a jedním řetězcem $\alpha 2$ a tvoří tzv. triple helix. Vzhledem k tomu, že molekuly PINP a PICP jsou produkovány v ekvimolárním množství s molekulou kolagenu typu I, lze očekávat, že jejich koncentrace v cirkulaci odráží rychlost tvorby kosti. PICP je globulární polypeptid s molekulovou hmotností 100 kDa, který obsahuje intrařetězcové i interřetězcové disulfidické můstky. PINP je menší polypeptid s molekulovou hmotností 35 kDa a obsahuje pouze intrařetězcové disulfidické můstky (Hlaing et al., 2014). PINP má velmi nízkou cirkadiánní a biologickou variabilitu, není ovlivněn příjmem potravy a v séru je velmi stabilní. Z tohoto důvodu byl označen za nejslibnější marker tvorby kostí a za referenční marker tvorby kostí u osteoporózy Mezinárodní nadací pro osteoporózu (IOF) a Mezinárodní federací klinické chemie a laboratorní medicíny (IFCC) a schválen Národní aliancí pro zdraví kostí (NBHA) v USA (Gillett et al., 2021).



Obr. č. 3: Vznik kolagenu typu I z prokolagenu (Vasikaran, 2008)

2.7.2 Markery kostní resorpce

2.7.2.1 N-terminální telopeptid kolagenu typu I (NTX-I) a C-terminální telopeptid kolagenu typu I (CTX-I)

Většina markerů kostní resorpce jsou degradační produkty kolagenu typu I. Nejpoužívanějšími z nich jsou karboxy a amino telopeptidy kolagenu typu I (NTX a CTX), které se uvolňují do oběhu během kostní resorpce působením osteoklastů. CTX a NTX se uvolňují do cirkulace vlivem kathepsinu K, C-terminální telopeptid kolagenu I (ICTP) účinkem metaloproteináz. NTX i CTX se vylučují močí a lze je měřit ve 24hodinových vzorcích moči, v ranních vzorcích moči a v séru. Načasování odběru vzorku je rozhodující vzhledem k výrazné cirkadiánní variabilitě, která je u CTX výraznější. Předchozí práce ukázaly, že hladovění významně snižuje cirkadiánní variaci. Pro optimální klinické využití jsou tedy nutné odběry ranních vzorků nalačno (Hlaing et al., 2014). CTX-I je považován za referenční marker kostní resorpce potvrzený Mezinárodní federací klinické chemie a laboratorní medicíny (IFCC) a schválen Národní aliancí pro zdraví kostí (NBHA) v USA (Gillett et al., 2021).

2.7.2.2 Kostní sialoprotein

Kostní sialoprotein (BSP) je fosforylovaný nekolagenní glykoprotein kostní matrix. Vyskytuje se pouze v mineralizovaných tkáních, jako je kost, dentin a chrupavka. Je produkován osteoblasty, odontoblasty a osteoklasty. Funkce BSP stále není zcela objasněna. Předpokládá se, že BSP se podílí na regulaci tvorby hydroxyapatitu v kostech a zubech a stimuluje kostní resorpci zprostředkovanou osteoklasty (Maeda et al., 2013; Hlaing et al., 2014).

2.7.2.3 Kathepsin K

Katepsiny patří do rodiny cysteinových proteáz a bylo identifikováno jejich 11 izoform. Zejména katepsin K je exprimován aktivně resorbujícími osteoklasty a hraje důležitou roli v kostní resorpci. Osteoklasty vylučují katepsin K do kostních resorpčních lakun za

účelem degradace proteinů kostní matrix včetně kolagenu typu I, osteopontinu a osteonektinu (Shetty et al, 2016; Hlaing et al., 2014).

2.7.2.4 Tartarát rezistentní kyselá fosfatáza (TRAP)

Tartrát-rezistentní kyselá fosfatáza (TRAP) patří do heterogenní skupiny lysozomálních enzymů. V cirkulaci se vyskytují dvě formy TRAP: TRAP5a a TRAP5b. TRAP5a nacházející se v aktivovaných makrofázích, je strukturálně stejná jako TRAP5b, odlišuje se však optimálním pH. TRAP5b (TRAP5b, známá také jako ACP5) je jedním z enzymů produkovaných osteoklasty během kostní resorpce a využívá se jako ukazatel jejich počtu a aktivity (Hlaing et al., 2014).

2.7.2.5 Hydroxyprolin (OHP)

Hydroxyprolin je produktem degradace kolagenu. Jedná se o aminokyselinu, která vzniká posttranslační hydroxylací prolinu. Na obsahu aminokyselin v kolagenu se podílí asi 13-14 % a jeho přítomnost zvyšuje elasticitu kolagenu na rozdíl od prolinu. Vyskytuje se i v jiných tkáních obsahujících kolagen než kosti, jako jsou chrupavky a kůže. V krevním oběhu je buď ve volné formě (90 %), nebo ve formě vázané na peptidy. Většina volného hydroxyprolinu je filtrována a reabsorbována ledvinami. Hydroxyprolin v moči, historický marker kostní resorpce, vykazoval tři hlavní nevýhody: jeho významná část nebyla kostního původu; OHP se vstřebává z potravy; většina OHP se metabolizuje v játrech (Hlaing et al., 2014; Vasikaran, 2008).

2.7.2.6 Pyridinolin (PYD) a deoxypyridinolin (DPD)

Pyridinolin (PYD) a deoxypyridinolin (DPD) mechanicky stabilizují molekulu kolagenu zesíťováním mezi jednotlivými kolagenními peptidy, tzv. cross-links. Zdrojem PYD jsou kromě kostí i chrupavky a šlachy. DPD se nalézá téměř výhradně v kostech a dentinu a jde o specifický produkt kolagenu typu I při rozkládání osteoklasty. PYD a DPD jsou vylučovány močí ve volné (40 %) a peptidově vázané formě (60 %). Stanovení lze

provést v krvi i moči, je však potřeba zohlednit cirkadiánní rytmus s maximem vylučování přes noc (Shetty et al., 2016; Hlaing et al., 2014).

3. Osteoporóza a měření kostní minerální denzity (BMD)

Osteoporózou označujeme progredující systémové onemocnění skeletu, charakterizované úbytkem kostní hmoty a poruchami stavby kosti s následným zvýšením křehkosti kostí s navazujícím rizikem zlomenin. Toto asymptomatické onemocnění zůstává často dlouho nedagnostikováno, protože prvním příznakem bývá obvykle až zlomenina. Ke zlomeninám dochází bez předchozího úrazu nebo už při malé zátěži kosti. Typickými osteoporotickými zlomeninami jsou zlomeniny obratlů, distálního předloktí a proximální části stehenní kosti (Chin et al., 2022). Zlomeniny v důsledku osteoporózy jsou hlavní příčinou morbidity a mortality starších lidí (Compston et al., 2019).

V současné době každý diagnostický postup vyžaduje změření hustoty kostního minerálu (BMD) pomocí dvouenergievé rentgenové absorpctimetrie (DXA). Tato metoda využívá slabé rentgenové záření o dvou energetických hladinách, které je pohlcováno kostí. BMD se obvykle měří v oblasti bederní páteře (doporučenými místy měření jsou bederní obratle L1, L2 a L3, resp. L4 a jejich průměr) a proximálního femuru a vyjadřuje množství kostního minerálu v plošné projekci analyzovaného úseku skeletu v g/cm^2 . Světová zdravotnická organizace (WHO) v roce 1994 definovala osteoporózu jako hodnotu BMD o 2,5 směrodatné odchylky (SD) nebo více pod průměrnou maximální hodnotou BMD u zdravých jedinců (T-skóre $\leq -2,5$ SD). Hodnota T-skóre mezi -2,5 a -1,0 je definována jako osteopenie (Chin et al., 2022). U dětí, mladistvých a u osob starších 70 let je vhodnějším diagnostickým kritériem hodnota Z-skóre udávající počet standardních odchylek od průměrné hodnoty osob stejné věkové kategorie, pohlaví a etnika (Šimko et al., 2013). Naměřené hodnoty BMD jsou považovány za silný nezávislý prediktor rizika zlomenin (Salari et al., 2021).

Vzhledem ke stárnutí populace a prodlužující se délce života představuje osteoporóza závažný celosvětový zdravotní problém. V současné době se odhaduje, že osteoporózou trpí více než 200 milionů lidí. Podle nejnovějších statistik Mezinárodní nadace pro osteoporózu (International Osteoporosis Foundation) dojde celosvětově u každé třetí ženy starší 50 let a u každého pátého muže k osteoporotické zlomenině (Sözen et al., 2017). Osteoporóza způsobuje ročně 8,9 milionů zlomenin po celém světě a vede ke zhoršení fyzického i psychického zdraví, nižší kvalitě života a kratší průměrné délce života. Například ve Spojeném království je hospitalizováno více než

300 000 pacientů s osteoporotickými zlomeninami, což je spojeno s vysokými náklady na zdravotní péči. V roce 2000 si osteoporóza vyžádala ve Spojeném království náklady na zdravotní péči v odhadované výši 1,8 miliardy liber a do roku 2025 se předpokládá nárůst na 2,2 miliardy liber (Barnsley et al., 2021). Léčba osteoporózy a s ní spojených následků je nezbytná nejen pro zlepšení kvality života, ale také pro snížení ekonomické zátěže systému zdravotní péče.

Primární osteoporóza je nejčastější formou onemocnění, rozvíjí se bez zřetelné příčiny a dělí se na dva typy. I. typ osteoporózy (postmenopauzální) je způsobený nedostatkem estrogenů, kdy dochází k zvýšenému odbourávání kosti. U II. typu osteoporózy (tzv. senilní, stařecká) dochází k snížené tvorbě nové kosti a postihuje obě pohlaví s manifestací obvykle po 65. roce věku. Naproti tomu sekundární osteoporóza je způsobena komorbidními onemocněními a/nebo léky (Dobbs et al., 1999; Tu et al., 2018).

Osteoporóza je považována za komplexní multifaktoriální onemocnění, přičemž její patogeneze závisí na přítomnosti endogenních a exogenních rizikových faktorů, které vychylují fyziologickou remodelaci směrem k úbytku kostní hmoty. Mezi rizikové faktory se řadí fyzická inaktivita, nedostatek vitamínu D, špatný životní styl včetně užívání alkoholu a kouření, ženské pohlaví, rasa, rodinná anamnéza osteoporotické zlomeniny a užívání vybrané skupiny léku včetně antiepileptik (Chin et al., 2022). Prevalence osteoporózy a osteopenie u dlouhodobě léčených epileptiků je vysoká. Více než 50 % pacientů s epilepsií má nízkou hodnotu BMD (Ko et al., 2020). Četnost zlomenin u dětských pacientů s epilepsií je 2x až 3x vyšší než u dětí bez epilepsie (Ko et al., 2020). Systematický přehled a metaanalýza 22 studií prokázaly, že užívání AED je spojeno s 86 % zvýšením rizika zlomenin v jakémkoli místě a 90 % zvýšením rizika zlomenin kyčle (Barnsley et al., 2021). Příčiny nežádoucích účinků jsou pravděpodobně multifaktoriální. V budoucnu je třeba lépe porozumět mechanismům, které tyto nežádoucí účinky antiepileptik způsobují a pokusit se stanovit postupy jejich prevence a léčby.

4. Epilepsie

Epilepsie je jedním z nejčastějších chronických neurologických onemocnění, postihuje více než 70 milionů lidí na celém světě (Thijs et al., 2019). Toto onemocnění je charakterizováno opakovanými záchvaty mozkového původu. Záchvaty jsou způsobeny náhlou a reversibilní abnormální funkcí mozkové aktivity, která se klinicky projevuje dočasnou změnou motoriky, vědomí či vnímání, chování nebo citlivosti. Projevy epileptických záchvatů jsou značně mnohotvárné a mohou se lišit případ od případu i u téhož pacienta. Záchvaty bývají obvykle krátké, trvají několik vteřin až několik málo minut a mohou být následovány pozáchvatovým stavem. Ten se projevuje ospalostí, únavou, zmateností nebo přetrvávajícími neurologickými příznaky. Onemocnění často přetrvává mnoho let nebo desetiletí a u mnoha pacientů vyžaduje celoživotní léčbu (Schulze-Bonhage et al., 2020; Gözükcizil et al., 2022). Léky proti epilepsii (AED) jsou hlavní formou léčby lidí s epilepsií. AED jsou však předepisována jako lék první volby také u řady neepileptických stavů, především u poruch bipolárního spektra a chronických bolestivých stavů. Pouze jeden ze tří uživatelů AED užívá tyto léky na epilepsii (Reimers, 2014).

AED lze rozdělit do dvou kategorií: širokospektrá a úzkospektrá. Širokospektrá AED, jak název napovídá, léčí širokou škálu typů záchvatů a jsou dobrou počáteční volbou, zejména pokud je klasifikace typu záchvatu nejistá. Mezi tato AED patří mimo jiné levetiracetam, lamotrigin, zonisamid, topiramát, kyselina valproová, klonazepam, perampanel, klobazam a rufinamid. AED s úzkým spektrem jsou primárně určena k léčbě fokálních nebo parciálních záchvatů. Patří mezi ně lakosamid, pregabalin, gabapentin, karbamazepin, oxkarbazepin, ezogabin, fenytoin a vigabatrin (Subbarao et al., 2022).

Chronické podávání antiepileptik nevede k léčbě epilepsie, ale „pouze“ potlačuje nebo zabraňuje rozvoji epileptického záchvatu. Existují představy o tom, jaká kritéria by mělo splňovat takzvané „ideální antiepileptikum“. V těchto definicích se dovídáme o ideálních farmakokinetických a farmakodynamických vlastnostech takového „ideálního“ léku, výborné účinnosti na co největší spektrum typů epileptických záchvatů a pokud možno „nulovém“ potenciálu působit nežádoucí účinky. Klinická praxe je ale v současnosti jiná a neexistuje antiepileptikum, které by nemělo vedlejší nežádoucí účinky (Kuba 2006). Léčba antiepileptiky může negativně ovlivnit zdraví kostí a vést

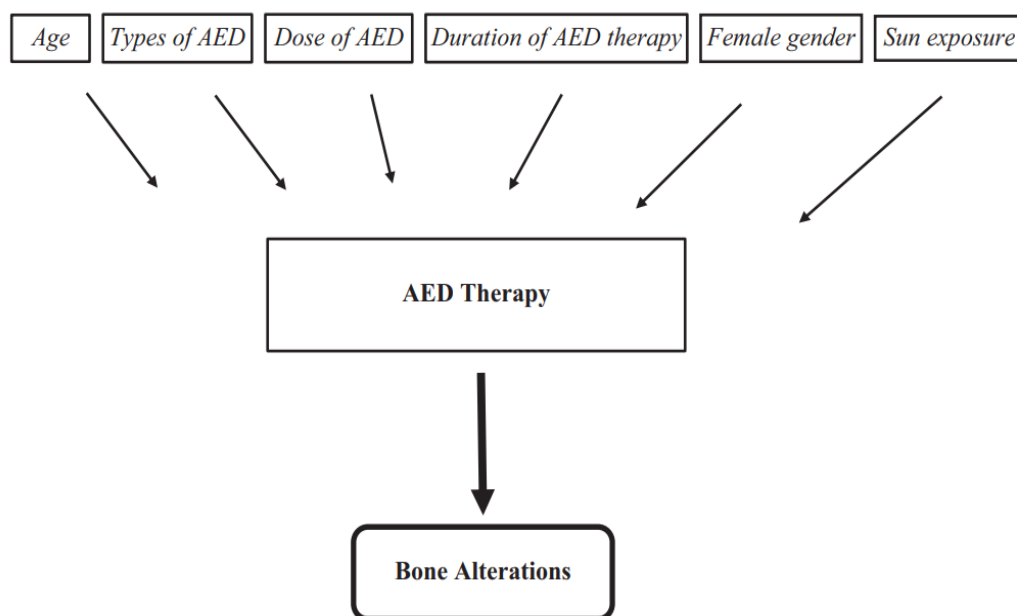
k zvýšenému riziku zlomenin. (Koo et al., 2020). Odhaduje se, že pacienti s epilepsií mají 2-3 x vyšší riziko zlomenin kostí ve srovnání s běžnou populací (Guo et al., 2020). Nežádoucí účinky antiepileptik na zdraví kostí byly poprvé zaznamenány v 60. letech 20. století a od té doby přibývá důkazů, které ukazují, že pacienti užívající AED jsou vystaveni zvýšenému riziku metabolického onemocnění kostí, včetně změn v kostním obratu, snížení BMD, změn v kvalitě kostí vedoucí k vyššímu riziku zlomenin a rozvoji osteoporózy (Guo et al., 2020; Verrotti et al., 2010).

Tradiční AED, včetně fenobarbitalu, primidonu, fenytoinu a karbamazepinu, indukují enzymy biotransformace (cytochromoxidázový systém, zejména cytochrom P450). Nejpravděpodobnějším mechanismem je aktivace těchto enzymů vedoucí ke zvýšenému jaternímu katabolismu 25-hydroxyvitamínu D, což má za následek rozvoj hypokalcémie, zvýšení hladiny parathormonu (PTH), sekundární hyperparatyroidismus se zvýšením kostní resorpce a snížením BMD. Další mechanismus narušení kostní mineralizace může přímo souviset se škodlivým účinkem některých AED na kostní minerální denzitu. Některé studie naznačují, že valproát, enzymový inhibitor CYP-450, je spojen s poklesem BMD a úbytkem kostní hmoty (Koo et al., 2020; Gözüklizil et al., 2022). AED "novější generace" nepůsobí jako enzymové induktory/inhibitory. Stále však není jasné, zda AED "novější generace", které byly zavedeny do praxe v posledních dvou desetiletích, včetně gabapentinu, lamotriginu, topiramátu, tiagabinu, oxkarbazepinu, levetiracetamu a zonisamidu, nepříznivě ovlivňují zdraví kostí (Hakami et al., 2016).

U pacientů s epilepsií léčených AED není rutinně vyžadováno sledování biochemických markerů kostního obratu, měření sérové hladiny 25-hydroxyvitamínu D, vápníku, fosfátu, BMD, a to jak před zahájením léčby, tak i během jejího monitorování (Siniscalchi et al., 2020). Studie ukázala, že pouze 41 % dětských neurologů a 28 % neurologů pro dospělé rutinně hodnotí stav kostí u pacientů s epilepsií užívajících AED (Ko et al., 2020). Sledování těchto biochemických markerů u pacientů s epilepsií by mohlo být nápomocné k zvolení adekvátní terapie a sloužit jako prevence poškození kostního zdraví.

Riziko kostních změn spojených s užíváním AED může zvyšovat několik faktorů: 1) věk; 2) použitá dávka; 3) délka léčby; 4) polyterapie; 5) ženské pohlaví; 6) expozice slunci. Zohlednění těchto faktorů může představovat možnou strategii prevence kostních alterací plynoucích z užívání AED (Siniscalchi et al., 2020).

FACTORS IMPLICATED IN AED-INDUCED BONE ALTERATION



Obr. č. 4: Faktory ovlivňující riziko kostních změn spojených s užíváním AED (Siniscalchi et al., 2020)

4.1 Zonisamid

Zonisamid (ZNS) je derivát benzisoxazolu (1, 2- benzisoxazol-3-methanesulfonamid) s jedinečnou chemickou strukturou patřící mezi novou generaci AED (Goel et al., 2021; Kwan et al., 2015). ZNS byl v Evropě schválen jako monoterapie pro léčbu parciálních záchvatů u dospělých s nově diagnostikovanou epilepsií a tento lék je v Evropě a USA schválen také jako přídatná léčba fokálních záchvatů se sekundární generalizací nebo bez ní (Romigi et al., 2015). ZNS se rychle a úplně vstřebává, přičemž vrchol absorpce nastává za 2-6 hodin a metabolismus probíhá především prostřednictvím izoenzymu 3A4 cytochromu P450 (CYP3A4), po němž následuje vylučování ledvinami (Jongeling et al., 2015). Mechanismus účinku ZNS je nejasný. ZNS má široké spektrum mechanismů účinku zahrnující inhibici sodíkových kanálů, redukci vápníkových kanálů typu T, snížení synaptické excitace zprostředkované glutamátem a zvýšení inhibičních účinků skrze kyselinu gama-aminomáselnou (Lee et al., 2015; Goel et al., 2021). ZNS také slabě mění metabolismus acetylcholinu, dopaminu, serotoninu a inhibuje aktivitu karboanhydrázy, i když není jisté, zda tyto účinky přispívají k jeho klinické účinnosti (Kwan et al., 2015).

4.2 Pregabalin a gabapentin

Pregabalin a gabapentin, souhrnně gabapentinoidy, jsou strukturně příbuzné sloučeniny, které jsou klasifikovány jako analoga kyseliny gamaaminomáselné (GABA). Gabapentinoidy jsou předepisovány k léčbě epileptických záchvatů, neuropatické bolesti, fibromyalgie, syndromu neklidných nohou, generalizované úzkostné poruchy a také jsou široce předepisována jako medikace off-label (Fernandez-Lopez et al., 2020). Gabapentin a pregabalin mají v podstatě identické farmakodynamické vlastnosti. Ani jeden z těchto léků nemá znatelnou afinitu k receptorům GABA, ačkoli jsou chemicky podobný neurotransmiteru GABA. Spíše inhibují neuronální signalizaci vazbou na podjednotku $\alpha 2\text{-}\delta$ napěťově řízených vápníkových kanálů v centrálním nervovém systému. Tento mechanismus pravděpodobně vysvětluje jejich antikonvulzivní, antinociceptivní a možné anxiolytické vlastnosti (Mathieson et al., 2020). Pregabalin se vstřebává rychleji než gabapentin a vykazuje lineární absorpční kinetiku s více jak 90 % biologickou dostupností v celém doporučeném dávkovacím rozmezí. Naproti tomu gabapentin má nelineární absorpční kinetiku-absorbovaná frakce klesá se zvyšující se dávkou. Obě léčiva se vylučují především renálním vylučováním intaktního léčiva (Greenblatt et al., 2018; Derry et al., 2019).

4.3 Levetiracetam

Levetiracetam (LEV) je relativně novým a jedním z nejčastěji předepisovaných antiepileptik se širokým spektrem účinku. Jedná se o analog piracetamu (2S-(oxo-1-pyrrolidinyl) butanamid) často využívaným k léčbě parciálních a generalizovaných záchvatů (Jarvie et al., 2018). LEV je atraktivním AED pro léčbu posttraumatických záchvatů díky svým příznivým farmakokinetickým vlastnostem-vynikající perorální biologické dostupnosti, která není závislá na systému cytochromu P450, lineární kinetice, minimální vazbě na plazmatické bílkoviny a rychlému dosažení ustálené koncentrace (Shetty, 2013; Peyrl et al., 2015). Různé studie naznačují, že reguluje influx vápníku do buněk, přičemž selektivně blokuje kanál typu N, ale nikoli typu T. Váže synaptický vezikulární protein (SV2A) a prostřednictvím modulace funkce SV2A

vyvolává neuroprotektivní účinky (Erbaş et al., 2016). Léčivo je bezpečné a obecně dobře snášené (Koo et al., 2013).

5. Cíle disertační práce

Cílem disertační práce bylo posouzení vlivu vybraných nových antiepileptik na kostní metabolismus u mladých potkanů kmene Wistar.

Specifické cíle:

- 1) Zjistit vliv orchidektomie na kostní metabolismus u potkanů.
 - a. Stanovit koncentraci kostních markerů v séru a kostním homogenátu.
 - b. Pomocí dvouenergiové rentgenové absorpciometrie změřit kostní minerální hustotu potkana.
 - c. Posoudit mechanické vlastnosti kostní tkáně femurů potkana.
 - d. Vyhodnocování BMD ve vybraných oblastech skeletu a stavby těla (poměr tělesné tukové a svalové tkáně) potkana.

- 2) Zjistit vliv nových antiepileptik (zonisamidu, gabapentinu, pregabalínu, levetiracetamu) na kostní metabolismus u potkanů.
 - a. Stanovit koncentraci kostních markerů v séru a kostním homogenátu.
 - b. Pomocí dvouenergiové rentgenové absorpciometrie změřit kostní minerální hustotu potkana.
 - c. Posoudit mechanické vlastnosti kostní tkáně femurů potkana.
 - d. Vyhodnocování BMD ve vybraných oblastech skeletu a stavby těla (poměr tělesné tukové a svalové) tkáně potkana.

6. Experimentální část

6.1 Experimentální zvířata

Potkani byli ustájeni v Centrálním viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové (UK-LF HK). Protokol experimentů byl schválen Odbornou komisí na ochranu zvířat proti týrání UK-LF HK. Při pokusech byli použiti osmitýdenní samci potkanů albínů kmene Wistar (Biotest s.r.o., Konárovice, Česká republika). Zvířata byla umístěna ve skupinách po 4 v plastových klecích a chována za standardních podmínek (12 hodin světlo a 12 hodin tma, teplota 22 ± 2 °C, vlhkost vzduchu 30-70 %). Zvířata měla přístup k standardní laboratorní dietě (SLD, VELAS, a.s., Lysá nad Labem, Česká republika) nebo SLD obohacené o léčiva a vodě ad libitum po celou dobu experimentu. V průběhu pokusu byla hmotnost potkanů sledována jednou týdně.

6.2 Antiepileptika

- a. Zonisamid (Zonisamid, Eisai Ltd.)
- b. Gabapentin (Gabapentin, Gedeon Richter Plc.)
- c. Pregabalin (Pregabalin, Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH)
- d. Levetiracetam (Levetiracetam, UCB Pharma)

6.3 Experiment

Osmitýdenní potkani byli náhodně rozděleni do 10 skupin po 8 zvířatech a krmeni SLD nebo SLD obohacenou lékem. Délka pokusu byla 12 týdnů.

1. Kontrolní skupina potkaních samců krmená SLD (SHAM)
2. Kontrolní skupina potkaních samců po provedené orchidektomii krmená SLD (ORX)

3. Skupina potkaních samců krmená SLD obohacenou o zonisamid (19 mg/25 g diety; Zonisamid, Eisai Ltd.) (SHAM+ZNS)
4. Skupina potkaních samců po provedené orchidektomii krmená SLD obohacenou o zonisamid (19 mg/25 g diety; Zonisamid, Eisai Ltd.) (ORX+ZNS)
5. Skupina potkaních samců krmená SLD obohacenou o gabapentin (28 mg/25 g diety; Gabapentin, Gedeon Richter Plc.) (SHAM+GBP)
6. Skupina potkaních samců po provedené orchidektomii krmená SLD obohacenou o gabapentin (28 mg/25 g diety; Gabapentin, Gedeon Richter Plc.) (ORX+GBP)
7. Skupina potkaních samců krmená SLD obohacenou o pregabalin (12 mg/25 g diety; Pregabalin, Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH) (SHAM+PGB)
8. Skupina potkaních samců po provedené orchidektomii krmená SLD obohacenou o pregabalin (12 mg/25 g diety; Pregabalin, Pfizer Manufacturing Deutschland GmbH) (ORX+PGB)
9. Skupina potkaních samců krmená SLD obohacenou o levetiracetam (101 mg/25 g diety; Levetiracetam, UCB Pharma) (SHAM+LEV)
10. Skupina potkaních samců po provedené orchidektomii krmená SLD obohacenou o levetiracetam (101 mg/25 g diety; Levetiracetam, UCB Pharma) (ORX+LEV)

6.4 Materiál a analýza

Na samotném začátku experimentu byla polovině potkanů provedena oboustranná orchidektomie v éterové narkóze (skupina ORX). Potkanům ze skupiny SHAM byl proveden pouze operační řez na šourku, který byl následně zašit. Následující den po operaci se začala podávat kontrolním skupinám pouze SLD a experimentálními potkanům SLD obohacená o léčiva. Přístup k potravě byl ad libitum. Délka pokusu byla 12 týdnů. Podle spotřeby diety byla vypočítána dávka léku na kilogram tělesné

hmotnosti potkana. Po 12 týdnech byla zvířata usmrcena odebráním krve z břišní aorty v éterové anestezii, získané sérum bylo alikvotováno a uloženo při -80 °C pro následné biochemické analýzy.

6.4.1 Kostní homogenát

Po usmrcení potkanů byly femury vypreparovány a důkladně očištěny od měkkých tkání, zabaleny do gázy navlhčené fyziologickým roztokem a zamraženy při teplotě -80 °C do doby analýzy. Kostní homogenát byl připraven z femuru. Část diafýzy femuru (0,1 g) byla rozrušena a homogenizována pomocí přístroje TissueLyser II (Qiagen, Nizozemsko). Do nádoby určené pro homogenizaci se na vzorek femuru a drtící kuličky nalil tekutý dusík a bylo přidáno 0,5 ml fosfátového pufru (PBS, PENTA Praha, Česká republika). Tkáň femuru byla rozmělnována při frekvenci 30 Hz po dobu 1 min. Poté bylo ke vzorku přidáno dalších 1,5 ml fosfátového pufru a následovalo další rozmělnování při 10 Hz po dobu 15 s. Vzniklý tkáňový homogenát byl centrifugován při 10 000 g při 4 °C po dobu 10 min a získaný supernatant byl odebrán a uložen při -80 °C. Hladiny markerů sklerostinu (SOST) a kostní alkalické fosfatázy (BALP) byly stanoveny v kostním homogenátu enzymovou imunoanalýzou (ELISA, enzyme-linked immuno sorbent assay). Hladina sklerostinu byla stanovena pomocí kitu od firmy Cloud-Clone Corp., 23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA (SOST, pg/ml) a hladina kostní alkalické fosfatázy byla stanovena pomocí kitu od firmy BlueGene Biotech, Shanghai, Čína (BALP, ng/ml).

Ze séra byly metodou ELISA analyzovány markery kostního obratu: amino-terminální propeptid prokolagenu typu I (PINP), ligand pro aktivátor nukleárního faktoru kappa B (RANKL) a osteoprotegerin (OPG). Použili jsme soupravy od firmy Cloud-Clone Corp., 23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA (PINP, ng/ml; RANKL, pg/ml; OPG, pg/ml).

Pro stanovení kostních markerů u levetiracetamu byly použity kity firmy Usbn Life Science Inc., Wuhan, Čína (PINP, ng/mL; CTX-I, pg/mL; SOST, pg/mL; RANKL, pg/mL) a kit od firmy BlueGene Biotech, Shanghai, Čína (BALP, ng/ml). Posouzení vlivu levetiracetamu na kostní metabolismus bylo uskutečněno o několik měsíců dříve

než zbylá výše zmíněná antiepileptika, v rámci jiného probíhajícího pokusu se shodnou metodikou.

6.4.2 Stanovení koncentrace léků v séru

6.4.2.1 Zonisamid

Na konci experimentu byly stanoveny hladiny zonisamidu v krevním séru. Koncentrace zonisamidu ve vzorcích byla stanovena pomocí modifikované metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí na hmotnostním spektrometru typu trojitého kvadrupólu (LC-MS/MS). Příprava vzorků zahrnovala vysrážení proteinů a přidavek vnitřního standardu deuterovaného pregabalínu-D6. Analyt byl separován na koloně Discovery HS F5 (100 mm x 2,1 mm I.D., velikost částic 5 μ m, Supelco, PA, USA) a detekován pomocí hmotnostního spektrometru typu trojitého kvadrupólu Agilent 6490. Detekce se uskutečnila v pozitivním módu za využití elektrospreje a pro kvantitativní analýzu byly použity přechody iontů 213> 132 pro zonisamid a 166,2> 148,1 pro pregabalín-D6.

6.4.2.2 Gabapentin

Hladiny gabapentinu v séru byly stanoveny na konci pokusu. Koncentrace gabapentinu ve vzorcích byla stanovena pomocí modifikované metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí na hmotnostním spektrometru typu trojitého kvadrupólu (LC-MS/MS). Příprava vzorků zahrnovala vysrážení proteinů a přidavek vnitřního standardu deuterovaného pregabalínu-D6. Analyt byl separován na koloně Discovery HS F5 (100 mm x 2,1 mm I.D., velikost částic 5 μ m, Supelco, PA, USA) a detekován pomocí hmotnostního spektrometru typu trojitého kvadrupólu Agilent 6490. Detekce se uskutečnila v pozitivním módu za využití elektrospreje a pro kvantitativní analýzu byly použity přechody iontů 172,2> 154,1 pro gabapentin a 166,2> 148,1 pro pregabalín-D6.

6.4.2.3 Pregabalin

Hladiny pregabalinu byly stanoveny v krevním séru na konci pokusu. Koncentrace pregabalinu ve vzorcích byla stanovena pomocí modifikované metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí na hmotnostním spektrometru typu trojitého kvadrupólu (LC-MS/MS). Příprava vzorků zahrnovala vysrážení proteinů a přidavek vnitřního standardu deuterovaného pregabalinu-D6. Analyt byl separován na koloně Discovery HS F5 (100 mm x 2,1 mm I.D., velikost částic 5 μ m, Supelco, PA, USA) a detekován pomocí hmotnostního spektrometru typu trojitého kvadrupólu Agilent 6490. Detekce se uskutečnila v pozitivním módu za využití elektrospreje a pro kvantitativní analýzu byly použity přechody iontů 160,2 > 55,1 pro pregabalin a 166,2 > 148,1 pro pregabalin-D6.

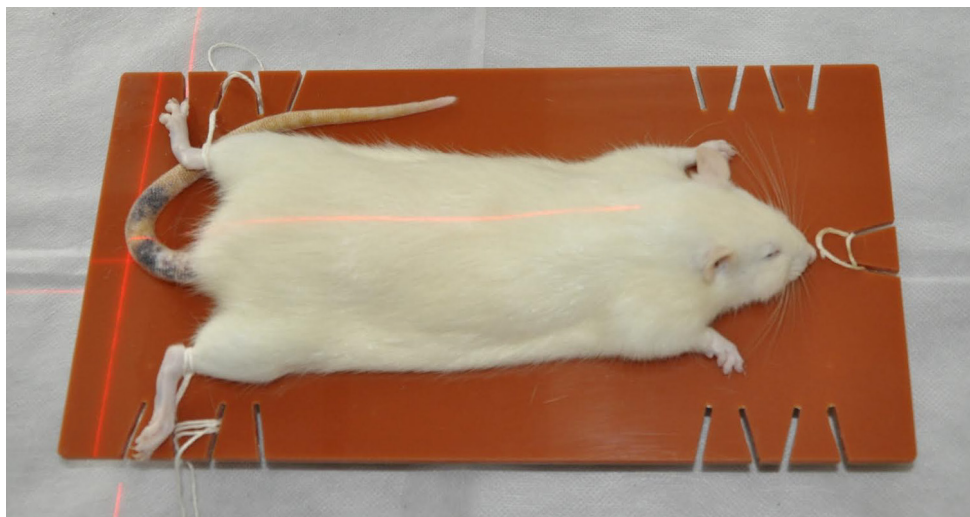
6.4.2.4 Levetiracetam

Koncentrace levetiracetamu byla stanovena na konci pokusu metodou modifikované vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí fotodiodovým paprskem (Lancelin F, et al., 2007). Po alkalizaci vzorku (0,05 ml 1M hydroxid sodný) byly levetiracetam a vnitřní standard UCB 17025 extrahovány do dichlormethanu. Po odpaření organického rozpouštědla byl zbytek vzorku rozpuštěn a vstříknut pro HPLC analýzu. Sloučeniny byly separovány na koloně Zorbax SB-C8 (Agilent Technologies, USA) při průtoku 1,1 ml/min mobilní fáze. Mobilní fáze se skládala z 10 % acetonitrilu, 7 % methanolu a 83 % 20 mM fosfátového pufru pH 6,7 s 0,1 % triethylaminem. UV detekce probíhala při vlnové délce 200 nm.

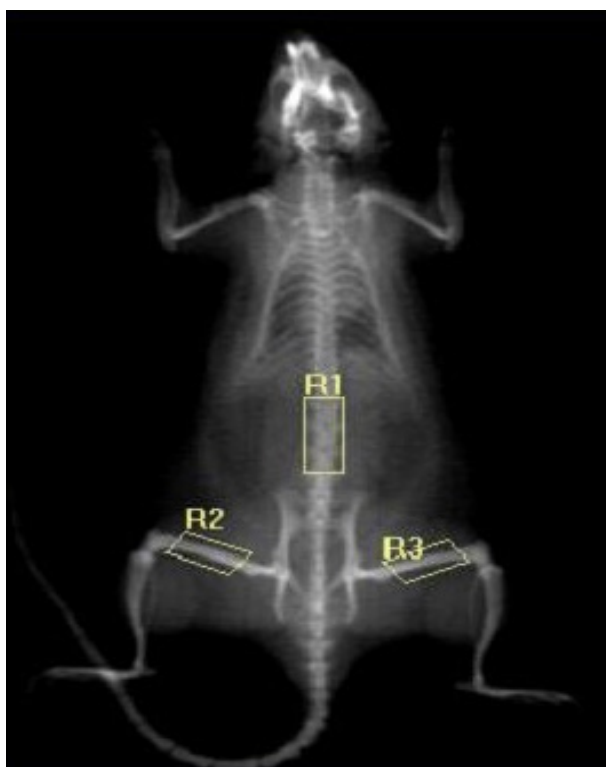
6.4.3 Měření kostní minerální denzity

Na konci pokusu byla měřena kostní minerální hustota potkanů (BMD, g/cm²) pomocí duální energetické rentgenové absorpciometrie (DXA) na přístroji Hologic Delphi A (Hologic, Waltham, MA, USA) v Osteologickém centru Fakultní nemocnice Hradec Králové. Před měřením byl proveden kalibrační sken s fantomem Hologic pro malé zvíře. V pokusu bylo vyhodnoceno BMD celého těla, v oblasti bederních obratlů a v oblasti femurů. Počítačem byla hodnocena také celková hmotnost svalové a tukové

tkáně a procentuální zastoupení tukové tkáně pomocí příslušného softwarového programu pro malá zvířata (DXA; QDR-4500A Elite; Hologic, Waltham, MA, USA). Všechna zvířata byla měřena stejným operátorem.



Obr. č. 6: Poloha potkana v průběhu měření kostní minerální hustoty (BMD).

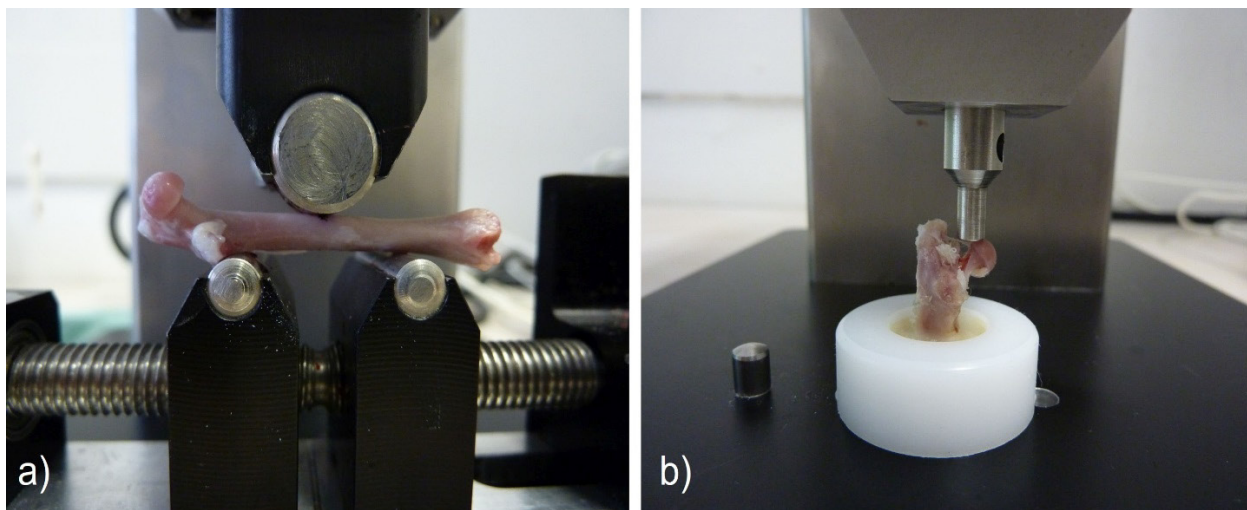


Obr. č. 7: Sken potkana-hodnocení kostní minerální hustoty (BMD) ve třech oblastech R1 – oblast bederních obratlů (L3-L5); R2 – levý femur; R3 – pravý femur

6.4.4 Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Na speciálním elektromechanickém testovacím stroji vyrobeném na zakázku (Martin Kosek & Pavel Trnečka, Hradec Králové, Česká republika) bylo provedeno mechanické testování kostní tkáně. K experimentu byly použity femury, které byly uskladněny v mrazícím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a postupně rozmrazeny při pokojové teplotě. Materiál byl během testování zabalen v gáze s fyziologickým roztokem, aby byl chráněn před vysycháním. Před vlastním testováním odolnosti femuru v ohybu byla změřena jeho délka. Voděodolným fixem byl vyznačen střed diafýzy femuru a v této oblasti byl změřen průměr. Při testování mechanické odolnosti femuru pomocí tříbodového ohýbání kosti (three-point bending) byla kost umístěna na dva podpůrné body, vzdálené od sebe 18 mm. Nejprve byl femur zatížen malým stabilizačním napětím do 10 N k přesné fixaci polohy během lámání. Třetí bod, kterým byl nerezový váleček o průměru 7 mm, byl umístěn kolmo dolů na vyznačený střed diafýzy femuru. Femur byl testován v anteroposteriorním směru. Pomocí elektromotoru byl snižován nerezový váleček konstantní rychlostí 6 mm/min. Síla potřebná ke zlomení femuru byla zaznamenána pomocí snímací jednotky, která měřila maximální sílu vyvinutou na kost válečkem, než došlo ke zlomení kosti. Následně byla změřena tloušťka kompakty na distální části femuru ve směru lámání pomocí posuvného mikrometru (OXFORD 0-25MM 30DEG POINTED MICROMETER, Victoria Works, Leicester, Velká Británie).

K testování tlakové odolnosti krčku femuru byla využita proximální část femuru. Diafýza femuru byla ponořena do speciální nádoby se samopolymerující adhezivní pryskyřicí, a tím byla kost zafixována v kolmé poloze. Správná poloha kosti byla zajištěna pomocí na zakázku vyrobeného držáku. Vysychání hlavice a krčku femuru bylo zabráněno použitím navlhčené gázy fyziologickým roztokem. Pro vyvíjení tlaku na hlavici femuru byla využita na zakázku vyrobená nerezová tyčka se zakulaceným koncem o průměru 4 mm. Tato tyčka se pohybovala dolů konstantní rychlostí 6 mm/min. Pro zajištění stabilní polohy kosti byla opět zatížena hlavice femuru malým stabilizačním napětím do 10 N. Následně byla pomocí snímače změřena maximální síla (N) potřebná ke zlomení krčku femuru a tato hodnota byla zaznamenána na zobrazovací jednotce (Snímač tahové a tlakové síly BURSTER 8435-6005; Procesní zobrazovací jednotka 9180-V3000, Burster praezisiosmesstechnik gmbh & co kg, Gernsbach, Německo).



Obr. č. 8: a) Testování mechanické odolnosti femuru pomocí třibodového ohýbání kosti
b) Testování mechanické odolnosti krčku femuru v tlaku

6.4.5 Statistická analýza a vyhodnocení dat

Statistická analýza dat byla provedena na Oddělení výpočetní techniky pomocí programu NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah, USA). Při porovnávání dvou skupin byl použit dvouvýběrový t-test s případnou Bonferroniho modifikací. V případě zamítnutí normality neparametrické testy Mann-Whitney test nebo Kolmogorov-Smirnov test. Výsledky jsou naměřeny po 12 týdnech pokusu a jsou vyjádřeny jako medián a 25. a 75. percentil. Hodnoty $p < 0,05$ a nižší byly považovány za signifikantní. Hladina významnosti byla zvolena $\alpha = 0,05$.

7. Výsledky

7.1 Vliv orchidektomie na kostní metabolismus u potkanů

Hmotnost, tělesná skladba

Nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly ve hmotnosti a zastoupení tukové a svalové tkáně mezi skupinou potkanů po podstoupené orchidektomii (ORX) versus skupinou potkanů, u kterých byl proveden pouze operační řez (SHAM).

Parameter	SHAM	ORCH	P value
Hmotnost na konci pokusu (g)	503 (405,8- 519,8)	428 (409,8- 462)	0,34873
Tuková tkáň (g)	59,1 (41,5- 70,4)	61,5 (56,6- 66,5)	0,494837
Tuková tkáň (%)	14,5 (11,6- 17,8)	16,5 (14,9-18,9)	0,12560
Svalová Tkáň (g)	330,5 (285,4- 355,0)	289 (284,1- 323,8)	0,16252

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Hladiny kostních markerů

Po 12 týdnech pokusu nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny markerů kostního obratu mezi skupinami.

Parameter	SHAM	ORCH	P value
Sclerostin (pg/ml)	325,42 (257,83 – 412,94)	635,35 (417,51 – 759,80)	0,087024
OPG (pg/ml)	450,83 (432,66- 703,96)	460,25 (380,14- 598,95)	0,44312
PINP (ng/ml)	71,71 (38,36- 85,75)	89,96 (58,02- 131,03)	0,12844
RANKL (pg/ml)	142,85 (128,15-421,19)	152,63 (84,06- 242)	0,60576
BALP (ng/ml)	2,64 (2,12- 3,29)	2,99 (1,45- 4,30)	0,67525

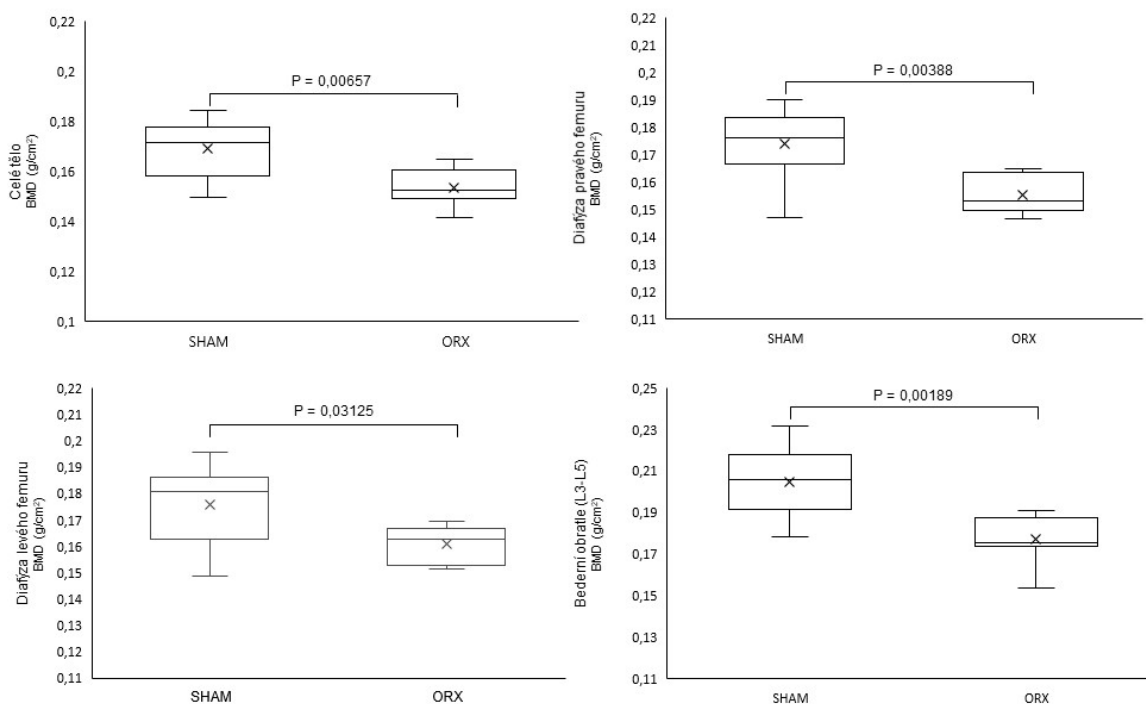
Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Měření kostní minerální denzity

Hustota kostního minerálu byla měřena po 12 týdnech pokusu metodou DXA. Bylo zjištěno statisticky významné snížení BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů i obou femurů ve skupině potkanů po provedené orchidektomii (ORX).

Parameter	SHAM	ORX	P value
Celé tělo			
BMD (g/cm ²)	0,171 (0,158- 0,178)	0,153 (0,149- 0,160)	0,00657
Diafýza pravého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,176 (0,167- 0,183)	0,153 (0,150- 0,163)	0,00388
Diafýza levého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,181 (0,163- 0,186)	0,163 (0,153- 0,167)	0,03125
Bederní obratle (L3-L5)			
BMD (g/cm ²)	0,206 (0,191- 0,218)	0,176 (0,174- 0,188)	0,00189

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.



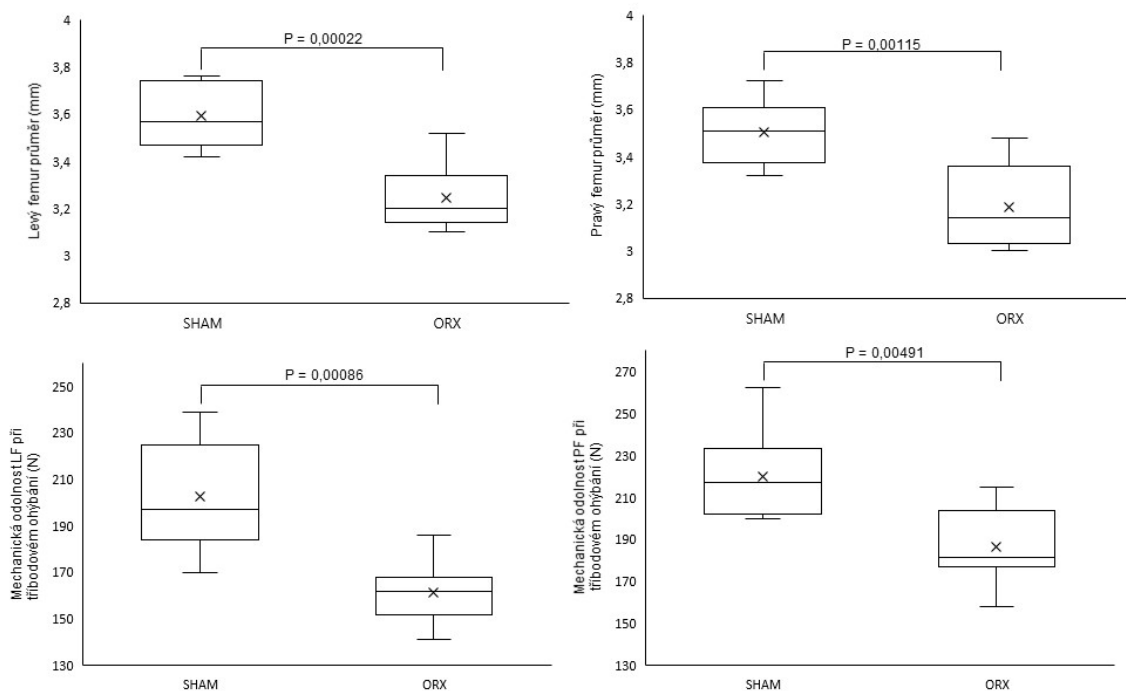
Graf č. 1: Porovnání naměřených hodnot BMD mezi skupinou SHAM a ORX

Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Při testování mechanické odolnosti kostní tkáně bylo zjištěno statisticky významné snížení průměru levého i pravého femuru u orchidektomovaných potkanů. Bylo potvrzeno statisticky významné snížení mechanické odolnosti levého a pravého femuru při tříbodovém ohýbání kosti.

Parameter	SHAM	ORX	P value
Levý femur (LF) délka (mm)	36,47 (35,83- 37,68)	35,58 (35,05- 36,42)	0,066082
Pravý femur (PF) délka (mm)	36,42 (35,37- 37,32)	35,24 (34,90- 35,90)	0,09625
LF průměr (mm)	3,57 (3,47- 3,74)	3,20 (3,14- 3,34)	0,00022
PF průměr (mm)	3,51 (3,38- 3,61)	3,14 (3,03- 3,36)	0,00115
Tloušťka kompakty LF (mm)	0,70 (0,61- 0,70)	0,65 (0,57- 0,68)	0,2191
Tloušťka kompakty PF (mm)	0,69 (0,61- 0,70)	0,63 (0,60- 0,66)	0,087024
Mechanická odolnost LF při tříbodovém ohýbání (N)	197 (184- 225)	162 (152- 168)	0,00086
Mechanická odolnost PF při tříbodovém ohýbání (N)	217 (202- 234)	182 (177- 204)	0,00491
Maximální tlaková síla krčku levého femuru (N)	151 (121- 175)	159 (122- 160)	0,84643
Maximální tlaková síla krčku pravého femuru (N)	143 (118- 167)	146 (132-164)	0,84333

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.



Graf č. 2: Grafické znázornění testování mechanické odolnosti kostní tkáně

7.2 Vliv zonisamidu na kostní metabolismus u potkanů

Hmotnost, tělesná skladba a hladina zonisamidu v séru

Hmotnost skupiny SHAM+ZNS byla snížena, ale statisticky nevýznamně oproti skupině SHAM. Po 12 týdnech podávání ZNS nedošlo k významnému zvýšení hmotnosti skupiny ORX+ZNS ve srovnání se skupinou ORX. DXA ukázala, že u skupiny SHAM+ZNS nedošlo k významnému snížení svalové tkáně (g) a tukové tkáně (%) oproti skupině SHAM. Ve skupině ORX+ZNS bylo zjištěno nevýznamnému zvýšení svalové tkáně (g) a snížení tukové tkáně (%) oproti skupině ORX.

Koncentrace ZNS odpovídala terapeutické hladině léčiva u člověka (10-40 mg/l).

Parameter	SHAM	SHAM+ZNS	P value
Hmotnost na konci pokusu (g)	503 (433-517)	463,5 (410,5- 492,8)	0,31843
Tuková tkáň (g)	59,1 (41,5- 70,4)	46,8 (40,8- 52,4)	0,10408
Tuková tkáň (%)	14,5 (11,6- 17,8)	12,8 (11,5- 14,6)	0,15379
Svalová Tkáň (g)	330,5 (285,4- 355,0)	323,3 (294,4- 352,5)	0,83412
Serum drug concentration (mg/l)	-	25,90 (23,06-26,53)	

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+ZNS	P value
Hmotnost na konci pokusu (g)	428 (409,8- 462)	440 (419,8- 475,8)	0,84202
Tuková tkáň (g)	61,5 (56,6- 66,5)	51,8 (45,6- 64,9)	0,189263
Tuková tkáň (%)	16,5 (14,9-18,9)	14,5 (12,3- 19,8)	0,26906
Svalová Tkáň (g)	289 (284,1- 323,8)	307,7 (297,6- 342,7)	0,49658
Serum drug concentration (mg/l)	-	23,82 (22,75- 25,48)	

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Hladiny kostních markerů

Nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny kostních markerů mezi skupinou SHAM+ZNS oproti skupině SHAM a skupinou ORX+ZNS oproti skupině ORX.

Parameter	SHAM	SHAM+ZNS	P value
Sclerostin (pg/ml)	325,42 (257,83 – 412,94)	425,92 (333,85- 483,14)	0,660140
OPG (pg/ml)	450,83 (432,66- 703,96)	438,73 (401,68- 474,38)	0,14064
PINP (ng/ml)	71,71 (38,36- 85,75)	43,63 (33,80- 71,71)	0,34289
RANKL (pg/ml)	142,85 (128,15-421,19)	419,48 (238,29-508,83)	0,218566
BALP (ng/ml)	2,64 (2,12- 3,29)	2,88 (2,57- 2,99)	0,636502

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+ZNS	P value
Sclerostin (pg/ml)	635,35 (417,51 – 759,80)	660,57 (491,57 – 836,90)	0,874826
OPG (pg/ml)	460,25 (380,14- 598,95)	376,78 (335,71- 476,41)	0,135595
PINP (ng/ml)	89,96 (58,02- 131,03)	84,34 (54,86- 138,92)	0,92591
RANKL (pg/ml)	152,63 (84,06- 242)	275,05 (174,65- 435,39)	0,12526
BALP (ng/ml)	2,99 (1,45- 4,30)	3,23 (2,97- 3,54)	0,67688

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil).

Měření kostní minerální denzity

Po 12 týdnech podávání ZNS byla stanovena hustota kostního minerálu pomocí DXA. Ve skupině SHAM+ZNS nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl v hodnotách BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů nebo obou femurů oproti skupině SHAM. Ve skupině ORX+ZNS také nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v hodnotách BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů ani obou femurů oproti skupině ORX.

Parameter	SHAM	SHAM+ZNS	P value
Celé tělo			
BMD (g/cm ²)	0,171 (0,158- 0,178)	0,164 (0,162- 0,182)	0,94075
Diafýza pravého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,176 (0,167- 0,183)	0,171 (0,160- 0,183)	0,71901
Diafýza levého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,181 (0,163- 0,186)	0,176 (0,170- 0,186)	0,93196
Bederní obratle (L3-L5)			
BMD (g/cm ²)	0,206 (0,191- 0,218)	0,203 (0,191- 0,211)	0,64016

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+ZNS	P value
Celé tělo			
BMD (g/cm ²)	0,153 (0,149- 0,160)	0,154 (0,148- 0,158)	0,99100
Diafýza pravého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,153 (0,150- 0,163)	0,157 (0,151- 0,166)	0,45294
Diafýza levého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,163 (0,153- 0,167)	0,160 (0,152- 0,171)	0,90380
Bederní obratle (L3-L5)			
BMD (g/cm ²)	0,176 (0,174- 0,188)	0,179 (0,169- 0,182)	0,99193

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Podávání ZNS po dobu 12 týdnů nevedlo k statisticky významnému rozdílu v hodnocených parametrech mezi skupinou SHAM+ZNS oproti skupině SHAM a skupinou ORX+ZNS oproti skupině ORX.

Parameter	SHAM	SHAM+ZNS	P value
Levý femur (LF) délka (mm)	36,47 (35,83- 37,68)	36,30 (35,90- 36,91)	0,792896
Pravý femur (PF) délka (mm)	36,42 (35,37- 37,32)	35,89 (35,47- 36,74)	0,48381
LFprůměr (mm)	3,57 (3,47- 3,74)	3,47 (3,30- 3,69)	0,22269
PF průměr (mm)	3,51 (3,38- 3,61)	3,34 (3,16- 3,54)	0,13430
Tloušťka kompakty LF (mm)	0,70 (0,61- 0,70)	0,68 (0,65- 0,70)	0,980109
Tloušťka kompakty PF (mm)	0,69 (0,61- 0,70)	0,63 (0,59- 0,65)	0,087024
Mechanická odolnost LF při třibodovém ohýbání (N)	197 (184- 225)	183 (173,75- 211,75)	0,33605
Mechanická odolnost PF při třibodovém ohýbání (N)	217 (202- 234)	209,5 (191,75- 229,0)	0,29170
Maximální tlaková síla krčku levého femuru (N)	151 (121- 175)	131,5 (117,25- 153,25)	0,26576
Maximální tlaková síla krčku pravého femuru (N)	143 (118- 167)	146,5 (128,25- 179,5)	0,75879

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+ZNS	P value
Levý femur (LF) délka (mm)	35,58 (35,05- 36,42)	36,60 (34,34- 37,01)	0,75555
Pravý femur (PF) délka (mm)	35,24 (34,90- 35,90)	35,67 (34,02- 36,77)	0,98276
LFprůměr (mm)	3,20 (3,14- 3,34)	3,18 (3,06- 3,33)	0,56384
PF průměr (mm)	3,14 (3,03- 3,36)	3,21 (3,03- 3,34)	0,75273
Tloušťka kompakty LF (mm)	0,65 (0,57- 0,68)	0,58 (0,55- 0,61)	0,08994
Tloušťka kompakty PF (mm)	0,63 (0,60- 0,66)	0,59 (0,55- 0,63)	0,09654
Mechanická odolnost LF při třibodovém ohýbání (N)	162 (152- 168)	170 (151- 190)	0,27811
Mechanická odolnost PF při třibodovém ohýbání (N)	182 (177- 204)	188 (174- 195)	0,93035
Maximální tlaková síla krčku levého femuru (N)	159 (122- 160)	130 (110- 159)	0,20453
Maximální tlaková síla krčku pravého femuru (N)	146 (132-164)	152 (141- 168)	0,82681

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

7.3 Vliv gabapentinu na kostní metabolismus u potkanů

Hmotnost, tělesná skladba a hladina gabapentinu v séru

Nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny hmotnosti, zastoupení tukové tkáně a svalové tkáně ve skupině SHAM+GBP versus skupinou SHAM. Nebyl pozorován statisticky významný rozdíl ve hmotnosti, zastoupení tukové tkáně a svalové tkáně ve skupině ORX+ GBP oproti skupině ORX.

Koncentrace gabapentinu ve skupině SHAM+GBP a ORX+GBP odpovídala terapeutickému rozmezí pro člověka 2-20 mg/l.

Parameter	SHAM	SHAM+ GBP	P value
Hmotnost na konci pokusu (g)	503 (405,8- 519,8)	484,5 (468,8- 528,5)	0,67420
Tuková tkáň (g)	59,1 (41,5- 70,4)	48,2 (45,5- 55,8)	0.30601
Tuková tkáň (%)	14,5 (11,6- 17,8)	12,1 (11,2- 13,4)	0.08701
Svalová Tkáň (g)	330,5 (285,4- 355,0)	354 (336,9- 372,2)	0.09309
Serum drug concentration (mg/l)	-	8,9 (8,5- 9,6)	

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+ GBP	P value
Hmotnost na konci pokusu (g)	428 (409,8- 462)	446,5 (427,5- 475)	0,33749
Tuková tkáň (g)	61,5 (56,6- 66,5)	61 (57,4-71)	0.87483
Tuková tkáň (%)	16,5 (14,9-18,9)	16,1 (15,6-17)	0.87446
Svalová Tkáň (g)	289 (284,1- 323,8)	310,9 (296,8- 336,2)	0.22715
Serum drug concentration (mg/l)	-	7,8 (7,0- 8,4)	

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Hladiny kostních markerů

K posouzení vlivu léčby GBP na kostní obrat byly měřeny kostní markery. Ve skupině SHAM+GBP jsme nezjistili žádné statisticky významné změny markerů kostního obratu oproti skupině SHAM. Ve skupině ORX+GBP došlo k statisticky významnému zvýšení hladiny RANKL oproti skupině ORX. Ostatní hladiny kostních markerů ve skupině ORX+GBP nebyly statisticky významné.

Parameter	SHAM	SHAM+GBP	P value
Sclerostin (pg/ml)	325,42 (257,83 – 412,94)	327,11 (297,92-449,31)	0.69891
OPG (pg/ml)	450,83 (432,66- 703,96)	611,08 (567,98- 674,35)	0.18926
PINP (ng/ml)	71,71 (38,36- 85,75)	80,13 (54,33- 108,39)	0.34073
RANKL (pg/ml)	142,85 (128,15-421,19)	309,3 (255,45- 379,06)	0.26049
BALP (ng/ml)	2,64 (2,12- 3,29)	2,73 (2,04- 2,86)	0.51557

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+GBP	P value
Sclerostin (pg/ml)	635,35 (417,51 – 759,80)	554,5 (459,03- 662,66)	0.49484
OPG (pg/ml)	460,25 (380,14- 598,95)	484,5 (418,5- 517,48)	0.93590
PINP (ng/ml)	89,96 (58,02- 131,03)	83,64 (36,43- 150,33)	0.98092
RANKL (pg/ml)	152,63 (84,06- 242)	576,18 (466- 705,93)	0.00050
BALP (ng/ml)	2,99 (1,45- 4,30)	2,79 (2,54- 3,24)	0.78216

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Měření kostní minerální denzity

Po 12 týdnech podávání GBP byla stanovena hustota kostního minerálu pomocí DXA. Ve skupině SHAM+GBP nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů ani obou femurů oproti skupině SHAM. Ve

skupině ORX+GBP nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů nebo obou femurů oproti skupině ORX.

Parameter	SHAM	SHAM+GBP	P value
Celé tělo			
BMD (g/cm ²)	0,171 (0,158- 0,178)	0,171 (0,17-0,174)	0.63468
Diafýza pravého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,176 (0,167- 0,183)	0,175 (0,17-0,18)	0.79044
Diafýza levého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,181 (0,163- 0,186)	0,178 (0,165-0,184)	0.80779
Bederní obratle (L3-L5)			
BMD (g/cm ²)	0,206 (0,191- 0,218)	0,203 (0,197-0,209)	0.78300

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+ GBP	P value
Celé tělo			
BMD (g/cm ²)	0,153 (0,149- 0,160)	0,157 (0,155- 0,159)	0.11465
Diafýza pravého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,153 (0,150- 0,163)	0,159 (0,153- 0,167)	0.36227
Diafýza levého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,163 (0,153- 0,167)	0,165 (0,158- 0,174)	0.24045
Bederní obratle (L3-L5)			
BMD (g/cm ²)	0,176 (0,174- 0,188)	0,174 (0,172- 0,184)	0.67420

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Bylo provedeno mechanické testování odolnosti levého a pravého femuru po podávání GBP po dobu 12 týdnů. Testování nevedlo k statisticky významnému rozdílu v hodnocených parametrech mezi skupinou SHAM+GBP oproti skupině SHAM a skupinou ORX+GBP oproti skupině ORX.

Parameter	SHAM	SHAM+GBP	P value
Levý femur (LF) délka (mm)	36,47 (35,83- 37,68)	37,7 (35,63- 38,78)	0.56352
Pravý femur (PF) délka (mm)	36,42 (35,37- 37,32)	37,44 (35,76-39)	0.35350
LFprůměr (mm)	3,57 (3,47- 3,74)	3,6 (3,44-3,74)	0.92620
PF průměr (mm)	3,51 (3,38- 3,61)	3,46 (3,25-3,54)	0.18460
Tloušťka kompakty LF (mm)	0,70 (0,61- 0,70)	0,69 (0,63-0,78)	0.44080
Tloušťka kompakty PF (mm)	0,69 (0,61- 0,70)	0,67 (0,66- 0,80)	0.980109
Mechanická odolnost LF při tříbodovém ohýbání (N)	197 (184- 225)	211 (191- 227)	0.69957
Mechanická odolnost PF při tříbodovém ohýbání (N)	217 (202- 234)	239 (220- 245)	0.27797
Maximální tlaková síla krčku levého femuru (N)	151 (121- 175)	162 (153- 173)	0.39296
Maximální tlaková síla krčku pravého femuru (N)	143 (118- 167)	163 (153- 172)	0.44581

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+ GBP	P value
Levý femur (LF) délka (mm)	35,58 (35,05- 36,42)	36,2 (34,9- 36,39)	0.71299
Pravý femur (PF) délka (mm)	35,24 (34,90- 35,90)	35,87 (34,51- 36,17)	0.79968
LFprůměr (mm)	3,20 (3,14- 3,34)	3,31 (3,21- 3,34)	0.61656
PF průměr (mm)	3,14 (3,03- 3,36)	3,16 (3,13- 3,30)	0.74749
Tloušťka kompakty LF (mm)	0,65 (0,57- 0,68)	0,62 (0,58- 0,65)	0.37326
Tloušťka kompakty PF (mm)	0,63 (0,60- 0,66)	0,62 (0,57- 0,63)	0.28799
Mechanická odolnost LF při třibodovém ohýbání (N)	162 (152- 168)	181 (176-184)	0.06173
Mechanická odolnost PF při třibodovém ohýbání (N)	182 (177- 204)	197 (191- 206)	0.24851
Maximální tlaková síla krčku levého femuru (N)	159 (122- 160)	138 (119- 143)	0.14854
Maximální tlaková síla krčku pravého femuru (N)	146 (132-164)	147 (128- 158)	0.62090

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

7.4 Vliv pregabalínu na kostní metabolismus u potkanů

Hmotnost, tělesná skladba a hladina pregabalínu v séru

Bylo pozorováno statisticky nevýznamné snížení hmotnosti ve skupině SHAM+PGB oproti skupině SHAM a ORX+PGB ve srovnání se skupinou ORX. Nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny v zastoupení tukové tkáně a svalové tkáně ve skupině SHAM+PGB a ORX+PGB oproti kontrolním skupinám.

Koncentrace pregabalínu v obou skupinách odpovídala terapeutickému rozmezí pro člověka 2-8 mg/l.

Parameter	SHAM	SHAM+ PGB	P value
Hmotnost na konci pokusu (g)	503 (405,8- 519,8)	486,5 (478,5- 516)	0,71319
Tuková tkáň (g)	59,1 (41,5- 70,4)	60,6 (52,7- 66,9)	0.56352
Tuková tkáň (%)	14,5 (11,6- 17,8)	15 (13,7- 18,2)	0.49484
Svalová Tkáň (g)	330,5 (285,4- 355,0)	334,3 (317,1- 341,5)	0.78318
Serum drug concentration (mg/l)	-	3,9 (3,6- 4,3)	

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+ PGB	P value
Hmotnost na konci pokusu (g)	428 (409,8- 462)	425 (416,2- 441,3)	0,63786
Tuková tkáň (g)	61,5 (56,6- 66,5)	70,8 (65,4- 71,5)	0.09334
Tuková tkáň (%)	16,5 (14,9-18,9)	19,3 (18,4- 20,5)	0.10379
Svalová Tkáň (g)	289 (284,1- 323,8)	278,5 (263,1- 297,9)	0.11821
Serum drug concentration (mg/l)	-	4,8 (4,5- 5,0)	

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Hladiny kostních markerů

Po 12 týdnech byly měřeny markery kostního obratu. Ve skupině SHAM+PGB jsme zaznamenali statisticky významně zvýšenou hladinu sklerostinu oproti skupině SHAM. Ve skupině ORX+PGB došlo k statisticky významnému zvýšení hladiny RANKL oproti skupině ORX. Ostatní hladiny kostních markerů nevykazovaly statistickou významnost.

Parameter	SHAM	SHAM+PGB	P value
Sclerostin (pg/ml)	325,42 (257,83 – 412,94)	707,48 (520,25- 1037,06)	0.00686
OPG (pg/ml)	450,83 (432,66- 703,96)	481,8 (428,6- 544,4)	0.79290
PINP (ng/ml)	71,71 (38,36- 85,75)	87,50 (55,21- 96,45)	0.43425
RANKL (pg/ml)	142,85 (128,15-421,19)	546,78 (473,31- 652,05)	0.06371
BALP (ng/ml)	2,64 (2,12- 3,29)	2,75 (2,62- 3,05)	0.37203

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+PGB	P value
Sclerostin (pg/ml)	635,35 (417,51 – 759,80)	882,34 (463,28- 1343,33)	0.49484
OPG (pg/ml)	460,25 (380,14- 598,95)	415,83 (391,6- 428,61)	0.18894
PINP (ng/ml)	89,96 (58,02- 131,03)	126,46 (81,53- 166,13)	0.27780
RANKL (pg/ml)	152,63 (84,06- 242)	598,18 (551,66- 709,56)	0.00009
BALP (ng/ml)	2,99 (1,45- 4,30)	3,11 (2,65- 3,18)	0.84559

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Měření kostní minerální denzity

Hustota kostního minerálu byla měřena po 12 týdnech podávání PGB. Ve skupině SHAM+PGB nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů ani obou femurů oproti skupině SHAM. Ve skupině ORX+PGB nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů nebo obou femurů oproti skupině ORX.

Parameter	SHAM	SHAM+PGB	P value
Celé tělo			
BMD (g/cm ²)	0,171 (0,158- 0,178)	0,178 (0,171- 0,180)	0.17205
Diafýza pravého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,176 (0,167- 0,183)	0,177 (0,169- 0,182)	0.53856
Diafýza levého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,181 (0,163- 0,186)	0,178 (0,173- 0,180)	0.87483
Bederní obratle (L3-L5)			
BMD (g/cm ²)	0,206 (0,191- 0,218)	0,214 (0,207- 0,220)	0.21399

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+ PGB	P value
Celé tělo			
BMD (g/cm ²)	0,153 (0,149- 0,160)	0,159 (0,153- 0,161)	0.087024
Diafýza pravého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,153 (0,150- 0,163)	0,153 (0,151- 0,161)	0.84452
Diafýza levého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,163 (0,153- 0,167)	0,157 (0,154- 0,161)	0.25264
Bederní obratle (L3-L5)			
BMD (g/cm ²)	0,176 (0,174- 0,188)	0,181 (0,177- 0,186)	0.77603

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Podávání PGB po dobu 12 týdnů nevedlo k statisticky významnému rozdílu v hodnocených parametrech mezi skupinou SHAM+PGB oproti skupině SHAM a skupinou ORX+PGB oproti skupině ORX.

Paraméter	SHAM	SHAM+PGB	P value
Levý femur (LF) délka (mm)	36,47 (35,83- 37,68)	36,76 (35,89-37,99)	0.71299
Pravý femur (PF) délka (mm)	36,42 (35,37- 37,32)	36,48 (36,08- 37,77)	0.79904
LFprůměr (mm)	3,57 (3,47- 3,74)	3,51 (3,37- 3,60)	0.10868
PF průměr (mm)	3,51 (3,38- 3,61)	3,38 (3,32- 3,52)	0.14681
Tloušťka kompakty LF (mm)	0,70 (0,61- 0,70)	0,62 (0,58- 0,69)	0.12536
Tloušťka kompakty PF (mm)	0,69 (0,61- 0,70)	0,64 (0,60-0,66)	0.087024
Mechanická odolnost LF při tříbodovém ohýbání (N)	197 (184- 225)	212 (198- 217)	0.38170
Mechanická odolnost PF při tříbodovém ohýbání (N)	217 (202- 234)	218 (204- 240)	0.65684
Maximální tlaková síla krčku levého femuru (N)	151 (121- 175)	155 (131-158)	0.84236
Maximální tlaková síla krčku pravého femuru (N)	143 (118- 167)	159 (145- 182)	0.26791

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+ PGB	P value
Levý femur (LF) délka (mm)	35,58 (35,05- 36,42)	35,15 (34,44-35,84)	0.23521
Pravý femur (PF) délka (mm)	35,24 (34,90- 35,90)	34,76 (34,19- 35,44)	0.11504
LFprůměr (mm)	3,20 (3,14- 3,34)	3,17 (3,14-3,28)	0.52124
PF průměr (mm)	3,14 (3,03- 3,36)	3,23 (3,09-3,31)	0.93151
Tloušťka kompakty LF (mm)	0,65 (0,57- 0,68)	0,6 (0,59-0,64)	0.30330
Tloušťka kompakty PF (mm)	0,63 (0,60- 0,66)	0,62 (0,59-0,68)	1.00000
Mechanická odolnost LF při třibodovém ohýbání (N)	162 (152- 168)	172 (158- 184)	0.32533
Mechanická odolnost PF při třibodovém ohýbání (N)	182 (177- 204)	198 (181- 204)	0.82168
Maximální tlaková síla krčku levého femuru (N)	159 (122- 160)	145 (124- 159)	0.64755
Maximální tlaková síla krčku pravého femuru (N)	146 (132-164)	158 (141- 181)	0.48489

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05

7.5 Vliv levetiracetamu na kostní metabolismus u potkanů

Hmotnost, tělesná skladba a hladina levetiracetamu v séru

Hmotnost potkanů užívajících SLD s LEV byla na konci pokusu snížena, ale statisticky nevýznamně oproti kontrolním skupinám. Ve skupině SHAM+LEV bylo zjištěno statisticky významné snížení tukové tkáně (g, %), ne však svalové tkáně, oproti kontrolní skupině SHAM. Ve skupině ORX+LEV došlo k nevýznamnému poklesu svalové tkáně a snížení tukové tkáně oproti skupině ORX.

Koncentrace LEV odpovídala v obou skupinách terapeutickému rozmezí u člověka (35,3 – 235 $\mu\text{mol/l}$).

Parameter	SHAM	SHAM+LEV	P value
Hmotnost na konci pokusu (g)	408,1 (387,5-429,75)	393,4 (383- 405,2)	0,44322
Tuková tkáň (g)	61,8 (60,65-63,5)	35,85 (31,58- 37,1)	0,001460
Tuková tkáň (%)	15,4 (14,65-15,9)	8,95 (7,9-9,4)	0,002066
Svalová Tkáň (g)	345,1 (323,95-366,85)	358,8 (344,8- 372,4)	0,50220
Serum drug concentration ($\mu\text{mol/l}$)	-	225,35 (215,23- 235,25)	

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+LEV	P value
Hmotnost na konci pokusu (g)	400,5 (385,95- 410,75)	390,6 (388,18- 402,93)	0,74320
Tuková tkáň (g)	75,7 (66,03- 80,7) ^a	66,1 (56,45- 76,08)	0,318069
Tuková tkáň (%)	18,6 (16,65- 19,8)	16,9 (13,2- 19,75)	0,38446
Svalová Tkáň (g)	328,8 (308,93- 336,85)	318 (310,5- 344,7)	0,69324
Serum drug concentration ($\mu\text{mol/l}$)	-	197,75 (188,4- 210,23)	

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Hladiny kostních markerů

K posouzení vlivu léčby LEV na kostní obrát byly měřeny kostní markery. U skupiny potkanů SHAM+LEV došlo po 12 týdnech k staticky významnému zvýšení BALP a CTX-I. U skupiny ORX+LEV byly pozorovány statisticky významně zvýšené hladiny BALP, CTX-I a RANKL oproti kontrolní skupině orchidektomovaných potkanů (ORX).

Parameter	SHAM	SHAM+LEV	P value
BALP (ng/ml)	1,069 (0,882-1,888)	3,62 (2,12- 4,87)	0,00868
Sclerostin	469,62 (377,474-539,791)	420,27 (380,67- 505,97)	0,792896
CTX I (pg/ml)	83,015 (46,301-152,004)	340,24 (114,50- 569,41)	0,03438
PINP (ng/ml)	1,045 (0,93-1,12)	4,45 (0- 8,80)	0,282673
RANKL (pg/ml)	359,41 (348,886-592,977)	581,58 (467,16- 791,77)	0,14679

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+LEV	P value
BALP (ng/ml)	1,283 (0,954- 1,531)	3,911 (3,631-4,605)	0,00071
Sclerostin	332,936 (112,56- 473,18)	435,5 (413,67- 467,56)	0,18327
CTX I (pg/ml)	32,513 (0- 126,09)	564,4 (513,37- 851,54)	0,005051
PINP (ng/ml)	0,875 (0,41-1,52)	1,199 (0- 10,613)	0,282673
RANKL (pg/ml)	312,072 (197,04- 364,58)	659,16 (555,4- 760,3)	0,00085

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Měření kostní minerální denzity

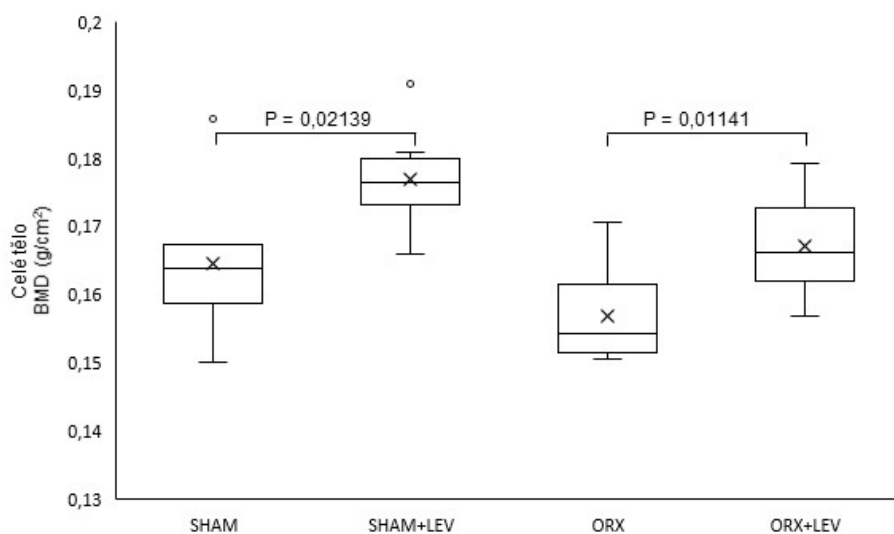
Hustota kostního minerálu byla měřena po 12 týdnech podávání LEV. Bylo zjištěno statisticky významné zvýšení BMD celého těla a to jak ve skupině SHAM+LEV, tak i ve skupině ORX+LEV oproti kontrolním skupinám. Hodnoty BMD bederních obratlů, pravého a levého femuru nebyly statisticky významně změněné ve skupině SHAM+LEV a ORX+LEV oproti kontrolním skupinám.

Parameter	SHAM	SHAM+LEV	P value
Celé tělo			
BMD (g/cm ²)	0,164 (0,160-0,166)	0,176 (0,173-0,178)	0,02139
Diafýza pravého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,185 (0,176-0,196)	0,178 (0,172- 0,189)	0,685443
Diafýza levého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,186 (0,177-0,186)	0,182 (0,173- 0,190)	0,78785
Bederní obratle (L3-L5)			
BMD (g/cm ²)	0,220 (0,197-0,222)	0,22 (0,215- 0,225)	0,24142

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+LEV	P value
Celé tělo			
BMD (g/cm ²)	0,154 (0,152- 0,160)	0,166 (0,162-0,1712)	0,01141
Diafýza pravého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,171 (0,166- 0,176)	0,169 (0,165- 0,173)	0,89917
Diafýza levého femuru			
BMD (g/cm ²)	0,165(0,149- 0,171)	0,164 (0,156- 0,171)	0,92336
Bederní obratle (L3-L5)			
BMD (g/cm ²)	0,192 (0,186- 0,202)	0,200 (0,197- 0,208)	0,55136

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.



Graf č. 3: Porovnání naměřených hodnot BMD mezi skupinou SHAM versus SHAM+LEV a skupinou ORX versus ORX+LEV

Testování mechanické odolnosti kostní tkáně

Podávání LEV po dobu 12 týdnů nevedlo k statisticky významnému rozdílu v hodnocených parametrech mezi skupinou SHAM+LEV oproti skupině SHAM a skupinou ORX+LEV oproti skupině ORX.

Parameter	SHAM	SHAM+LEV	P value
Levý femur (LF) délka (mm)	37,44 (36,94-38,26)	37,38 (37,12- 37,99)	0,93090
Pravý femur (PF) délka (mm)	37,02 (36,705- 38,165)	37,31 (36,92- 37,72)	0,95235
LFprůměr (mm)	3,39 (3,315-3,63)	3,52 (3,46- 3,74)	0,73359
PF průměr (mm)	3,49 (3,4-3,655)	3,59 (3,52-3,7)	0,86066
Tloušťka kompakty LF (mm)	0,65 (0,605-0,67)	0,60 (0,588- 0,64)	0,416636
Tloušťka kompakty PF (mm)	0,71 (0,65-0,72)	0,65 (0,60- 0,67)	0,07383
Mechanická odolnost LF při třibodovém ohýbání (N)	187,5 (176,25-203,5)	191,5 (179,75- 228,5)	0,82003
Mechanická odolnost PF při třibodovém ohýbání (N)	223 (215,25-238)	233 (226,75- 243,75)	0,92059
Maximální tlaková síla krčku levého femuru (N)	112 (101,75-157)	147,5 (139- 160,75)	0,09937
Maximální tlaková síla krčku pravého femuru (N)	139 (128,5-147,5)	151 (126-152)	0,96539

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

Parameter	ORX	ORX+LEV	P value
Levý femur (LF) délka (mm)	36,31 (35,59- 36,87)	36,3 (36,07- 36,71)	0,93090
Pravý femur (PF) délka (mm)	36,46 (35,64- 36,69)	36,73 (36,11- 36,94)	0,95235
LFprůměr (mm)	3,46- (3,4- 3,55)	3,49 (3,46- 3,51)	0,73359
PF průměr (mm)	3,41 (3,32- 3,51)	3,49 (3,36-3,54)	0,86066
Tloušťka kompakty LF (mm)	0,65 (0,62- 0,68)	0,63 (0,62- 0,64)	0,416636
Tloušťka kompakty PF (mm)	0,63 (0,60- 0,65)	0,62 (0,62- 0,63)	0,07383
Mechanická odolnost LF při třibodovém ohýbání (N)	182,5 (174-190)	188 (173,5- 195,75)	0,82003
Mechanická odolnost PF při třibodovém ohýbání (N)	208,5 (185- 222,5)	211,5 (205- 222,5)	0,92059
Maximální tlaková síla krčku levého femuru (N)	129,5 (109-143)	132 (126-139)	0,09937
Maximální tlaková síla krčku pravého femuru (N)	135,5 (128-143,75)	130,5 (118,25- 137,75)	0,96539

Data jsou vyjádřena jako medián (25.-75. percentil); *p <0,05.

8. Diskuze

U pacientů užívajících AED "starší generace", zejména induktory enzymů cytochromu p450 (CYP450): karbamazepin, fenytoin, fenobarbital a primidon, bylo pozorováno snížení kostní minerální denzity (BMD), která je nejvýznamnějším prediktorem rizika zlomenin (Ko et al, 2020). U pacientů léčených novějšími AED, které neindukují enzymy, je méně pravděpodobné, že u nich bude diagnostikována osteoporóza. Většina studií o AED je průřezová. Existuje pouze několik longitudinálních studií s novějšími AED a jejich vlivem na kosti.

Sledování kvality kostní tkáně u lidí je do značné míry problematické, protože výsledky studií mohou být ovlivněny řadou rozličných faktorů, mezi které se řadí fyzická aktivita, strava, frekvence záchvatů, rozdíly ve výchozích hodnotách BMD mezi hodnocenými subjekty a užívání jiných AED v minulosti. Naproti tomu nám zvířecí model poskytuje systém, který je izolován od nemoci, životního stylu, léků a dalších matoucích faktorů.

8.1 Vliv orchidektomie na kostní metabolismus u potkanů

Byli porovnávány výsledky dvou skupin potkanů kmene Wistar, kdy jedna skupina potkanů podstoupila orchidektomii (ORX) a u druhé skupiny byl proveden pouze operační řez (SHAM). V důsledku orchidektomie jsme u potkanů po 12 týdnech pozorovali statisticky významné snížení BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů, pravého a levého femuru. Provedená orchidektomie měla vliv na průměr pravého a levého femuru a způsobila sníženou mechanickou odolnost těchto kostí. Po provedené orchidektomii dochází k poklesu hladiny androgenů, které jsou nezbytné nejen pro vývoj kostí, ale i pro udržení kostní hmoty. Naše výsledky jsou v souladu se studií provedenou na myších, které byly vystaveny blokaci androgenních receptorů, což se projevilo výrazným poškozením mikrostruktury kostí a poklesem BMD (Chen et al, 2019). Také jiná studie na potkanech ukazuje, že deficece androgenů negativně ovlivňuje stavbu těla snížením celkové hmotnosti, nárůstem tělesného tuku a snížením BMD (Vanderschueren et al., 2000). Nejdůležitější androgeny jsou především testosteron a 5 α -dihydrotestosteron (DHT), které ovlivňují lidskou kostru u mužů i žen.

Testosteron působí na skelet anabolicky prostřednictvím přenosu signálu vazbou na androgenní receptor nebo přeměnou na 17- beta estradiol prostřednictvím enzymu aromatázy (z rodiny cytochromů P450), který se pak váže na estrogenové receptory. Jak estrogény, tak testosteron mají receptory na všech kostních buňkách, přičemž androgenní receptory dominují na osteoblastech a osteocytech. Androgeny zvyšují proliferaci, diferenciaci osteoblastů a podílejí se na regulaci mineralizace kostní tkáně. Androgeny také regulují aktivitu osteoklastů (Leder et al., 2020). U dospělých jsou stavy androgenní deprivace spojeny s významným snížením minerální kostní hustoty. Se stárnutím dochází k poklesu biologicky dostupných hladin testosteronu i estradiolu, částečně v důsledku zvýšené produkce globulinu vázajícího pohlavní hormony. Pokles hladin androgenů je paralelní s poklesem kortikální i trabekulární hustoty kostního minerálu, s čímž souvisí zvýšení rizika zlomenin ve srovnání s běžnou populací (Leder et al., 2020).

Naše výsledky potvrzují dostupná fakta, že deficit androgenů u rostoucích potkanů negativně ovlivňuje vývoj kostí. Mladý potkan ve vývinu po provedené orchidektomii může být považován za vhodný zvířecí model pro studium osteopenie.

8.2 Vliv zonisamidu na kostní metabolismus u potkanů

V tomto pokusu nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny BMD ve skupině ORX+ZNS versus skupina ORX a skupina SHAM+ZNS ve srovnání se skupinou SHAM. Důkazy týkající se vlivu ZNS na BMD a kostní metabolismus jsou omezené. V literatuře je zatím uvedeno jen málo a rozporupných údajů o této problematice. Ve studii Takahashi et al., vedlo podávání ZNS v dávce 80 mg/kg denně subkutánně po dobu 5 týdnů k významnému snížení hodnoty BMD tibie i femuru u potkanů. Jejich výsledky naznačují, že ZNS může způsobovat úbytek kostní hmoty u zvířecího modelu. Na rozdíl od předchozích výsledků, nebyl v naší studii zjištěn negativní vliv ZNS na hodnotu BMD. Na konci našeho pokusu byla hladina ZNS ve skupině ORX+ZNS 24,00 mg/l a ve skupině SHAM+ZNS 25,13 mg/l, což odpovídá terapeutickým hladinám léku (10- 40 mg/l). Možnost porovnání výsledků obou studií je omezená, protože neznáme jejich sérovou koncentraci ZNS. V literatuře se popisuje, že AED mají bifázický účinek na kosti v závislosti na dávce. Snížená biomechanická

pevnost trabekulární kosti a snížené hladiny sérového osteokalcinu, markeru tvorby kosti, byly pozorovány při nízké dávce levetiracetamu (koncentrace $122 \pm 41 \mu\text{mol/l}$), ale nikoliv při podávání vysoké dávky levetiracetamu (koncentrace $277 \pm 65 \mu\text{mol/l}$) (Nissen-Meyer et al., 2008). Také fenytoin (PTH) vykazuje na dávce závislý účinek na kost. Zatímco terapeutické dávky PHT jsou spojeny s urychlením úbytku BMD, nízké dávky tohoto léku mají osteogenní účinek (Pack, 2008). Nelze vyloučit, že i ZNS může ovlivňovat kost v závislosti na jeho dávce. V naší studii jsou výsledky v souladu se studií Koo et al., která byla hodnocena na lidech (Koo et al, 2020). Byly zkoumány účinky ZNS na BMD a biomarkery kostního metabolismu po 13 měsících léčby u pacientů s epilepsií. Monoterapie ZNS neměla škodlivé účinky na zdraví kostí. Zkoumali jsme také vliv ZNS na mechanickou odolnost kostní tkáně. Po 12 týdnech podávání ZNS jsme nezaznamenali statisticky významný rozdíl v parametrech mezi skupinou ORX+ZNS oproti skupině ORX a skupinou SHAM+ZNS oproti skupině SHAM. Výsledky našeho pokusu naznačují, že ZNS nemá negativní vliv na pevnost kostí. Studie Koo et al. rovněž prezentuje, že monoterapie ZNS nemá negativní vliv na kostní metabolismus a pevnost kostí (Koo et al, 2020).

Mechanismus účinku působení ZNS na kost je stále nejasný. ZNS je slabým inhibítorem karboanhydrázy, což vede k renální acidóze, která může mít za následek sekundární abnormality na kosti (Pack et al., 2008). TPM stejně jako ZNS je inhibítorem karboanhydrázy. Ve studii Simko et al. bylo prokázáno, že monoterapie TPM po dobu 12 týdnů u orchidektomovaných potkanů měla negativní vliv na BMD a snižovala mechanickou pevnost kosti (Simko et al, 2014). Existují i další studie, které podporují riziko vlivu TPM na kostní tkáň a abnormální BMD (Zhang et al., 2010, Coppola et al., 2009).

V předchozí studii Takahashiho et al., léčba ZNS významně zvýšila sérovou hladinu pyridinolinu, markeru kostní resorpce, zatímco sérová hladina osteokalcinu, markeru kostní formace, nebyla ovlivněna. Tato zjištění naznačují, že na modelu potkanů může ZNS způsobovat úbytek kostní hmoty spíše urychlením kostní resorpce než inhibicí kostní formace (Takahashi et al., 2003). V jiné studii na lidech se však markery kostní formace (BALP a OC) a marker kostní resorpce (C-telopeptid) po 13 měsících léčby ZNS významně nezměnily (Koo et al, 2020). V tomto pokusu jsme stanovili několik markerů kostní formace a kostní resorpce. Zjištěné výsledky naznačují, že léčba ZNS

gonadálně intaktních potkanů a potkanů po orchidektomii po dobu 12 týdnů vedla k statisticky nevýznamným změnám v markerech kostní formace a kostní resorpce.

Závěrem lze říci, že experimentální výsledky našeho pokusu naznačují, že dlouhodobé podávání ZNS u orchidektomovaných potkanů a gonadálně intaktních potkanů nemá negativní vliv na hodnoty BMD, markery kostního metabolismu ani mechanickou odolnost kostní tkáně.

8.3 Vliv gabapentinu a pregabalínu (gabapentinoidů) na kostní metabolismus u potkanů

Po 12 týdnech podávání GBP a PGB nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny BMD ani mechanické odolnosti pravého a levého femuru u gonadálně intaktních potkanů, ani u orchidektomovaných potkanů. Nebyly pozorovány žádné změny markerů kostního obratu s výjimkou RANKL, markeru odrážejícího aktivitu osteoklastů, ve skupině ORX+GBP a ORX+PGB. Ve skupině SHAM+PGB byl zjištěn statisticky významně zvýšený sklerostin oproti skupině SHAM. V případě GBP se naše zjištění shodují se studií Kandy et al., která neprokázala žádné významné změny v BMD, mechanické pevnosti kostí nebo kostních markerech u zvířat vystavených nižším dávkám GBP (30 mg/kg) (Kanda et al., 2017). Bohužel v této studii nedošlo ke stanovení sérových hladin GBP. V naší studii byly sérové hladiny GBP relativně nízké. Medián a mezikvartilové rozmezí sérových hladin GBP u gonadálně intaktních a orchidektomovaných potkanů byly 8,9 (8,5-9,6) mg/l, resp. 7,8 (7,0-8,4) mg/l. Na základě farmakokinetických údajů získaných po perorálním podání GBP (Aryal et al., 2011) lze předpokládat, že hladiny GBP zjištěné v naší studii nebyly vyšší než hladiny dosažené po perorálním podání GBP v dávce 30 mg/kg a výsledky obou studií jsou srovnatelné. Účinek GBP na kosti je pravděpodobně závislý na dávce. Vystavení vyšším dávkám GBP (150 mg/kg) vedlo k významnému snížení osteokalcinu (marker kostní formace) a zvýšení tartrát-rezistentní kyselé fosfatázy 5b (marker kostní resorpce). BMD a mechanická pevnost kosti nebyly v této studii ovlivněny, ale histomorfometrické analýzy ukázaly negativní změny, včetně snížení objemu kosti, objemu osteoidu a zvýšení počtu osteoklastů (Kanda et al., 2017).

Naše výsledky, které ukazují posun v hladinách RANKL u potkanů po orchidektomii, naznačují, že riziko negativních účinků GBP nebo PGB na kost může záviset na hormonálním stavu zvířat. Nedostatek pohlavních hormonů má škodlivé účinky na kostní tkáň. Ačkoli základní mechanismy negativního vlivu GBP a PGB na kost jsou nejasné. O účincích gabapentinoidů na hladinu sklerostinu nejsou k dispozici žádné údaje. V naší studii jsme u gonadálně intaktních zvířat pozorovali zvýšení sklerostinu ve skupině PGB. Sklerostin je důležitým parakrinním regulátorem kostní hmoty a může mít katabolické účinky prostřednictvím inhibice funkce osteoblastů a zároveň stimulace funkce osteoklastů (Delgado-Calle et al., 2017). V naší studii však změna hladiny sklerostinu nebyla spojena s významnými změnami BMD nebo mechanické pevnosti kosti. Můžeme pouze spekulovat, že změny obou výše zmíněných biochemických markerů předcházejí pozdějším změnám BMD a mechanické odolnosti kosti. Vzhledem k nekonzistentnosti účinků AED na markery kostního obratu a špatné nebo neexistující korelaci mezi BMD a mechanickou pevností kosti je histomorfometrická analýza kosti jedním z relevantních diagnostických nástrojů pro správné a komplexní posouzení rizika antiepileptik pro zdraví kostí (Kanda et al., 2017; Nissen-Meyer et al., 2007).

Vyvstává otázka, zda je 12 týdnů dlouhá expozice gabapentinoidům dostatečná k tomu, aby došlo k změnám BMD nebo mechanické pevnosti kostí. Kanda et al. (Kanda et al., 2017) považovali tento interval za příliš krátký a diskutovali o něm jako o jednom z omezení své studie. Na základě údajů od Sengupty (Sengupta, 2013) však jeden měsíc života potkana přibližně odpovídá třem lidským rokům. Doba sledování v naší studii a ve studii Kanda et al. (Kanda et al., 2017) byla tedy srovnatelná s přibližně devíti lidskými roky. Usoudili jsme, že interval 12 týdnů podávání GBP a PGB by měl být dostatečný k posouzení vlivu AED na BMD nebo mechanickou pevnost kostí na modelu potkanů. Vzhledem k tomu, že ani nízké, ani vysoké dávky GBP neměly vliv na BMD nebo mechanickou pevnost kostí, lze GBP považovat za léčivo s nižším rizikem pro zdraví kostí ve srovnání s AED, která jsou induktory jaterních enzymů.

Námi zjištěné výsledky ohledně PGB jsou v souladu se studií Akin et al., která nezaznamenala negativní vliv PGB na kostní metabolismus a BMD. Do studie bylo zahrnuto 40 jedinců užívajících PGB déle než 6 měsíců a výsledky byly porovnány se 40 zdravými lidmi. Byly měřeny kostní markery-ALP, osteokalcin a CTX-I a BMD pomocí DXA. Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v BMD bederní páteře a krčku

femuru ani žádné rozdíly v biochemických markerech mezi těmito dvěma skupinami. Pacienti užívající PGB méně než 24 měsíců, měli nižší hodnoty T a Z skóre v oblasti bederní páteře než pacienti, kteří PGB užívali déle než 24 měsíců. Tento efekt byl výraznější u pacientů mužského pohlaví (Akin et al., 2022).

V naší studii GBP ani PGB neovlivňovaly BMD ani mechanickou pevnost kostí, lze je považovat za léky s nižším rizikem pro zdraví kostí. Na základě hodnocení hladin RANKL, je možné naznačit, že účinek GBP a PGB na aktivitu osteoklastů může být závislý na hormonálním stavu zvířat. Nelze vyloučit, že u zvířat s nedostatkem pohlavních hormonů existuje vyšší riziko ztráty kostní hmoty po expozici GBP a PGB.

8.4 Vliv levetiracetamu na kostní metabolismus u potkanů

Na modelu orchidektomovaných potkanů bylo zjištěno, že dlouhodobá léčba LEV významně zvýšila BMD celého těla. Dále byl zjištěný významný vzestup kostních markerů-BALP, CTX-I a RANKL. Nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v mechanické odolnosti kosti. Během pokusu došlo k nevýznamnému snížení absolutní i relativní hodnoty tukové tkáně a svalové tkáně. Na modelu potkanů, u kterých byl proveden pouze operační řez bylo po 12 týdnech užívání LEV naměřeno statisticky významné zvýšení BMD celého těla. Naměřili jsme statisticky významné zvýšení markeru kostní formace-BALP, tak i markeru kostní resorpce CTX-I. Nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny v odolnosti kosti oproti skupině SHAM. Bylo potvrzeno významné snížení tukové tkáně v porovnání se skupinou SHAM.

Naše výsledky jsou v souladu se studií na zvířatech provedenou Anwarem et al., ve které nebyl zjištěn žádný vliv LEV na BMD u myších samic po 4 měsících perorálního podávání léku (Anwar et al., 2014). Ve studii Kanda et al, perorální podávání LEV potkanům po dobu 12 týdnů neovlivnilo BMD a kostní metabolismus (Kanda et al, 2017). Naměřené hodnoty BMD jsou také srovnatelné s další studií Nissen-Meyer et al. Jejich výsledky naznačují, že LEV by mohl mít na kosti dvoufázový účinek. Při nízké dávce LEV (koncentrace $122 \pm 41 \mu\text{mol/l}$) byla pozorována snížená mechanická odolnost trabekulární kosti a snížené hladiny sérového osteokalcinu, ale nikoliv při podání vysoké dávky LEV (koncentrace $277 \pm 65 \mu\text{mol/l}$) (Nissen-Meyer et al., 2008).

V našem experimentu byla sérová hladina LEV 225,35 $\mu\text{mol/l}$ (215, 23 - 235,25 $\mu\text{mol/l}$) ve skupině SHAM+LEV a 197,75 35 $\mu\text{mol/l}$ (188,4- 210,23 $\mu\text{mol/l}$) ve skupině ORX+LEV, což je srovnatelné s vysokou dávkou LEV ve studii Nissena-Meyera. Také některé studie u lidí naznačují, že expozice LEV nemá negativní vliv na BMD. Pacienti užívající novější AED neindukující enzymy (včetně LEV) mají vyšší hodnoty T-skóre (hodnotila se oblast kyčle, krčku stehenní kosti a bederní páteře) a menší pravděpodobnost vzniku osteoporózy (Artemiadis et al., 2016). Phabphal et al. uvádí, že u všech pacientů, kteří přešli z užívání fenytoinu na LEV, došlo k významnému zlepšení BMD (Phabphal et al., 2013). Jiná studie naopak naznačila, že pacienti dlouhodobě léčení LEV mají vyšší riziko poklesu BMD; validita této studie je však omezená, protože chybí měření výchozí hodnoty BMD před léčbou LEV (Beniczky et al., 2012). Zajímavé výsledky přinesla i průřezová studie Gozükızıl et al., která hodnotila u 47 lidí vliv LEV na BMD v oblasti bederní páteře v závislosti na délce užívání tohoto léku. Jejich studie navrhuje, že LEV může mít negativní vliv na kostní denzitu v bederní oblasti při krátkodobém podávání, po dobu kratší než jeden rok. Při dlouhodobé léčbě nebyl pozorován žádný negativní vliv na kostní metabolismus. Vyhodnocení výsledků po jednoročním a více než pětiletém užívání LEV neprokázaly žádný statisticky významný rozdíl (Gozükızıl et al., 2022). Naše výsledky odpovídají dlouhodobému užívání LEV, protože jeden měsíc života potkana lze přirovnat k třem lidským rokům (Sengupta, 2013).

V obou skupinách ORX+LEV a SHAM+LEV bylo pozorováno významné zvýšení markerů kostní formace i markeru kostní resorpce, což svědčí o zrychleném kostním obratu, který neměl vliv na mechanickou odolnost kosti. Ohledně vlivu LEV na markery kostního obratu (BTM), jsou údaje nejednotné. Studie Koo et al. prezentuje, že po monoterapii LEV po dobu 1 roku nebyly pozorovány žádné rozdíly v biochemických parametrech (BALP, C-telopeptid, inzulinu podobný růstový faktor-1, vápník, fosfor, parathormon, osteokalcin, 25-hydroxyvitamin D) (Koo et al., 2013). Podobně ve studii Anwar et al. nebyly zjištěny žádné významné změny BTM u myších samic (Anwar et al., 2014). Další studie testovala, zda má substituce LEV menší nežádoucí účinky na kosti než starší generace AED (valproát, karbamazepin). U pacientů léčených starší generací AED došlo ke snížení sérových hladin CTX-I a PINP, u pacientů užívajících LEV došlo ke snížení sérových hladin CTX-I, což svědčí o snížené kostní resorpci (Hakami et al., 2016).

LEV je považován za hmotnostně neutrální AED (Gidal et al., 2003). Je obtížné vysvětlit významný absolutní a relativní pokles tukové tkáně, který jsme pozorovali u skupiny potkanů SHAM+LEV. Výsledek je překvapivý, literární údaje uvádějí významný pokles hladiny estradiolu po podání LEV (Svalheim et al., 2008; Cincioğlu-Palabiyik et al., 2017). Za očekávaný důsledek nedostatku estrogenů bychom měli očekávat přírůstek hmotnosti v důsledku akumulace tukové tkáně, který je pozorován u lidí i hlodavců (Kim et al., 2014). Nelze vyloučit, že námi zjištěné snížení tukové tkáně mohlo být způsobeno sníženým množstvím přijímané stravy u skupiny SHAM+LEV. Spotřeba krmiva mezi skupinami se významně nelišila, ale nemůžeme vyvrátit, že zbytky neúplně zkonsumovaných granulí v podestýlce nebyly vyšší u skupiny SHAM+LEV v porovnání se skupinou SHAM.

Dlouhodobé podávání LEV u modelu gonadálně intaktních potkanů a u potkanů po orchidektomii nemělo negativní vliv na BMD a mechanickou odolnost kostí. Významné zvýšení BMD může naznačovat dokonce pozitivní vliv na vlastnosti kostí.

9. Závěr

Cílem disertační práce bylo posouzení vlivu vybraných nových antiepileptik na kostní metabolismus u mladých potkanů kmene Wistar.

- 1) Posoudit vliv orchidektomie na kostní metabolismus u potkanů.

Zjistili jsme negativní vliv provedené orchidektomie potkanů na kostní tkáň po 12 týdnech. U orchidektomovaných potkanů bylo pozorováno statisticky významné snížení BMD v oblasti celého těla, bederních obratlů, pravého a levého femuru. Provedená orchidektomie měla vliv na mechanickou odolnost kostí.

Mladý potkan po provedené orchidektomii může být považován za vhodným zvířecí model pro studium osteopenie.

- 2) Posoudit vliv nových antiepileptik (zonisamidu, gabapentinu, pregabalínu a levetiracetamu) na kostní metabolismus u potkanů.

Zonisamid

Po 12 týdnech podávání ZNS orchidektomovaným potkanům a gonadálně intaktním potkanům nebyl potvrzen žádný negativní vliv na BMD, markery kostního metabolismu ani mechanickou odolnost kostní tkáně.

Dlouhodobé podávání ZNS lze považovat za méně rizikové z hlediska zdraví kostí.

Gabapentin

Po 12 týdnech podávání GBP potkanům po provedené orchidektomii byl zjištěn významný vzestup markeru kostního obratu RANKL. U gonadálně intaktních potkanů nebyly potvrzeny žádné významné změny kostních markerů. Nebyl zjištěn žádný statisticky významný vliv GBP na BMD ani mechanickou odolnost kostí u gonadálně intaktních potkanů, ani u orchidektomovaných potkanů.

Dlouhodobé podávání GBP lze považovat za méně rizikové z hlediska zdraví kostí.

Pregabalin

Po 12 týdnech podávání PGB potkanům po provedené orchidektomii byl zjištěn významný vzestup markeru kostního obratu RANKL. Bylo pozorováno statisticky významné zvýšení kostního markeru sklerostinu u gonadálně intaktních potkanů. Nebyl potvrzen žádný statisticky významný vliv PGB na BMD ani mechanickou odolnost kostí u gonadálně intaktních potkanů a u orchidektomovaných potkanů.

Dlouhodobé podávání PGB lze považovat za méně rizikové z hlediska zdraví kostí.

Levetiracetam

Po 12 týdnech podávání LEV potkanům po provedené orchidektomii byl zjištěn významný vzestup kostních markerů-BALP, CTX-I a RANKL. U gonadálně intaktních potkanů bylo po 12 týdnech užívání LEV naměřeno statisticky významné zvýšení kostních markerů BALP a CTX-I. Nebyl zjištěn vliv LEV na BMD a mechanickou odolnost kostí u modelu gonadálně intaktních potkanů ani u potkanů po orchidektomii. Významné zvýšení BMD celého těla v obou skupinách může naznačovat dokonce pozitivní vliv na vlastnosti kostí.

Dlouhodobé podávání LEV lze považovat za méně rizikové z hlediska zdraví kostí.

10. Seznam použité literatury

Akin B, Kelle B, Kozanoglu E. The Effect of Pregabalin on Bone Metabolism. *J Clin Densitom.* 2022 Apr-Jun;25(2):223-229. doi: 10.1016/j.jocd.2021.05.001. Epub 2021 May 12. PMID: 34120834.

Al-Bari AA, Al Mamun A. Current advances in regulation of bone homeostasis. *FASEB Bioadv.* 2020;2(11):668-679. Published 2020 Sep 19. doi:10.1096/fba.2020-00058

Anwar MJ, Radhakrishna KV, Vohora D. Phenytoin and sodium valproate but not levetiracetam induce bone alterations in female mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 2014;92(6):507-511. doi:10.1139/cjpp-2013-0504

Appelman-Dijkstra NM, Papapoulos SE. Modulating Bone Resorption and Bone Formation in Opposite Directions in the Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. *Drugs.* 2015;75(10):1049-1058. doi:10.1007/s40265-015-0417-7

Arora E, Singh H, Gupta YK. Impact of antiepileptic drugs on bone health: Need for monitoring, treatment, and prevention strategies. *J Family Med Prim Care.* 2016;5(2):248-253. doi:10.4103/2249-4863.192338

Artemiadis AK, Lambrinoudaki I, Voskou P, et al. Preliminary evidence for gender effects of levetiracetam monotherapy duration on bone health of patients with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2016;55:84-86. doi:10.1016/j.yebeh.2015.12.025

Aryal B, Tae-Hyun K, Yoon-Gyoon K, Hyung-Gun K. A comparative study of the pharmacokinetics of traditional and automated dosing/blood sampling systems using gabapentin. *Indian J Pharmacol.* 2011 May;43(3):262-9. doi: 10.4103/0253-7613.81512. PMID: 21713088; PMCID: PMC3113376.

Balogh E, Paragh G, Jeney V. Influence of Iron on Bone Homeostasis. *Pharmaceuticals.* 2018; 11(4):107.

Barnsley J, Buckland G, Chan PE, et al. Pathophysiology and treatment of osteoporosis: challenges for clinical practice in older people. *Aging Clin Exp Res.* 2021;33(4):759-773. doi:10.1007/s40520-021-01817-y

Beniczky SA, Viken J, Jensen LT, Andersen NB. Bone mineral density in adult patients treated with various antiepileptic drugs. *Seizure*. 2012;21(6):471-472. doi:10.1016/j.seizure.2012.04.002

Brady JJ, McGoldrick D, O'Callaghan K, et al. Bone alkaline phosphatase on the IDS-iSYS automated analyser; cross-reactivity with intestinal ALP. *Clin Chem Lab Med*. 2019;57(8):e186-e188. doi:10.1515/cclm-2018-0991

Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal*. 2011;23(4):609-620. doi:10.1016/j.cellsig.2010.10.003

Brandi ML. Microarchitecture, the key to bone quality. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48 Suppl 4:iv3-iv8. doi:10.1093/rheumatology/kep273

Buck DW 2nd, Dumanian GA. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(6):1314-1320. doi:10.1097/PRS.0b013e31824eca94

Cincioğlu-Palabiyik M, Üner M, Ertoy-Baydar D, Sara Y, Karahan H, Kelicen-Uğur P. Chronic levetiracetam decreases hippocampal and testicular aromatase expression in normal but not kainic acid-induced experimental model of acute seizures in rats. *Neuroreport*. 2017;28(14):903-909. doi:10.1097/WNR.0000000000000843

Compston JE, McClung MR, Leslie WD. Osteoporosis. *Lancet*. 2019;393(10169):364-376. doi:10.1016/S0140-6736(18)32112-3

Coppola G, Fortunato D, Auricchio G, et al. Bone mineral density in children, adolescents, and young adults with epilepsy. *Epilepsia*. 2009;50(9):2140-2146. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02082.x

Cowan PT, Kahai P. Anatomy, Bones. [Updated 2022 Jul 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan.

Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone*. 2017 Mar;96:29-37. doi: 10.1016/j.bone.2016.10.007. Epub 2016 Oct 12. PMID: 27742498; PMCID: PMC5328835.

Derry S, Bell RF, Straube S, Wiffen PJ, Aldington D, Moore RA. Pregabalin for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;1(1):CD007076. Published 2019 Jan 23. doi:10.1002/14651858.CD007076.pub3

Dobbs MB, Buckwalter J, Saltzman C. Osteoporosis: the increasing role of the orthopaedist. *Iowa Orthop J.* 1999;19:43-52.

Eastell R, Szulc P. Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5(11):908-923. doi:10.1016/S2213-8587(17)30184-5

Erbaş O, Oltulu F, Yılmaz M, Yavaşoğlu A, Taşkıran D. Neuroprotective effects of chronic administration of levetiracetam in a rat model of diabetic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016;114:106-116. doi:10.1016/j.diabres.2015.12.016

Feng J, Meng Z. Insulin growth factor-1 promotes the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through the Wnt/ β -catenin pathway. *Exp Ther Med.* 2021;22(2):891. doi:10.3892/etm.2021.10323

Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:121-145. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130203

Fernandez-Lopez L, Mancini R, Pellegrini M, Concetta Rotolo M, Luna A, Falcon M. Postmortem analysis of quetiapine and pregabalin in human bone. *Leg Med (Tokyo).* 2020;46:101717. doi:10.1016/j.legalmed.2020.101717

Gidal BE, Sheth RD, Magnus L, Herbeuval AF. Levetiracetam does not alter body weight: analysis of randomized, controlled clinical trials. *Epilepsy Res.* 2003;56(2-3):121-126. doi:10.1016/j.epilepsyres.2003.08.009

Gillett MJ, Vasikaran SD, Inderjeeth CA. The Role of PINP in Diagnosis and Management of Metabolic Bone Disease. *Clin Biochem Rev.* 2021;42(1):3-10. doi:10.33176/AACB-20-0001

Goel A, Sugumaran R, Narayan SK. Zonisamide in Parkinson's disease: a current update. *Neurol Sci.* 2021;42(10):4123-4129. doi:10.1007/s10072-021-05550-2

Gözükızıl ST, Aydın Z, Yalçın AD. Relationship between bone density and levetiracetam monotherapy in epilepsy patients. *Clin Neurol Neurosurg.* 2022;218:107270. doi:10.1016/j.clineuro.2022.107270

Grabowski P. Physiology of bone. *Endocr Dev.* 2009;16:32-48. doi:10.1159/000223687

Greenblatt HK, Greenblatt DJ. Gabapentin and Pregabalin for the Treatment of Anxiety Disorders. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2018;7(3):228-232. doi:10.1002/cpdd.446

Guo Y, Lin Z, Huang Y, Yu L. Effects of valproate, lamotrigine, and levetiracetam monotherapy on bone health in newly diagnosed adult patients with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2020;113:107489. doi:10.1016/j.yebeh.2020.107489

Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092:385-396. doi:10.1196/annals.1365.035

Hakami T, O'Brien TJ, Petty SJ, et al. Monotherapy with Levetiracetam Versus Older AEDs: A Randomized Comparative Trial of Effects on Bone Health. *Calcif Tissue Int.* 2016;98(6):556-565. doi:10.1007/s00223-016-0109-7

Hakami T, O'Brien TJ, Petty SJ, Sakellarides M, Christie J, Kantor S, Todaro M, Gorelik A, Seibel MJ, Yerra R, Wark JD. Monotherapy with Levetiracetam Versus Older AEDs: A Randomized Comparative Trial of Effects on Bone Health. *Calcif Tissue Int.* 2016 Jun;98(6):556-65. doi: 10.1007/s00223-016-0109-7. Epub 2016 Feb 3. PMID: 26842957.

Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. *Ann Clin Biochem.* 2014;51(Pt 2):189-202. doi:10.1177/0004563213515190

Chappard D, Baslé MF, Legrand E, Audran M. Trabecular bone microarchitecture: a review. *Morphologie.* 2008;92(299):162-170. doi:10.1016/j.morpho.2008.10.003

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004;22(4):233-241. doi:10.1080/08977190412331279890

Chen JF, Lin PW, Tsai YR, Yang YC, Kang HY. Androgens and Androgen Receptor Actions on Bone Health and Disease: From Androgen Deficiency to Androgen Therapy. *Cells.* 2019;8(11):1318. Published 2019 Oct 25. doi:10.3390/cells8111318

Chin KY, Ng BN, Rostam MKI, et al. A Mini Review on Osteoporosis: From Biology to Pharmacological Management of Bone Loss. *J Clin Med.* 2022;11(21):6434. Published 2022 Oct 30. doi:10.3390/jcm11216434

Jarvie D, Mahmoud SH. Therapeutic Drug Monitoring of Levetiracetam in Select Populations. *J Pharm Pharm Sci*. 2018;21(1s):149s-176s. doi:10.18433/jpps30081

Jongeling AC, Richins RJ, Bazil CW. Safety and tolerability of an oral zonisamide loading dose. *Seizure*. 2015;32:69-71. doi:10.1016/j.seizure.2015.09.012

Kanda J, Izumo N, Kobayashi Y, Onodera K, Shimakura T, Yamamoto N, Takahashi HE, Wakabayashi H. Effects of the Antiepileptic Drugs Phenytoin, Gabapentin, and Levetiracetam on Bone Strength, Bone Mass, and Bone Turnover in Rats. *Biol Pharm Bull*. 2017;40(11):1934-1940. doi: 10.1248/bpb.b17-00482. PMID: 29093341.

Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Melton LJ 3rd, Khaltsev N. A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone*. 2008;42(3):467-475. doi:10.1016/j.bone.2007.11.001

Katagiri T, Watabe T. Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(6):a021899. Published 2016 Jun 1. doi:10.1101/cshperspect.a021899

Kelly RR, Sidles SJ, LaRue AC. Effects of Neurological Disorders on Bone Health. *Front Psychol*. 2020;11:612366. Published 2020 Nov 30. doi:10.3389/fpsyg.2020.612366

Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem*. 2018;55(3):308-327. doi:10.1177/0004563218759371

Kim JH, Cho HT, Kim YJ. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. *Endocr J*. 2014;61(11):1055-1067. doi:10.1507/endocrj.ej14-0262

Kim JH, Liu X, Wang J, Chen X, Zhang H, Kim SH, Cui J, Li R, Zhang W, Kong Y, Zhang J, Shui W, Lamplot J, Rogers MR, Zhao C, Wang N, Rajan P, Tomal J, Statz J, Wu N, Luu HH, Haydon RC, He TC. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2013 Feb;5(1):13-31. doi: 10.1177/1759720X12466608. PMID: 23514963; PMCID: PMC3582304.

Ko A, Kong J, Samadov F, et al. Bone health in pediatric patients with neurological disorders. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2020;25(1):15-23. doi:10.6065/apem.2020.25.1.15

Koo DL, Joo EY, Kim D, Hong SB. Effects of levetiracetam as a monotherapy on bone mineral density and biochemical markers of bone metabolism in patients with epilepsy. *Epilepsy Res.* 2013;104(1-2):134-139. doi:10.1016/j.eplepsyres.2012.09.002

Koo DL, Nam H. Effects of zonisamide monotherapy on bone health in drug-naive epileptic patients. *Epilepsia.* 2020;61(10):2142-2149. doi:10.1111/epi.16678

Kuba R. Nová antiepileptika v klinické praxi. *Neurol. pro praxi*, 2006;1: 36–42.

Kwan SY, Chuang YC, Huang CW, Chen TC, Jou SB, Dash A. Zonisamide: Review of Recent Clinical Evidence for Treatment of Epilepsy. *CNS Neurosci Ther.* 2015;21(9):683-691. doi:10.1111/cns.12418

Lademann F, Hofbauer LC, Rauner M. The Bone Morphogenetic Protein Pathway: The Osteoclastic Perspective. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:586031. Published 2020 Oct 16. doi:10.3389/fcell.2020.586031

Langdahl B, Ferrari S, Dempster DW. Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2016;8(6):225-235. doi:10.1177/1759720X16670154

Leder, B. Z., & Wein, M. N. (Eds.). (2020). Osteoporosis. *Contemporary Endocrinology.* doi:10.1007/978-3-319-69287-6

Lee HJ, Son JM, Mun J, Kim DW. Safety and Efficacy of Zonisamide in Patients with Epilepsy: A Post-Marketing Surveillance Study. *J Epilepsy Res.* 2015;5(2):89-95. Published 2015 Dec 31. doi:10.14581/jer.15015

Lee JY, Yang JY, Kim SW. Bone Lining Cells Could Be Sources of Bone Marrow Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:766254. Published 2021 Dec 3. doi:10.3389/fendo.2021.766254

Lee SC, Hsiao JK, Yang YC, et al. Insulin-like growth factor-1 positively associated with bone formation markers and creatine kinase in adults with general physical activity. *J Clin Lab Anal.* 2021;35(8):e23799. doi:10.1002/jcla.23799

Lewiecki EM. Role of sclerostin in bone and cartilage and its potential as a therapeutic target in bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2014;6(2):48-57. doi:10.1177/1759720X13510479

Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Front Pharmacol.* 2020;11:757. Published 2020 May 26. doi:10.3389/fphar.2020.00757

Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Monnouchi S, Akamine A. Prospective potency of TGF- β 1 on maintenance and regeneration of periodontal tissue. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2013;304:283-367. doi:10.1016/B978-0-12-407696-9.00006-3

Mathieson S, Lin CC, Underwood M, Eldabe S. Pregabalin and gabapentin for pain. *BMJ.* 2020;369:m1315. Published 2020 Apr 28. doi:10.1136/bmj.m131

Moser SC, van der Eerden BCJ. Osteocalcin-A Versatile Bone-Derived Hormone. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;9:794. Published 2019 Jan 10. doi:10.3389/fendo.2018.00794

Nissen-Meyer LS, Svalheim S, Taubøll E, Gjerstad L, Reinholt FP, Jemtland R. How can antiepileptic drugs affect bone mass, structure and metabolism? Lessons from animal studies. *Seizure.* 2008;17(2):187-191. doi:10.1016/j.seizure.2007.11.024

Nissen-Meyer LS, Svalheim S, Taubøll E, Reppe S, Lekva T, Solberg LB, Melhus G, Reinholt FP, Gjerstad L, Jemtland R. Levetiracetam, phenytoin, and valproate act differently on rat bone mass, structure, and metabolism. *Epilepsia.* 2007 Oct;48(10):1850-60. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01176.x. Epub 2007 Jul 18. PMID: 17634065.

Noirrit-Esclassan E, Valera M-C, Tremollieres F, Arnal J-F, Lenfant F, Fontaine C, Vinel A. Critical Role of Estrogens on Bone Homeostasis in Both Male and Female: From Physiology to Medical Implications. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021; 22(4):1568. <https://doi.org/10.3390/ijms22041568>

Office of the Surgeon General (US). Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. Rockville (MD): Office of the Surgeon General (US); 2004.

Pack A. Bone health in people with epilepsy: is it impaired and what are the risk factors?. *Seizure.* 2008;17(2):181-186. doi:10.1016/j.seizure.2007.11.020

Pack AM. The Association Between Antiepileptic Drugs and Bone Disease. *Epilepsy Curr.* 2003;3(3):91-95. doi:10.1046/j.1535-7597.2003.03306.x

Peyrl A, Weichert N, Kühl JS, Ebell W, Hernáiz Driever P. Levetiracetam as a possible cause of secondary graft failure after allogenic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur J Paediatr Neurol.* 2015;19(1):75-77. doi:10.1016/j.ejpn.2014.10.004

Phabphal K, Geater A, Limapichat K, Sathirapanya P, Setthawatcharawanich S, Leelawattana R. Effect of switching hepatic enzyme-inducer antiepileptic drug to levetiracetam on bone mineral density, 25 hydroxyvitamin D, and parathyroid hormone in young adult patients with epilepsy. *Epilepsia.* 2013;54(6):e94-e98. doi:10.1111/epi.12162

Reimers A. New antiepileptic drugs and women. *Seizure.* 2014;23(8):585-591. doi:10.1016/j.seizure.2014.05.004

Richards JB, Zheng HF, Spector TD. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat Rev Genet.* 2012;13(8):576-588. Published 2012 Jul 18. doi:10.1038/nrg3228

Romigi A, Femia EA, Fattore C, Vitrani G, Di Gennaro G, Franco V. Zonisamide in the management of epilepsy in the elderly. *Clin Interv Aging.* 2015;10:931-937. Published 2015 Jun 8. doi:10.2147/CIA.S50819

Salari N, Ghasemi H, Mohammadi L, et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *J Orthop Surg Res.* 2021;16(1):609. Published 2021 Oct 17. doi:10.1186/s13018-021-02772-0

Salih DA, Mohan S, Kasukawa Y, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-5 induces a gender-related decrease in bone mineral density in transgenic mice. *Endocrinology.* 2005;146(2):931-940. doi:10.1210/en.2004-0816

Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013;4(6):624-630.

Shetty AK. Prospects of levetiracetam as a neuroprotective drug against status epilepticus, traumatic brain injury, and stroke. *Front Neurol.* 2013;4:172. Published 2013 Nov 4. doi:10.3389/fneur.2013.00172

Shetty S, Kapoor N, Bondu JD, Thomas N, Paul TV. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. *Indian J Endocrinol Metab.* 2016;20(6):846-852. doi:10.4103/2230-8210.192914

Shi C, Wu T, He Y, Zhang Y, Fu D. Recent advances in bone-targeted therapy. *Pharmacol Ther.* 2020;207:107473. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107473

Schulze-Bonhage A, Hamer H, Krämer G. Neue Klassifikation epileptischer Anfälle : Eine kritische Bewertung der Änderungen [New classification of epileptic seizures : A critical evaluation of the changes]. *Nervenarzt.* 2020 Feb;91(2):114-121. German. doi:10.1007/s00115-019-00800-3. PMID: 31506778.

Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(3):233-245. doi:10.1152/physiol.00061.2014

Simko J, Fekete S, Gradosova I, et al. The effect of topiramate and lamotrigine on rat bone mass, structure and metabolism. *J Neurol Sci.* 2014;340(1-2):80-85. doi:10.1016/j.jns.2014.02.032

Simko J., et al. Osteopatie u epileptiků. Olomouc: Solen, 2013, 29 s. ISBN 978-80-7471-034-6.

Siniscalchi A, Murphy S, Cione E, Piro L, Sarro G, Gallelli L. Antiepileptic Drugs and Bone Health: Current Concepts. *Psychopharmacol Bull.* 2020;50(2):36-44.

Sözen T, Özişik L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol.* 2017;4(1):46-56. doi:10.5152/eurjrheum.2016.048

Subbarao BS, Silverman A, Eapen BC. Seizure Medications. In: *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 11, 2022.*

Svalheim S, Taubøll E, Surdova K, et al. Long-term levetiracetam treatment affects reproductive endocrine function in female Wistar rats. *Seizure.* 2008;17(2):203-209. doi:10.1016/j.seizure.2007.11.018

Takahashi A, Onodera K, Kamei J, Sakurada S, Shinoda H, Miyazaki S, Saito T, Mayanagi H: Effects of chronic administration of zonisamide, an antiepileptic drug, on bone mineral density and their prevention with alfacalcidol in growing rats. *J Pharmacol Sci.* 2003;91(4):313-318.

Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet*. 2019 Feb 16;393(10172):689-701. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32596-0. Epub 2019 Jan 24. PMID: 30686584.

Tu KN, Lie JD, Wan CKV, et al. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. *P T*. 2018;43(2):92-104.

Ueland T. GH/IGF-I and bone resorption in vivo and in vitro. *Eur J Endocrinol*. 2005;152(3):327-332. doi:10.1530/eje.1.01874

Vanderschueren D, Vandendput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R. An aged rat model of partial androgen deficiency: prevention of both loss of bone and lean body mass by low-dose androgen replacement. *Endocrinology*. 2000;141(5):1642-1647. doi:10.1210/endo.141.5.7472

Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int*. 2011;22(2):391-420. doi:10.1007/s00198-010-1501-1

Vasikaran SD. Utility of biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in management of osteoporosis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2008;45(2):221-258. doi:10.1080/10408360801949442

Verrotti A, Coppola G, Parisi P, Mohn A, Chiarelli F. Bone and calcium metabolism and antiepileptic drugs. *Clin Neurol Neurosurg*. 2010;112(1):1-10. doi:10.1016/j.clineuro.2009.10.011

Wang JS, Mazur CM, Wein MN. Sclerostin and Osteocalcin: Candidate Bone-Produced Hormones. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Mar 10;12:584147. doi: 10.3389/fendo.2021.584147. PMID: 33776907; PMCID: PMC7988212.

Wang RN, Green J, Wang Z, et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis*. 2014;1(1):87-105. doi:10.1016/j.gendis.2014.07.005

Wang XF, Zhang YK, Yu ZS, Zhou JL. The role of the serum RANKL/OPG ratio in the healing of intertrochanteric fractures in elderly patients. *Mol Med Rep*. 2013;7(4):1169-1172. doi:10.3892/mmr.2013.1335

White WL. Erratum to: Why I hate the index finger. *Hand (N Y)*. 2011;6(2):233.
doi:10.1007/s11552-011-9321-0

Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002 Aug 15;27(16 Suppl 1):S2-8. doi: 10.1097/00007632-200208151-00002. PMID: 12205411.

Zhang J, Wang KX, Wei Y, et al. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2010;12(2):96-98.

11. Přílohy-publikace zahrnuté v disertační práci

11.1 Příloha č. 1

Pharmacology

Research Article

Pharmacology
DOI: 10.1159/000529970

Received: November 27, 2022
Accepted: February 27, 2023
Published online: May 22, 2023

The Effect of Zonisamide on Rat Bone Mass, Structure, and Metabolism

Iva Karesova^a Julius Simko^b Sona Fekete^a Eva Zimcikova^c Jana Malakova^a
Helena Zivna^d Ladislava Pavlikova^a Vladimir Palicka^a

^aInstitute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Charles University in Prague, Faculty of Medicine and University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic; ^bDepartment of Neurology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine and University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic; ^cDepartment of Social and Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Hradec Kralove, Czech Republic; ^dRadioisotope Laboratories and Vivarium, Faculty of Medicine, Hradec Kralove, Czech Republic

Keywords

Antiepileptic drugs · Zonisamide · Bone mineral density · Bone markers · Biomechanical properties

Abstract

Introduction: Our study aimed to investigate the effect of zonisamide (ZNS) on bone metabolism in the rat model. **Methods:** Eight-week-old rats were divided into four groups. The sham-operated control group (SHAM) and the control group after orchidectomy (ORX) received the standard laboratory diet (SLD). The experimental group after orchidectomy (ORX+ZNS) and the sham-operated control group (SHAM+ZNS) received SLD enriched with ZNS for 12 weeks. Bone marker concentrations in serum of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, PINP, and osteoprotegerin, and the levels of sclerostin and bone alkaline phosphatase in bone homogenate, were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay. Bone mineral density (BMD) was measured by dual-energy X-ray absorptiometry. The femurs were used for biomechanical testing. **Results:** We found a statistically significant reduction in BMD and biomechanical strength 12 weeks after orchidectomy of the rats (ORX). After ZNS administration to

orchidectomized rats (ORX+ZNS) and the sham-operated control rats (SHAM+ZNS), there were no statistically significant changes in BMD, bone turnover markers, or biomechanical properties as compared with the ORX group and SHAM group. **Conclusions:** The results suggest that administration of ZNS to rats exerts no negative effect on BMD, bone metabolism markers, or biomechanical properties.

© 2023 S. Karger AG, Basel

Introduction

Epilepsy is the second most common chronic neurological disorder characterized by 2 or 3 recurrent seizures of cerebral origin [1]. Epilepsy affects between 5 and 10 individuals per 1,000 population in developed countries, which is probably an underestimate due to the limited professional and diagnostic resources [2, 3]. Antiepileptic drugs (AEDs) are the cornerstone of epilepsy treatment, and this treatment is frequently lifelong [4]. However, AEDs are prescribed as first-line treatment also for a variety of non-epileptic conditions as well, in particular bipolar spectrum disorders and chronic pain states [5].

karger@karger.com
www.karger.com/pha

© 2023 S. Karger AG, Basel

Correspondence to:
Iva Karesova, iva.karesova1@gmail.com

Karger

Downloaded from <http://karger.com/pha/article-pdf/doi/10.1159/000529970/3888889/000529970.pdf> by Charles University user on 15 June 2023

Treatment using most AEDs negatively influences bone health, which can increase the risk of fracture [6]. It is estimated that patients with epilepsy have a 2–3 times greater risk of bone fractures compared with the general population [7]. The adverse effects of AEDs on bone health were first reported nearly five decades ago, and, since then, a growing body of literature indicates that patients taking AEDs are at increased risk for low bone mineral density (BMD) and metabolic bone disease, including changes in bone turnover, osteoporosis, alterations in bone quality, and most importantly, fracture [7, 8]. Traditional AEDs, including phenobarbital, primidone, phenytoin (PHT), and carbamazepine, induce the hepatic cytochrome P450 (CYP450) enzyme system. The most plausible mechanism is that the activation of these hepatic enzyme inducers increases hepatic catabolism of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD), which leads to decreased absorption of calcium and hypersecretion of parathyroid hormone, with an increase in bone resorption and reduction of BMD. Another mechanism for bone-mineralization defects may be directly linked to the harmful effect on bone density of some AEDs, regardless of the effects of AEDs on hepatic function and 25-OHD [6, 9]. Some studies suggest that also valproate, a CYP450 inhibitor, is associated with reduced BMD and bone loss [10]. It is still unclear whether the “newer generation” AEDs that have been introduced into practice over the last two decades, including gabapentin, lamotrigine, topiramate (TPM), tiagabine, oxcarbazepine, levetiracetam, and zonisamide (ZNS), adversely affect bone health [11].

ZNS is a benzisoxazole derivative with a unique chemical structure and is one of the new generations of AEDs [12]. The mechanism of the effect of ZNS is unclear. ZNS has a broad spectrum of action mechanisms including inhibition of sodium channels, reduction of T-type calcium channels, reduction in glutamate-mediated synaptic excitation, and enhanced inhibitory effects mediated by gamma-aminobutyric acid [13]. ZNS also weakly alters acetylcholine, dopamine, and serotonin metabolism and inhibits carbonic anhydrase activity, although it is uncertain whether these actions contribute to its clinical efficacy [12]. ZNS has been approved in Europe as monotherapy for the treatment of partial seizures in adults with newly-diagnosed epilepsy, and this agent is also approved in Europe and the USA as adjunctive therapy for focal seizures with or without secondary generalization [14].

To our knowledge, there have been only few studies, which reported changes in BMD after administration of ZNS. The first study reported a decrease in BMD at the

tibial metaphysis and diaphysis after administration of ZNS in growing rats [15], and the second study showed results after 13 months of ZNS treatment in drug-naive epileptic patients [6].

The purpose of our study was to investigate the impact of ZNS on BMD, bone metabolism markers, and bone biomechanical properties in rats that were fed on a ZNS-enriched diet for 12 weeks. We also used the orchidectomized rat model (the model for androgen-deficient osteoporosis), in which a higher sensitivity can be expected for the detection of a possible risk of xenobiotics for bone health.

Methods and Evaluation of Bone Quality

Animal Models

All animals received humane care in accordance with the guidelines set by the Institutional Animal Use and Care Committee of Charles University, Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Czech Republic. The protocol of the experiment was approved by the same committee. The experiment used eight-week-old male albino Wistar rats (BioTest s.r.o., Konarovice, Czech Republic). The animals were housed in groups of 4 in plastic cages. During the experimental period, the animals were maintained in controlled conventional conditions (12 h light and 12 h dark, temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$, air humidity 30–70%). Tap water and standard laboratory diet (SLD, VELAS, a.s., Lysa nad Labem, Czech Republic) or SLD enriched with ZNS were given ad libitum. Drinking water was available ad libitum. The weights of the rats were monitored once a week.

Experiment Design

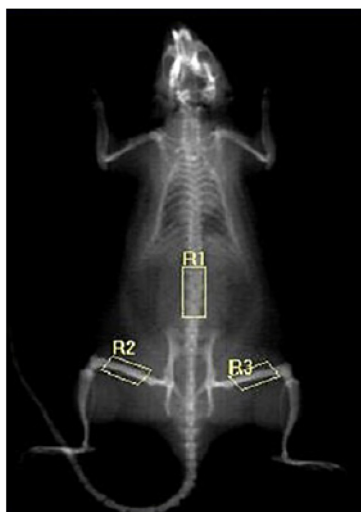
The rats were divided into four groups of 8 animals.

- 1st group: sham-operated control fed with SLD (SHAM).
- 2nd group: orchidectomized control fed with SLD (ORX).
- 3rd group: sham-operated rat fed with SLD enriched with ZNS (19 mg/25 g of the diet; ZNS, Eisai Ltd.) (SHAM+ZNS).
- 4th group: orchidectomized rat fed with SLD enriched with ZNS (19 mg/25 g of the diet; ZNS, Eisai Ltd.) (ORX+ZNS).

At the beginning of the experiment, 16 rats (ORX and ORX+ZNS) underwent bilateral orchidectomy under ether anesthesia. SHAM underwent only scrotal incision. On the second day after operation, ORX+ZNS and SHAM+ZNS began to receive SLD enriched with ZNS, while ORX and SHAM received only SLD, both diets ad libitum. After 12 weeks, the animals were sacrificed by blood withdrawal from the abdominal aorta under ether anesthesia, and the obtained serum was aliquoted and stored at -80°C for ensuing biochemical analyses. After sacrifice of the rats, both femurs were dissected free of soft tissue, wrapped in gauze moistened with saline, and frozen to -80°C till required for analysis.

Analysis of Bone Homogenates and Serum

Blood serum levels of ZNS were also determined at the end of the experiment. Concentrations of ZNS in the samples were determined using a modified method of high-performance liquid



Color version available online

Fig. 1. Evaluation of BMD in three areas of the rat skeleton. R1 – lumbar column (L3-L5); R2 – left femur; R3 – right femur.

chromatography-tandem mass spectrometry. Sample preparation included protein precipitation and the addition of internal standard deuterated pregabalin-D₆. The analyte was separated on column Discovery HS F5 (100 mm × 2.1 mm I.D., 5 μm particle size, Supelco, PA, USA) and detected on Agilent 6490 triple quadrupole LC/MS system, operating in positive mode at transition 213 > 132 for ZNS.

Bone homogenate was prepared from the femur. After animal sacrifice, both femurs were carefully excised; after removal of all the surrounding skin, muscle, and other soft tissue, they were stored at –80°C until required. The diaphysis part of the femur (0.1 g) was disrupted and homogenized by TissueLyser II (Qiagen, Netherlands). The homogenization consisted of the following steps. Liquid nitrogen was poured into the grinding jar over the ball and femur sample, and 0.5 mL of phosphate buffer was added (PBS, PENTA Prague, Czech Republic). The femur tissue was ground at 30 Hz for 1 min. After this procedure, a further 1.5 mL of phosphate buffer was added and ground at 10 Hz for 15 s. The raw tissue homogenate was centrifuged at 10,000 g at 4°C for 10 min, and the resulting supernatant was collected and stored at –80°C.

Levels of the markers sclerostin (SOST) and bone alkaline phosphatase (BALP) were determined in bone homogenate using the ELISA method. The level of SOST was determined using kits from the firm Cloud-Clone Corp., 23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA (SOST, pg/mL), and the level of BALP was determined using a kit from the firm BlueGene Biotech, Shanghai, China (BALP, ng/mL). Bone turnover markers (BTMs) were analyzed from serum using the ELISA method: amino-terminal propeptide of procollagen type I (PINP), receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL), and osteoprotegerin (OPG). We used kits from the firm Cloud-Clone Corp.,

23603 W. Fernhurst Dr., Unit 2201, Katy, TX 77494, USA (PINP, ng/mL; RANKL, pg/mL; OPG, pg/mL).

Dual Energy X-Ray Absorptiometry Analysis

The rat BMD (g/cm²) was measured by means of dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) on a Hologic Delphi A device (Hologic, MA, USA) at the Osteocentre of the Faculty Hospital Hradec Kralove, Czech Republic. Before measurements, a tissue calibration scan was performed with the Hologic phantom for the small animal. BMD of the whole body, in the lumbar vertebrae, and in both femurs (Fig. 1), and the total lean and fat masses were evaluated by computer using the appropriate software program for small animals (DEXA; QDR-4500A Elite; Hologic, Waltham, MA, USA). All animals were scanned by the same operator.

Biomechanical Testing Procedure

Mechanical testing of the rat femoral shaft and femoral neck was done with a special electromechanical custom-made testing machine (Martin Kosek and Pavel Trnecka, Hradec Kralove, Czech Republic) according to our methods described in a previous report [16]. For the three-point bending test, the femur or tibia was placed on a holding device with the two support points 18 mm apart. A small stabilizing preload of 10 N was used to fix the bone between the contacts. A constant deformation rate of 6 mm/min was generated until maximal load failure, and the breaking strength (maximum load, N) was recorded. When the bone was broken, the thickness of the cortical part of the bone was measured by means of a sliding micrometer (OXFORD 0–25 mm 30DEG POINTED MICROMETER, Victoria Works, Leicester, Great Britain). The proximal part of the femur was used for the compression test of the femoral neck. The diaphysis of the bone was embedded into a container using a methacrylate resin, and a vertical load was applied to the top of the femoral head. A small stabilizing preload to 10 N was applied and increased at a constant speed of 6 mm/min until failure of the femoral neck. The breaking strength (maximum load, N) was recorded by the measuring unit (Digitalanzeiger 9180, Burster präzisionsmesstechnik gmbh and co kg, Gernsbach, Germany). All bones were analyzed by the same operator.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the program NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, UT, USA). The results of all measurements made after 12 weeks of the experiment are presented as the mean and standard deviation. Comparison of the parameters under study employed an analysis of variance with post hoc multiple comparison by Fisher's LSD test and Kruskal-Wallis non-parametrical analysis of variance with post hoc multiple comparison by Dunn's test (with Bonferroni's modifications). Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Body Weight and Composition and Tissue Weights

The weights of the ORX group, the ORX+ZNS group, and the SHAM+ZNS group were decreased, but

Table 1. Weight, fat mass, and serum ZNS concentration at the end of the experiment

Parameter	SHAM	ORX	ORX+ZNS	SHAM+ZNS
Final body weight, g	475±53.56	436±40.20	440±36.32	453±40.85
Fat, g	56.54±14.61	63.28±10.87	56.08±11.47	45.83±9.50
Fat, %	14.76±3.36	17.36±2.82	15.36±3.63	12.51±2.56
Lean body mass, g	325.81±38.93	301.63±23.62	312.59±34.18	321.94±33.52
Serum drug concentration, mg/L	–	–	24.00±3.17	25.13±1.82

Data are expressed as mean/standard deviation.

statistically insignificantly versus the SHAM group. After 12 weeks of ZNS administration, there was no significant increase in weight of the ORX+ZNS group in comparison with the ORX group. There was no significant decrease in weight of the SHAM+ZNS group versus the SHAM group. DXA revealed that the ORX+ZNS group showed insignificantly increased lean body mass (g) and decreased fat mass (%) versus the ORX group. In the SHAM+ZNS group, there was no significant decrease in lean body mass (g) or in fat mass (%) versus the SHAM group. The concentration of ZNS corresponded to the human therapeutic level of the drug (10–40 mg/L) (Table 1).

Level of Bone Markers

Levels of bone markers from specimens of the femur and in serum were measured to assess the effects of orchidectomy and treatment with ZNS on bone turnover. There were no statistically significant changes in levels of bone markers between the ORX group versus the SHAM group, the ORX group versus the ORX+ZNS group, or the SHAM+ZNS group versus the SHAM group. ZNS administration for 12 weeks caused no statistically significant changes in SOST, BALP, RANKL, PINP, or OPG (Table 2).

Dual Energy X-Ray Absorptiometry

BMD was determined by dual-energy X-ray absorptiometry after 12 weeks of ZNS administration. In the ORX group, a statistically significant decrease in the BMD of the whole body was demonstrated and also in the area of both femurs and the lumbar vertebrae versus the SHAM group. In the ORX+ZNS group, no statistically significant difference was observed in the BMD in the areas of the whole body, lumbar vertebrae, or either femur versus the ORX group. In the SHAM+ZNS group, no statistically significant difference was observed in BMD in the areas of the whole body, lumbar vertebrae, or either femur versus the SHAM group (Table 3; Fig. 2).

Biomechanical Properties

After orchidectomy of the rats, we found a significant reduction in biomechanical strength in the ORX group versus the SHAM group. After ZNS administration for 12 weeks, there was no statistically significant difference in biomechanical parameters between the ORX+ZNS group versus the ORX group, nor between the SHAM+ZNS group and the SHAM group (Table 4; Fig. 3).

Discussion

Decreased BMD, the most significant predictor of fracture risk, has been observed in patients using “older generation” AEDs, particularly inducers of cytochrome p450 (CYP450) enzymes such as carbamazepine, PHT, phenobarbital, and primidone [11]. Patients treated with the newer non-enzyme-inducing AEDs are less likely to have a diagnosis of osteoporosis [17]. Most of the studies on AEDs have been cross-sectional. There are only a few longitudinal studies with newer AEDs and their effect on bone. Data for ZNS are scarce. Monitoring of bone quality is problematic in humans since the results of studies may be affected by physical activity, diet, seizure frequency, differences in baseline BMD amongst subjects, and past intake of other AEDs. By contrast, the animal model provides a system which is isolated from disease, lifestyle, drugs, and other confounding factors.

In this longitudinal study, orchidectomy of rats led to significant reduction in BMD and biomechanical strength. These results confirm the findings from previous studies in rats that deficiency of androgens negatively affects body composition and establishes these animals as suitable models for investigating androgenic modulation of body composition [18]. These changes were not demonstrated in the ORX+ZNS group compared with the ORX group or in the SHAM+ZNS group versus the SHAM group. Evidence

Table 2. Levels of bone markers

Parameter	SHAM	ORX	ORX+ZNS	SHAM+ZNS
SOST, pg/mL	348.65±136.68	685±351.82	649.20±184.58	517.44±347.67
BALP, ng/mL	2.72±0.78	2.97±1.43	3.20±0.39	2.75±0.35
RANKL, pg/mL	230.97±165.52	169.76±115.69	325.23±206.76	387.64±168.48
PINP, ng/mL	65.92±25.99	93.65±40.99	91.48±43.79	50.93±27.42
OPG, pg/mL	566.29±210.50	495.60±140.92	403.03±86.77	441.06±46.81

Data are expressed as mean/standard deviation.

Table 3. Comparison of values from DXA analysis

Parameter	SHAM	ORX	ORX+ZNS	SHAM+ZNS
Whole body BMD, g/cm ²	0.169±0.012	0.153±0.007*	0.153±0.006	0.169±0.012
Diaphysis right femur BMD, g/cm ²	0.174±0.013	0.155±0.007*	0.158±0.008	0.171±0.013
Diaphysis left femur BMD, g/cm ²	0.176±0.015	0.161±0.007*	0.161±0.010	0.176±0.011
Lumbar column (L3-L5) BMD, g/cm ²	0.205±0.017	0.176±0.012*	0.177±0.007	0.201±0.012

Data are expressed as mean/standard deviation. **p* < 0.05 against SHAM.

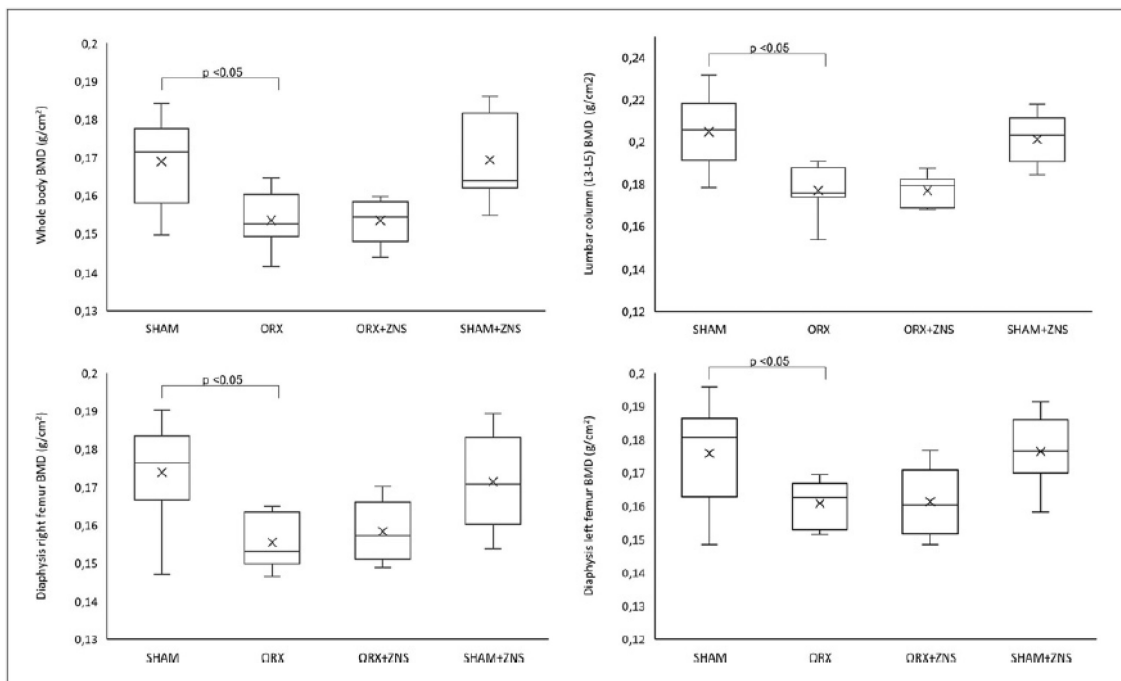
**Fig. 2.** Comparison of values from DXA analysis. Data are expressed as box plots: median (25th, 75th percentiles) and mean.

Table 4. Biomechanical and geometric parameters of rat right and left femurs

Parameter	SHAM	ORX	ORX+ZNS	SHAM+ZNS
LF length, mm	36.82±1.48	35.72±0.76	35.91±1.49	36.43±0.71
RF length, mm	36.55±0.61	35.40±0.71*	35.41±1.44	36.10±0.75
LF diameter, mm	3.60±0.14	3.25±0.14*	3.20±0.18	3.48±0.21
RF diameter, mm	3.51±0.13	3.19±0.18	3.22±0.22	3.35±0.24
Cortical LF thickness, mm	0.68±0.05	0.64±0.06	0.59±0.04	0.68±0.04
Cortical RF thickness, mm	0.67±0.06	0.63±0.04	0.59±0.04	0.625±0.03
Maximal load of the left femoral shaft, N	202.38±24.96	161.38±13.52*	170.75±19.22	190.75±22.71
Maximal load of the right femoral shaft, N	219.75±21.23	186.75±18.23*	186.00±15.35	208.5±19.81
Maximal load of the left femoral neck, N	149.86±28.26	147.29±19.58	132.25±23.45	134.13±24.17
Maximal load of the right femoral neck, N	146.88±35.49	149.88±22.73	152.38±22.12	151.63±24.12

Data are expressed as mean/standard deviation. * $p < 0.05$ against SHAM.

relating to the effect of ZNS on BMD and bone metabolism is limited.

So far, there are only few and conflicting data reported in the literature on this topic [6, 15]. In a previous study, subcutaneous administration of ZNS at a dose of 80 mg/kg per day for 5 weeks significantly decreased BMD at the tibial metaphysis and the diaphysis in the rat model. The results suggest that ZNS may cause bone loss in the animal model [15]. Contrary to the previous results, in our study there was no negative effect of ZNS on BMD. At the end of the present experiment, the level of ZNS in the ORX+ZNS group was 24.00 mg/L and in the SHAM+ZNS group was 25.13 mg/L, which is equivalent to therapeutic levels of the drug (10–40 mg/L). There is limited validity in comparing results between the two studies because we don't know the serum concentration of ZNS in the different studies. In the literature, AEDs have been described as having a biphasic effect on bone in a dose-dependent manner. Reduced biomechanical strength of trabecular bone and reduced levels of serum osteocalcin, a marker of bone formation, were observed after low dose levetiracetam (concentration $122 \pm 41 \mu\text{mol/L}$), but not by high dose levetiracetam (concentration $277 \pm 65 \mu\text{mol/L}$) [19]. Also known is a dose-dependent effect of PHT. While therapeutic doses of PHT are associated with accelerated loss of BMD, low doses of this drug have an osteogenic effect [20]. Therefore, it cannot be excluded that also ZNS can affect the bone in a dose-dependent manner. In the present study, these results are consistent with the human study by Koo et al. [6]. They investigated the effects of ZNS on BMD and biomarkers of bone metabolism after 13 months of treatment in drug-naive epileptic patients. ZNS monotherapy has no definite harmful effects on bone health [6]. We also examined the impact of ZNS on bone mechanical characteristics. After orchidectomy of the rats, we found a significant reduction in

biomechanical strength in the ORX group (the model for androgen-deficient osteoporosis) versus the SHAM group. We observed that after 12 weeks of ZNS administration, there was no statistically significant difference in biomechanical and geometric parameters between the ORX+ZNS group and the ORX group, or between the SHAM+ZNS group and the SHAM group. The results of this study suggest that ZNS does not negatively influence bone strength. The study by Koo et al. [6] also presents that ZNS monotherapy does not negatively influence bone metabolism or bone strength.

The mechanism of the effect of ZNS on bones is still unclear. ZNS is weakly carbonic anhydrase inhibitor, resulting in renal acidosis there may be secondary abnormalities on bone [21]. Acidosis affects osteoclast formation by enhancing cell adhesion and migration and stimulates osteoclast function [22]. TPM as well as ZNS is a carbonic anhydrase inhibitor [21]. In our previous study, in the setting of gonadal insufficiency, we demonstrated that TPM monotherapy over 12 weeks had a negative effect on whole body and femur BMD and bone mineral content, and reduced the mechanical strength of bone [23]. There are also other findings, which support the risk of TPM for bone tissue, namely, abnormal BMD after therapy [24, 25]. One possible explanation for these effects is the fact that this molecule inhibits carbonic anhydrase, which can promote metabolic acidosis and, consequently, lead to a decrease in mineral content of bones. However, one cannot exclude other mechanisms of action or a potential direct effect of the drug in bone cells, though there are no reports about this issue [26].

In a previous study by Takahashi et al. [15], chronic treatment with ZNS significantly increased the serum level of pyridinoline, a marker of bone resorption, while the serum level of osteocalcin, a marker of bone formation, was

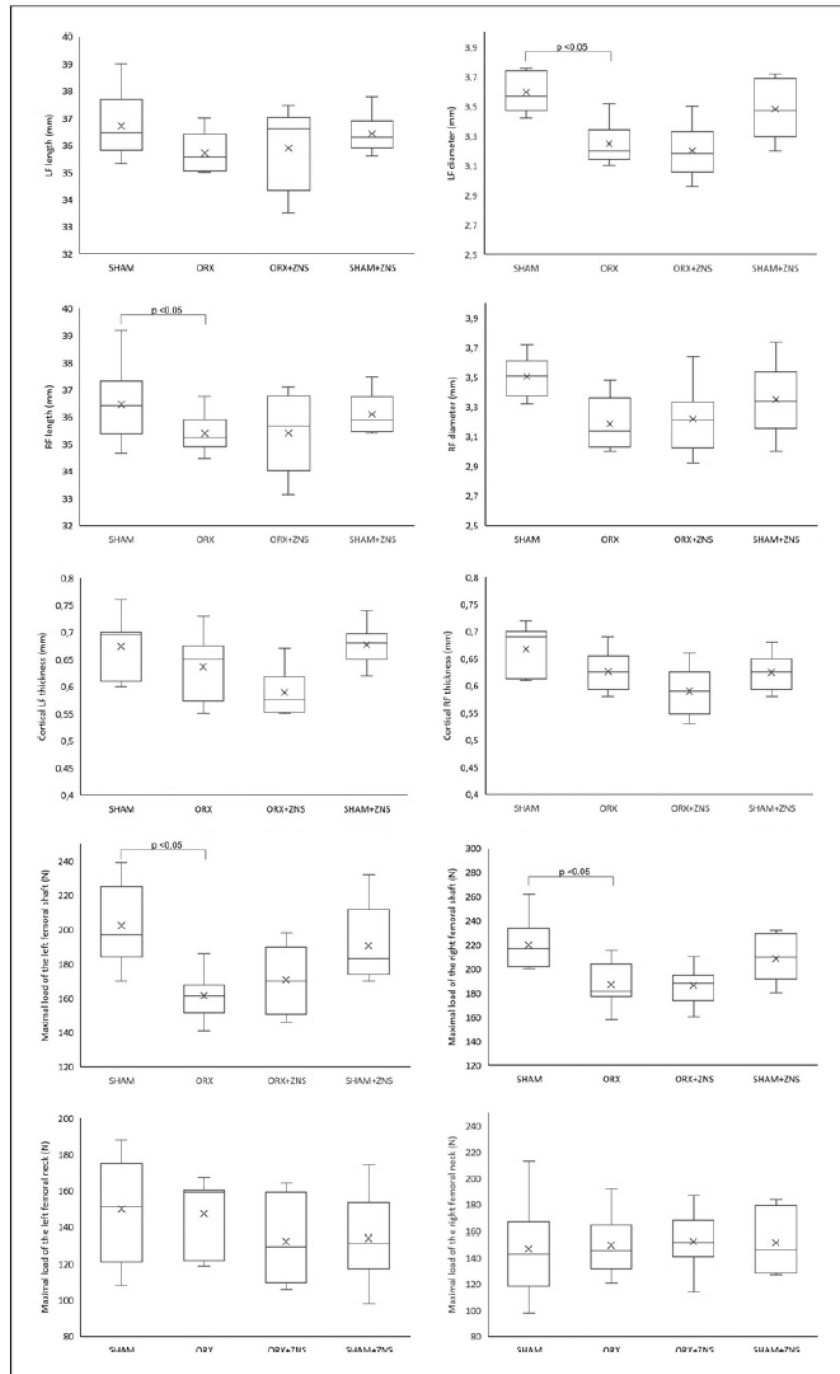


Fig. 3. Biomechanical and geometric parameters of rat right and left femurs. Data are expressed as box plots: median (25th, 75th percentiles) and mean.

not affected. The findings suggest that ZNS may cause bone loss in rats' model by accelerating bone resorption rather than inhibiting bone formation. However, in another human study, bone formation markers (bone-specific ALP and osteocalcin) and bone resorption marker (C-telopeptide) were not significantly changed after 13 months of ZNS treatment [6]. We determined several bone formation and bone resorption markers in this study. The OPG, as a soluble receptor, binds to the RANKL. RANKL is produced by osteoblastic lineage cells and promotes osteoclast activation, leading to enhanced bone resorption and bone loss [27]. OPG is secreted by osteoblastic cells and prevents the interaction of RANKL with its receptor RANK and subsequent stimulation of osteoclast development [27]. BALP is localized in the membranes of osteoblasts, from which it is realized into the serum during their activation [28]. The concentration of BALP reflects the cellular activity of osteoblasts. SOST is produced by osteocytes and inhibits osteoblast differentiation and bone formation via the Wnt signaling pathway [29]. Wnt signaling is crucial to both bone development and the regulation of bone mass. Wnt signaling in bone leads to osteoblast differentiation, proliferation, function, and survival, and hence to increased bone mass [30]. PINP is synthesized by osteoblasts in the form of pre-procollagen. The serum concentration of PINP reflects changes in the synthesis of new collagen, both by osteoblasts in bone and by fibroblasts in other connective tissues [31].

Our data suggest that chronic treatment of gonadally intact rats and the orchidectomized rats with ZNS for 12 weeks have negative statistically significant effect on bone formation markers and bone resorption markers. BTMs may be useful in clinical trials and frequently provide valuable information on the efficacy of osteoporosis treatments. BTMs do not control skeletal metabolism and are not disease specific; they reflect the entire skeleton regardless of the underlying cause. The use of BTMs to select risk of fractures is not routinely recommended, partly due to their large degree of biological variability. Currently, as the gold standard for estimation of BMD, the WHO recommends the DEXA scan [32].

In conclusion, the experimental results from this study suggest that the long-term administration of ZNS in either orchidectomized rats or gonadally intact rats exerts no negative effect on BMD, bone metabolism markers, or biomechanical properties. There are several limitations that should be considered in evaluating the present study. First, the sample size was small; although statistical significance is evident, the capacity to identify a small effect is limited. Second,

behavioral activity was neither controlled nor assessed. Further studies in animals and humans will be needed to confirm these findings.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dagmar Jezkova and Katerina Sildbergerova for their skillful technical assistance during the whole experiment and Eva Cermakova, MA, and Dr. Jan Kremlacek for statistical analysis. The authors are grateful to Ian McColl, MD, PhD, for assistance with the manuscript.

Statement of Ethics

All animals received humane care in accordance with the guidelines set by the Institutional Animal Use and Care Committee of Charles University, Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Czech Republic. The protocol of the experiment was reviewed and approved by the Institutional Animal Use and Care Committee of Charles University, Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Czech Republic, approval number MSMT-16823.

Conflict of Interest Statement

The authors report that there are no conflicts of interest in this work.

Funding Sources

This study was supported by the grants Cooperatio DIAG, SVV 260544, and MH CZ 00179906.

Author Contributions

Iva Karesova, Julius Simko, Sona Fekete, Helena Zivna, Ladislava Pavlikova, and Vladimir Palicka substantially contributed to the conception and design of the work. Iva Karesova, Julius Simko, Sona Fekete, Eva Zimcikova, and Jana Malakova contributed to methodology. Iva Karesova, Sona Fekete, and Jana Malakova contributed to formal analysis. Iva Karesova wrote the original draft of the manuscript, and Julius Simko reviewed/edited the final manuscript. Ladislava Pavlikova and Vladimir Palicka contributed to supervision. All authors read and approved the final manuscript.

Data Availability Statement

All data generated or analyzed during this study are included in this article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

References

- Suresh SH, Chakraborty A, Virupakshiah A, Kumar N. Efficacy and safety of levetiracetam and carbamazepine as monotherapy in partial seizures. *Epilepsy Res Treat*. 2015;2015:415082.
- Shen C, Chen F, Zhang Y, Guo Y, Ding M. Association between use of antiepileptic drugs and fracture risk: a systematic review and meta-analysis. *Bone*. 2014;64:246–53.
- Nakken KO, Taubøll E. Bone loss associated with use of antiepileptic drugs. *Expert Opin Drug Saf*. 2010;9(4):561–71.
- Miziak B, Błaszczyk B, Chrościńska-Krawczyk M, Danilkiewicz G, Jagiełło-Wójtowicz E, Czuczwar SJ. The problem of osteoporosis in epileptic patients taking antiepileptic drugs. *Expert Opin Drug Saf*. 2014;13(7):935–46.
- Reimers A. New antiepileptic drugs and women. *Seizure*. 2014;23(8):585–91.
- Koo DL, Nam H. Effects of zonisamide monotherapy on bone health in drug-naïve epileptic patients. *Epilepsia*. 2020;61(10):2142–9.
- Guo Y, Lin Z, Huang Y, Yu L. Effects of valproate, lamotrigine, and levetiracetam monotherapy on bone health in newly diagnosed adult patients with epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2020;113:107489.
- Verrotti A, Coppola G, Parisi P, Mohn A, Chiarelli F. Bone and calcium metabolism and antiepileptic drugs. *Clin Neurol Neurosurg*. 2010;112(1):1–10.
- Siniscalchi A, Murphy S, Cione E, Piro L, Sarro GD, Gallelli L. Antiepileptic drugs and bone health: current concepts. *Psychopharmacol Bull*. 2020;50(2):36–44.
- Gözükızıl ST, Aydın Z, Yalçın AD. Relationship between bone density and levetiracetam monotherapy in epilepsy patients. *Clin Neurol Neurosurg*. 2022;218:107270.
- Hakami T, O'Brien TJ, Petty SJ, Sakellarides M, Christie J, Kantor S, et al. Monotherapy with levetiracetam versus older AEDs: a randomized comparative trial of effects on bone health. *Calcif Tissue Int*. 2016;98(6):556–65.
- Kwan SY, Chuang YC, Huang CW, Chen TC, Jou SB, Dash A. Zonisamide: review of recent clinical evidence for treatment of epilepsy. *CNS Neurosci Ther*. 2015;21(9):683–91.
- Lee HJ, Son JM, Mun J, Kim DW. Safety and efficacy of zonisamide in patients with epilepsy: a post-marketing surveillance study. *J Epilepsy Res*. 2015;5(2):89–95.
- Romigi A, Femia EA, Fattore C, Vitrani G, Di Gennaro G, Franco V. Zonisamide in the management of epilepsy in the elderly. *Clin Interv Aging*. 2015;10:931–7.
- Takahashi A, Onodera K, Kamei J, Sakurada S, Shinoda H, Miyazaki S, et al. Effects of chronic administration of zonisamide, an antiepileptic drug, on bone mineral density and their prevention with alfacalcidol in growing rats. *J Pharmacol Sci*. 2003;91(4):313–8.
- Gradosova I, Zivna H, Palicka V, Hubena S, Svejkskova K, Zivny P. Protective effect of atorvastatin on bone tissue in orchidectomized male albino Wistar rats. *Eur J Pharmacol*. 2012;679(1–3):144–50.
- Phabphal K, Geater A, Limapichat K, Sathirapanya P, Sethawatcharawanich S, Leelawattana R. Effect of switching hepatic enzyme-inducer antiepileptic drug to levetiracetam on bone mineral density, 25 hydroxyvitamin D, and parathyroid hormone in young adult patients with epilepsy. *Epilepsia*. 2013;54(6):e94–8.
- Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R. An aged rat model of partial androgen deficiency: prevention of both loss of bone and lean body mass by low-dose androgen replacement. *Endocrinology*. 2000;141(5):1642–7.
- Nissen-Meyer LSH, Svalheim S, Taubøll E, Gjerstad L, Reinholdt FP, Jemtland R. How can antiepileptic drugs affect bone mass, structure and metabolism? Lessons from animal studies. *Seizure*. 2008;17(2):187–91.
- Ohta T, Wergedal JE, Matsuyama T, Baylink DJ, Lau KH. Phenytoin and fluoride act in concert to stimulate bone formation and to increase bone volume in adult male rats. *Calcif Tissue Int*. 1995;56(5):390–7.
- Pack A. Bone health in people with epilepsy: is it impaired and what are the risk factors? *Seizure*. 2008;17(2):181–6.
- Ahn H, Kim JM, Lee K, Kim H, Jeong D. Extracellular acidosis accelerates bone resorption by enhancing osteoclast survival, adhesion, and migration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418(1):144–8.
- Simko J, Fekete S, Gradosova I, Malakova J, Zivna H, Valis M, et al. The effect of topiramate and lamotrigine on rat bone mass, structure and metabolism. *J Neurol Sci*. 2014;340(1–2):80–5.
- Zhang J, Wang KX, Wei Y, Xu MH, Su JM, Bao YG, et al. Effect of topiramate and carbamazepine on bone metabolism in children with epilepsy. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2010;12(2):96–8.
- Coppola G, Fortunato D, Auricchio G, Mainolfi C, Operto FF, Signoriello G, et al. Bone mineral density in children, adolescents, and young adults with epilepsy. *Epilepsia*. 2009;50(9):2140–6.
- Rocha S, Ferraz R, Prudêncio C, Fernandes MH, Costa-Rodrigues J. Differential effects of antiepileptic drugs on human bone cells. *J Cell Physiol*. 2019;234(11):19691–701.
- Fekete S, Simko J, Mzik M, Karesova I, Zivna H, Pavliková L, et al. Effect of mirtazapine on rat bone tissue after orchidectomy. *Pharmacology*. 2015;95(3–4):166–72.
- Moraes RB, Corrêa L, Luz JGC. Adverse effects of the amlodipine on bone healing of the mandibular fracture: an experimental study in rats. *Oral Maxillofac Surg*. 2011;15(2):93–101.
- Bhattoa HP, Wamwaki J, Kalina E, Foldesi R, Balogh A, Antal-Szalmas P. Serum sclerostin levels in healthy men over 50 years of age. *J Bone Miner Metab*. 2013;31(5):579–84.
- Shah AD, Shoback D, Lewiecki EM. Sclerostin inhibition: a novel therapeutic approach in the treatment of osteoporosis. *Int J Womens Health*. 2015;7:565–80.
- Dunitz M. *Bone markers, biochemical and clinical perspectives*. London: Martin Dunitz LTD; 2001.
- Wheater G, Eshahaly M, Tuck SP, Datta HK, van Laar JM. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *J Transl Med*. 2013;11:201.



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacological Reports

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharep

Original article

The effect of gabapentin and pregabalin on bone turnover and bone strength: A prospective study in Wistar rats



Julius Simko^{a,*}, Iva Karesova^b, Jan Kremlacek^c, Zimcikova Eva^d, Jiri Horacek^e,
Sona Fekete^b, Jana Malakova^b, Helena Zivna^f, Vladimír Palicka^b

^aDepartment of Neurology, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic

^bInstitute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic

^cDepartment of Pathophysiology, Charles University, Faculty of Medicine, Hradec Kralove, Czech Republic

^dDepartment of Social and Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University, Prague, Czech Republic

^eDepartment of Internal Medicine – Hematology, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic

^fRadioisotope Laboratories and Vivarium, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2019

Received in revised form 31 July 2019

Accepted 13 August 2019

Available online 15 August 2019

Keywords:

Bone mineral density

Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand

Amino-terminal propeptide of procollagen type I

Bone alkaline phosphatase

ABSTRACT

Background: There are limited data on the effects of GBP on bone and no data for PGB. Some data suggest that there is a significant influence of sex hormone balance on the susceptibility of bone to antiepileptic drug-induced bone loss.

Methods: Forty-eight male Wistar rats were divided into six groups that were subjected to two surgeries, sham (noORX) or real orchidectomy (ORX), and were fed three diets, a SLD, a SLD enriched with GBP or a SLD enriched with PGB. Dual energy X-ray absorptiometry was used to measure the bone mineral density. The concentrations of bone turnover markers were assayed. The femurs were biomechanically tested. **Results:** Significant reductions in bone mineral density, weight and biomechanical strength were observed in ORX animals. GBP or PGB exposure did not cause significant alterations in bone mineral density or biomechanical strength. No changes in bone turnover markers were observed, except for RANKL. A significant increase was found in the ORX GBP and ORX PGB groups. Within the orchidectomized animal group, RANKL levels were significantly higher in the ORX PGB group than in the ORX GBP group.

Conclusions: Because neither GBP nor PGB affected bone mineral density or mechanical bone strength, both of these antiepileptic drugs could be considered drugs with lower risks to bone health. A shift in RANKL levels indicates that the effects of GBP and PGB on osteoclast activity may be dependent on the hormonal status of animals.

© 2019 Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

There is a high prevalence of abnormally low bone mineral density (BMD), exceeding 50%, among patients with epilepsy. [1,2] Osteopenia and osteoporosis are found in 37–75% and 12–25% of these patients, respectively [1–4]. The important role of

antiepileptic drugs (AEDs) in the pathogenesis of osteopenia has been highlighted in some studies, mostly of which have showed the negative effects of enzyme-inducing AEDs (EIAEDs) on bone health. [5,6,7] However, the adverse effects of AEDs have been questioned because of other studies with conflicting results, in which bone loss was attributed more to lifestyle or perceived as a marker of poorer health rather than being seen as a consequence of epilepsy treatment [8]. The inconsistencies in the results of the available studies may be caused by methodological issues, as most of the studies had a cross-sectional design and did not consider factors that have an equal or even greater impact on BMD than AED therapy (e.g., physical activity, sunlight exposure, vitamin D levels, calcium and vitamin D food intake) [4,9–11]. Limited prospective data are available, and because of this, the effect of new AEDs on bone is still unknown.

Abbreviations: AEDs, antiepileptic drugs; BALP, bone alkaline phosphatase; BMD, bone mineral density; BTM, bone turnover markers; DEXA, dual energy X-ray absorptiometry; EIAEDs, enzyme-inducing AEDs; GBP, gabapentin; LEV, levetiracetam; LTG, lamotrigine; noORX, gonadally intact; OPG, osteoprotegerin; ORX, orchidectomized; PGB, pregabalin; PINP, amino-terminal propeptide of procollagen type I; PHT, phenytoin; RANKL, receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand; SLD, standard laboratory diet; SCL, sclerostin; TPM, topiramate; VPA, valproate.

* Corresponding author.

E-mail address: simko.julius@gmail.com (J. Simko).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2019.08.004>

1734-1140/© 2019 Maj Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Gabapentinoids (e.g., pregabalin (PGB) and gabapentin (GBP)) are increasingly used because of their indications for epilepsy treatment, neuropathic pain and some psychiatric disorders. [12] The risk of GBP on bone health was reflected in a large prospective study showing the association between GBP and bone loss [8]. Additionally, an increased risk of nontraumatic bone fractures was found in a large population-based pharmacoepidemiological study of older adults. [13] Furthermore, GBP-induced rarefaction of cancellous bone was reported in an animal study. [14] In contrast to these findings, another retrospective cohort study did not find a reduction in BMD in those exposed to GBP. [15] For PGB, there is a lack of data on its effect on bone health.

In an orchidectomized rat model, we showed that some new AEDs may significantly reduce BMD and impair mechanical bone strength. [16–18] However, this negative effect was not observed in gonadally intact animals. [19,20]

In the current study, gonadally intact animals and orchidectomized animals were exposed to GBP or PGB to determine whether the impact of GBP and PGB on bone may be dependent on hormonal status in animals.

Materials and methods

Animals

The experiment used 24 eight-week-old male albino Wistar rats (Biotest s.r.o., Konarovice, Czech Republic). The animals were housed in groups of 4 in plastic cages. During the experimental period, the animals were maintained in conventional controlled conditions (12 h light and 12 h dark, temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$, air humidity 30–70%). Tap water and a standard laboratory diet (SLD; VELAS, a.s., Lysa nad Labem, Czech Republic) or a SLD enriched with GBP (224 mg/100 g) or PGB (48 mg/100 g) were given ad libitum. Drinking water was available ad libitum. The weights of the rats were monitored once a week. All animals received humane care in accordance with the guidelines set by the Institutional Animal Use and Care Committee of Charles University, Faculty of Medicine, Hradec Kralove, Czech Republic. The protocol of the experiment was approved by the same committee.

Experimental design

The rats were randomly divided into six groups. There were two control groups: the 1st group was a sham-operated control group (control noORX), and the 2nd control group received an orchidectomy (control ORX); both received the standard laboratory diet (SLD). There were four experimental groups: the 3rd group received an orchidectomy (ORX GBP), and the 4th comprised gonadally intact animals (noORX GBP); both received a SLD enriched with GBP. The 5th group received an orchidectomy (ORX PGB), and the 6th comprised gonadally intact animals (noORX PGB); both received a SLD enriched with PGB. After 12 weeks, the animals were sacrificed by blood withdrawal from the abdominal aorta under ether anesthesia, and the obtained serum was aliquoted and stored at -80°C for biochemical analyses. After sacrificing the rats, both the tibiae and femurs were dissected free of soft tissue, wrapped in gauze moistened with saline and frozen at -80°C until required for analysis.

Analysis of serum and bone homogenates

The blood serum levels of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) were determined as described previously. [19] The amino-terminal propeptide of procollagen type I (PINP), sclerostin (SCL), and bone alkaline

phosphatase (BALP) markers were analyzed in bone homogenates according to a method described previously. [19]

The blood serum levels of GBP and PGB were determined in the middle and at the end of the experiment. The concentrations of GBP and PGB in the samples were determined using a modified high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. [21] The sample preparation utilized protein precipitation and the addition of the internal standard deuterated pregabalin-d6. The analytes were separated on a Discovery HS F5 column (100 mm x 2.1 mm I.D., 5 μm particle size, Supelco, PA, USA) and detected with an Agilent 6490 triple quadrupole LC/MS system operating in positive mode at a transition of $172.2 > 154.1$ for GBP and $160.2 > 55.1$ for PGB.

Dual energy X-ray absorptiometry analysis

The BMD of the whole body, the lumbar vertebrae, and both femurs (BMD, g/cm²) were measured using dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) on a Hologic Delphi A device (Hologic, MA, USA) at the Osteocenter of the University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic, as previously described. [19]

Biomechanical testing procedure

Mechanical testing of the rat femoral shaft and femoral neck was performed with a specially custom-made electromechanical testing machine (Martin Kosek & Pavel Trnecka, Hradec Kralove, Czech Republic) according to our previously described method. [19,22]

Statistical analysis

The data were statistically processed with R software version 3.4 (R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; available online at <http://www.R-project.org/>) [23] using the “nortest” package. Based on the Anderson-Darling test for normality and Bartlett’s test of variances, ANOVA or the Kruskal-Wallis rank sum test were used for the comparisons of the six groups (Control noORX, Control ORX, GBP noORX, GBP ORX, PGB noORX and PGB ORX). In cases of significant differences, we performed multiple Student’s t-tests or Wilcoxon rank sum tests, as was appropriate. The resulting p-values were adjusted using the Holm-Bonferroni test for multiple comparisons. [24] The results were considered to be statistically significant when the probability level (*p*) was below an alpha level of 0.05.

Results

Significant reductions in the final weight, BMD and biomechanical strength were observed in orchidectomized rats in our study. However, GBP or PGB exposure (for the serum concentrations, see Table 1) did not produce any significant alterations in BMD or biomechanical strength in either gonadally intact or orchidectomized animals (Tables 2 and 3).

No changes in bone turnover markers were observed except for RANKL and sclerostin. A highly significant increase in RANKL was shown in GBP- ($p = 0.0004$) and PGB-exposed ($p = 0.0001$) orchidectomized rats (Table 4, Fig. 1) in comparison with that in the Control ORX group. In gonadally intact animals, no increase in RANKL was found in the GBP-exposed group. In the PGB-exposed group, the increase in this marker showed borderline significance ($p = 0.07$) (Table 4). Within the group of gonadally intact animals, the RANKL levels were significantly higher in the PGB-exposed group compared to that in GBP-exposed animals (Table 4 and Fig. 1). Sclerostin (SCL) was significantly increased only in the PGB

Table 1
Serum gabapentin and pregabalin concentrations after 90 days of drug administration.

Parameter	GBP ORX n = 8	GBP noORX n = 8	PGB ORX n = 8	PGB noORX n = 8	Control ORX	Control noORX
Serum drug concentration (mg/L)	7.8 (7.0-8.4)	8.9 (8.5-9.6)	4.8 (4.5-5.0)	3.9 (3.6-4.3)	Not available	Not available

Data are expressed as the median (25th–75th percentile). The current reference range of GBP and PGB for human therapeutic use is 2–20 mg/l and 2–8 mg/l, respectively. Then the plasmatic concentrations of both drugs in our experiment correspond to the human therapeutic levels. [25].

Table 2
Effect of gabapentin and pregabalin on bone densitometric parameters in comparison with those in the control groups.

Parameter	GBP ORX n = 8	GBP noORX n = 8	PGB ORX n = 7 (for weight, n = 8)	PGB noORX n = 8	Control ORX n = 16	Control noORX n = 15 (for weight, n = 16)
Whole body final weight (g)	446.5 (427.5; 475)	484.5 (468.8; 528.5)	425 (416.2; 441.3)**	486.5 (478.5; 516)	467.5 (430.5; 492)	512.5 (475.5; 524.3)
Whole body BMD (g/cm ²)	0.157 (0.155; 0.159)*	0.171 (0.17; 0.174)	0.159 (0.153; 0.161)**	0.178 (0.171; 0.180)	0.153 (0.151; 0.159)*	0.167 (0.160; 0.173)
Diaphysis right femur BMD (g/cm ²)	0.159 (0.153; 0.167)*	0.175 (0.17; 0.18)	0.153 (0.151; 0.161)*	0.177 (0.169; 0.182)	0.163 (0.152; 0.170)*	0.18 (0.171; 0.187)
Diaphysis left femur BMD (g/cm ²)	0.165 (0.158; 0.174)	0.178 (0.165; 0.184)	0.157 (0.154; 0.161)**	0.178 (0.173; 0.180)	0.164 (0.152; 0.168)**	0.184 (0.169; 0.186)
Lumbar column (L3–L5) (g/cm ²)	0.174 (0.172; 0.184)**	0.203 (0.197; 0.209)	0.181 (0.177; 0.186)**	0.214 (0.207; 0.220)	0.186 (0.174; 0.192)**	0.207 (0.194; 0.221)

Data are expressed as the median (25th–75th percentile). BMD – bone mineral density. The indicated statistical significances (**p* < 0.05, ***p* < 0.01) result from a Wilcoxon rank sum test or a *t*-test with a pooled standard deviation between two groups differing in terms of orchidectomy (real or sham) but with the same diet. All tests were controlled for multiple comparisons.

Table 3
Effects of gabapentin and pregabalin on bone biomechanical parameters (maximal load; see Methods).

Parameter	GBP ORX n = 8	GBP noORX n = 8	PGB ORX n = 8	PGB noORX n = 8	Control ORX n = 16	Control noORX n = 16
Maximal load of the LF shaft (N)	181 (176; 184)	211 (191; 227)	172 (158; 184)*	212 (198; 217)	168 (155; 185)*	192 (182; 213)
Maximal load of the RF shaft (N)	197 (191; 206)	239 (220; 245)	198 (181; 204)	218 (204; 240)	191 (180; 212)*	219 (207; 233)
Maximal load of the LF neck (N)	138 (119; 143)	162 (153; 173)	145 (124; 159)	155 (131; 158)	143 (121; 153)	146 (107; 160)
Maximal load of the RF neck (N)	147 (128; 158)	163 (153; 172)	158 (141; 181)	159 (145; 182)	139 (130; 159)	139 (129; 158)

Data are expressed as the median (25th–75th percentile). LF – left femur; RF – right femur. The indicated statistical significance (**p* < 0.05) results from a Wilcoxon rank sum test or a *t*-test with a pooled standard deviation between two groups that differ in terms of orchidectomy (real or sham) but with the same diet. All tests were controlled for multiple comparisons.

Table 4
Levels of bone markers.

Parameter	GBP ORX n = 8	GBP noORX n = 8	PGB ORX n = 8	PGB noORX n = 8	ORX Control n = 16	noORX Control n = 16
BALP (ng/ml)	2.787 (2.537; 3.236)	2.732 (2.039; 2.857)	3.114 (2.654; 3.176)	2.752 (2.621; 3.048)	2.986 (1.634; 4.187)	2.639 (2.143; 2.992)
PINP (pg/ml)	83.642 (36.432; 150.333)	80.132 (54.333; 108.388)	126.464 (81.536; 166.128)	87.503 (55.211; 96.453)	89.96 (58.721; 121.901)	71.708 (43.276; 84.344)
Sclerostin (pg/ml)	554.5 (459.028; 662.663)	327.106 (297.923; 449.312)	882.344 (463.283; 1343.332)	707.478 (520.254; 1037.059)+	483.066 (322.668; 626.232)	404.68 (289.429; 519.098)
RANKL (pg/ml)	576.175 (466; 705.925)+++	309.3 (255.45; 379.062)°	598.175 (551.663; 709.563)+++	546.775 (473.312; 652.05)	337.816 (174.65; 397.533)	395.358 (301.137; 438.644)
OPG (ng/ml)	484.5 (418.5; 517.475)	611.075 (567.975; 674.35)	415.825 (391.6; 428.612)	481.8 (428.6; 544.4)	460.25 (411.113; 523.55)	450.825 (439.387; 693.187)

Data are expressed as the median (25th–75th percentile). BALP – bone alkaline phosphatase; PINP – amino-terminal propeptide of procollagen type I; RANKL – receptor activator of NF- κ B ligand; OPG – osteoprotegerin; The indicated statistical significance (**p* < 0.05) results from a Wilcoxon rank sum test or a *t*-test with a pooled standard deviation between two groups that differ in terms of orchidectomy (real or sham) but with the same diet (**p* < 0.05), in terms of diet (AED ORX vs. Control ORX: +*p* < 0.001, ++*p* < 0.001) or in terms of the AED used (GBP noORX vs. PGB noORX: °*p* < 0.05). All tests were controlled for multiple comparisons.

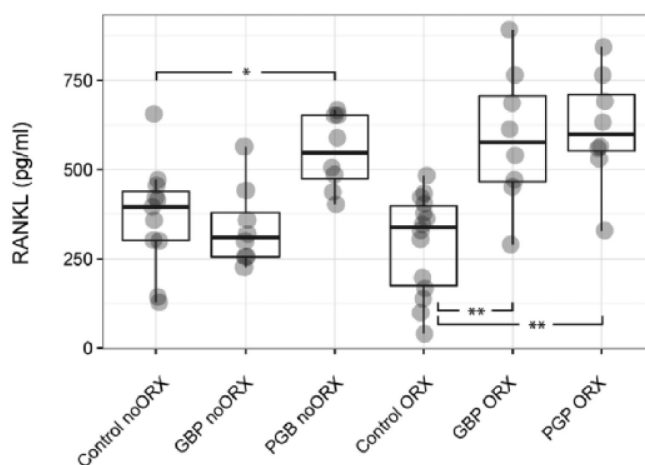


Fig. 1. Distribution of RANKL among subgroups of animals. For details and significant differences, see Table 4. In the plot, the lower and upper hinges (first and third quartiles) surround the median of the subgroup RANKL distribution. The whiskers extend to the largest or smallest values and are no larger than 1.5 times the distance between the first and third quartiles. The dots representing individual values were jittered to avoid overlapping.

group in gonadally intact animals when compared to that in the Control noORX group ($p=0.02$) (Table 4).

Discussion

Significant reductions in body weight, BMD and biomechanical strength were observed in orchidectomized rats in our study. However, neither GBP nor PGB exposure resulted in significant alterations in BMD or biomechanical strength in either gonadally intact or orchidectomized animals. No changes in bone turnover markers were observed except for RANKL, a marker reflecting osteoclast activity. Highly significant increases in this marker were found in GBP- and PGB-exposed orchidectomized rats. In gonadally intact animals, an increase in RANKL showed borderline significance in the PGB-exposed group, and no significant change was observed in the GBP-exposed group. Within the group of orchidectomized animals, the RANKL levels were significantly higher in the PGB-exposed group than in GBP-exposed animals. No evidence for the effects of PGB on bone metabolism was found, and thus there are no data that can support broader discussion. In the case of GBP, our findings agree with the study by Kanda et al. [14] showing no significant alterations in BMD, mechanical bone strength or bone markers in animals exposed to lower doses of GBP (30 mg/kg). Unfortunately, the serum levels of GBP were not changed in this study. In our study, the serum levels of GBP were relatively low. The median and interquartile ranges of the GBP serum levels in gonadally intact and orchidectomized rats were 8.9 (8.5–9.6) ml/L and 7.8 (7.0–8.4) ml/L, respectively. Based on the pharmacokinetic data obtained after the oral administration of GBP, [26] we can presume that the GBP levels observed in our study were not higher than those reached after the administration of GBP orally at a dosage of 30 mg/kg and that exposure was comparable in both studies. The effect of GBP on bone is probably dose-dependent. Exposure to higher doses of GBP (150 mg/kg) led to significant reductions in osteocalcin (a marker of bone formation) and increases in tartrate-resistant acid phosphatase 5b (a marker of bone resorption). BMD and mechanical bone strength were not affected in this study, but histomorphometric analyses showed negative changes, including decreases in bone volume, osteoid

volume, and mineralizing surface area and increases in trabecular separation and osteoclast surface area and number. [14]

Based on the evidence from the literature, the dose-dependent effects of AEDs on bone metabolism should not be exceptional. While therapeutic doses of phenytoin (PHT) were associated with the accelerated reduction of BMD, [27,28] low PHT doses were inversely related to osteogenic effects [29].

Our results that show a shift in RANKL levels indicate that the risk of the negative effects of GBP or PGB on bone may be dependent on the hormonal status of animals. Sex hormone deficiency has deleterious effects on bone tissue. Although the underlying mechanisms of the negative effect of GBP and PGB on bone are unclear, it is probable that bone sensitivity to this kind of negative effect would be more pronounced in sex hormone-deficient subjects, and this would be similar to the effects of other medications with a well-known negative impact on bone health. [30] The orchidectomized model has already been used to study BMD, mechanical strength, and bone turnover markers after exposure to topiramate (TPM), lamotrigine (LTG), levetiracetam (LEV), and lacosamide. [16,18] It seems that LTG and TPM exposure in sex hormone-deficient animals may increase risk, since not only decreased BMD but also reduced mechanical bone strength were associated with LTG and TPM exposure in these animals [18]. This negative effect was not observed in gonadally intact animals. [19,20] Similarly, one recent study demonstrated that after exposure to valproate (VPA), carbamazepine and LEV, there was more pronounced bone loss in ovariectomized rats compared to normal rats. [31] To date, there are no data on the effects of gabapentinoids on sclerostin levels. In our study, we observed a borderline significant increase in sclerostin in the PGB group in gonadally intact animals. Sclerostin is an important paracrine regulator of bone mass and may have catabolic effects through inhibiting osteoblast function while stimulating osteoclast function. [32] However, in our study, the change in sclerostin level was not associated with significant changes in BMD or mechanical bone strength. For GBP and PGB, unfortunately, there are no data in the literature on their effects on the bone markers measured in this study. We can only speculate that the changes in both biochemical markers mentioned above precede later changes in BMD and

biomechanical bone strength. Generally, exposure to EIAEDs leads to acceleration of bone turnover. Data for VPA and new AEDs are conflicting, scarce, or missing. [33] DEXA is considered the most reliable diagnostic tool for primary osteoporosis. [34] However, estimating the risk of fracture in patients with epilepsy based solely on BMD is inaccurate. A meta-analysis assessing the effects of epilepsy on fracture risk showed that the deficit in BMD in patients with epilepsy was too small to explain the observed increase in fracture risk. [35] The remainder of the increase in fracture risk may be linked to other factors, such as seizures or impaired bone quality [14,27,35]. Because of the inconsistency in the effects of ADE on bone turnover markers and the poor or nonexistent correlation between BMD and the mechanical strength of bone, histomorphometric bone analysis is one of the relevant diagnostic tools for the proper and comprehensive estimation of the risk of antiepileptics to bone health. [14,27]

It is questionable whether 12 weeks of exposure is sufficient to produce additional changes in BMD or mechanical bone strength. Kanda et al. [14] considered this interval too short and discussed it as one of the limitations of their study. However, based on data from Sengupta, [36] one month of animal life is approximately equivalent to three human years. The follow-up time in our study and in Kanda et al. [14] was, therefore, comparable to approximately nine human years. Prospective human studies have shown significant reductions in BMD after only 6 and 12 months of exposure to EIAEDs, specifically carbamazepine and PHT. [28,37] Thus, we determined that a 12-week interval of exposure should be sufficient to assess the influence of AEDs on BMD or mechanical bone strength using a rat model.

As neither low nor high doses of GBP affected BMD or mechanical bone strength, GBP could be considered a drug with a lower risk to bone health compared to EIAEDs. It is necessary to confirm this finding in prospective human trials; a large prospective study in patients with a high prevalence of GBP found significant reductions in BMD in those treated with nonenzyme inducing AEDs compared to patients treated with EIAEDs. Nevertheless, the study design had several limitations, and many important factors with possible impacts on bone health were not included in the analysis (physical activity, diet, and comorbidities); also, patients with diagnoses other than epilepsy were enrolled. [8] Significant limitations might also have influenced the results of the pharmacoepidemiologic study reporting an increased risk of nontraumatic bone fractures in older adults. [13]

A limitation of this study is the relatively small sample size, and although statistical significance was found for some of the observed effects, the ability to identify small effects was limited.

Conclusions

Because neither GBP nor PGB affected BMD or mechanical bone strength, both of these AEDs could be considered drugs with a lower risk to bone health. Our results provide new evidence that PGB has no effect on BMD and mechanical bone strength in this rat model. For GBP, our findings agree with the animal study by Kanda et al. [14] Based on the shift in RANKL levels, indicating that the effect of GBP and PGB on osteoclast activity may be dependent on the hormonal status of animals, we cannot exclude that there is a higher risk of bone loss after exposure to GBP and, especially, to PGB in sex hormone-deficient animals. There is conflicting evidence of the effects of GBP on bone, and therefore it is necessary to confirm these findings in prospective human trials.

Conflict of interest

None of the authors has any conflict of interest to disclose.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dagmar Jezkova and Katerina Sildbergerova for their skillful technical assistance throughout the whole experiment. This study was supported by the Charles University projects SVV-2019-260398 and PROGRESQ40-07.

References

- [1] Sato Y, Kondo I, Ishida S, Motooka H, Takayama K, Tomita Y, et al. Decreased bone mass and increased bone turnover with valproate therapy in adults with epilepsy. *Neurology* 2001, doi:http://dx.doi.org/10.1212/WNL.57.3.445.
- [2] Kulak CAM, Borba VZC, Bilezikian JP, Silvaldo CE, De Paola L, Boguszewski CL. Bone mineral density and serum levels of 25 OH vitamin D in chronic users of antiepileptic drugs. *Arq Neuropsiquiatr* 2004, doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2004000600003.
- [3] Ashjazadeh N, Zamani A, Pourjafar M, Omrani GR. Bone density of ambulatory adult patients receiving long-term anticonvulsant drug therapy. *Arch Iran Med* 2009.
- [4] Coppola G, Fortunato D, Auricchio G, et al. Bone mineral density in children, adolescents, and young adults with epilepsy. *Epilepsia* 2009, doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02082.x.
- [5] Suljic EM, Mehicevic A, Mahmutbegovic N. Effect of long-term carbamazepine therapy on bone health. *Med Arch* 2018;72(4):262–6, doi:http://dx.doi.org/10.5455/medarch.2018.72.262-266.
- [6] Brodie MJ, Mintzer S, Pack AM, et al. Enzyme induction with antiepileptic drugs: cause for concern? *Epilepsia* 2013;54:11–27.
- [7] Ahmad BS, Petty SJ, Gorelik A, OBrien TJ, Hill KD, Christie JJ, et al. Bone loss with antiepileptic drug therapy: a twin and sibling study. *Osteoporos Int* 2017;28:2591–600, doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00198-017-4098-9.
- [8] Ensrud KE, Walczak TS, Blackwell TL, Ensrud ER, Barrett-Connor E, Orwoll ES. Antiepileptic drug use and rates of hip bone loss in older men: a prospective study. *Neurology* 2008, doi:http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000324919.86696.a9.
- [9] Tosun A, Erisen Karaca S, Unuvar T, Yurekli Y, et al. Bone mineral density and vitamin D status in children with epilepsy, cerebral palsy, and cerebral palsy with epilepsy. *Childs Nerv Syst* 2017, doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00381-016-3258-0.
- [10] Baer MT, Kozlowski BW, Blyler EM, Trahms CM, Taylor ML, Hogan MP. Vitamin D, calcium, and bone status in children with developmental delay in relation to anticonvulsant use and ambulatory status. *Am J Clin Nutr* 1997, doi:http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/65.4.1042.
- [11] Filardi S, Guerreiro CAM, Magna LA, Neto JFM. Bone mineral density, vitamin D and anticonvulsant therapy. *Arq Neuropsiquiatr* 2000, doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2000000400003.
- [12] Wettermark B, Brandt L, Kieler H, Bodén R. Pregabalin is increasingly prescribed for neuropathic pain, generalised anxiety disorder and epilepsy but many patients discontinue treatment. *Int J Clin Pract* 2014;68(1):104–10, doi:http://dx.doi.org/10.1111/ijcp.12182.
- [13] Jetté N, Lix LM, Metge CJ, Prior HJ, McChesney J, Leslie WD. Association of antiepileptic drugs with nontraumatic fractures: A population-based analysis. *Arch Neurol* 2011, doi:http://dx.doi.org/10.1001/archneurol.2010.341.
- [14] Kanda J, Izumo N, Kobayashi Y, et al. Effects of the Antiepileptic Drugs Phenytoin, Gabapentin, and Levetiracetam on Bone Strength, Bone Mass, and Bone Turnover in Rats. *Biol Pharm Bull* 2017;40(11):1934–40, doi:http://dx.doi.org/10.1248/bpb.b17-00482.
- [15] Lee RH, Lyles KW, Sloane R, Colón-Emeric C. The association of newer anticonvulsant medications and bone mineral density. *Endocr Pract* 2012, doi:http://dx.doi.org/10.4158/EP12119.OR.
- [16] Fekete S, Simko J, Gradosova I, et al. The effect of levetiracetam on rat bone mass, structure and metabolism. *Epilepsy Res* 2013, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2013.08.012.
- [17] Simko J, Fekete S, Malakova J, et al. The effect of lacosamide on bone tissue in orchidectomised male albino Wistar rats. *Biomed Pap* 2015;159(3), doi:http://dx.doi.org/10.5507/bp.2014.006.
- [18] Simko J, Fekete S, Gradosova I, et al. The effect of topiramate and lamotrigine on rat bone mass, structure and metabolism. *J Neurol Sci* 2014, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2014.02.032.
- [19] Simko J, Karesova I, Kremlacek J, et al. The effect of lamotrigine and phenytoin on bone turnover and bone strength: A prospective study in Wistar rats. *Epilepsy Res* 2016;128:, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.10.005.
- [20] Karesova I, Simko J, Fekete S, et al. The effect of levetiracetam on rat bone mineral density, bone structure and biochemical markers of bone metabolism. *Eur J Pharmacol* 2018;824:115–9, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.02.010.
- [21] Juenke JM, Brown PI, Johnson-Davis KL, McMillin GA. Simultaneous quantification of levetiracetam and gabapentin in plasma by ultra-pressure liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry detection. *Ther Drug Monit* 2011, doi:http://dx.doi.org/10.1097/FTD.0b013e31820b1fce.
- [22] Gradosova I, Zivna H, Svejkovska K, Palicka V, Tichy A, Zivny P. The role of atorvastatin in bone metabolism in male albino Wistar rats. *Pharmazie* 2011, doi:http://dx.doi.org/10.1691/ph.2011.1525.

- [23] R Core Team. R: a language and environment for statistical computing; version 3.4. Available online: Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2018. <https://www.R-project.org/>.
- [24] Holm S. A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scand J Stat* 1979;6(2):65–70.
- [25] Patsalos PN, Spencer EP, Berry DJ. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs in epilepsy: a 2018 update. *Ther Drug Monit* 2018;40(5):526–48.
- [26] Aryal B, Tae-Hyun K, Yoon-Gyoon K, Hyung-Gun K. A comparative study of the pharmacokinetics of traditional and automated dosing/blood sampling systems using gabapentin. *Indian J Pharmacol* 2011. doi:<http://dx.doi.org/10.4103/0253-7613.81512>.
- [27] Nissen-Meyer LSH, Svalheim S, Taubøll E, et al. Levetiracetam, phenytoin, and valproate act differently on rat bone mass, structure, and metabolism. *Epilepsia* 2007. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.01176.x>.
- [28] Pack AM, Morrell MJ, Randall A, McMahon DJ, Shane E. Bone health in young women with epilepsy after one year of antiepileptic drug monotherapy. *Neurology* 2008. doi:<http://dx.doi.org/10.1212/01.wnl.0000310981.44676.de>.
- [29] Ohta T, Wergedal JE, Gruber HE, Baylink DJ, William Lau KH. Low dose phenytoin is an osteogenic agent in the rat. *Calcif Tissue Int* 1995. doi:<http://dx.doi.org/10.1007/BF00298743>.
- [30] Fujita K, Kasayama S, Hashimoto J, et al. Inhaled corticosteroids reduce bone mineral density in early postmenopausal but not premenopausal asthmatic women. *J Bone Miner Res* 2001. doi:<http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.4.782>.
- [31] Parveen B, Tiwari AK, Jain M, et al. The anti-epileptic drugs valproate, carbamazepine and levetiracetam cause bone loss and modulate Wnt inhibitors in normal and ovariectomised rats. *Bone* 2018. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2018.05.011>.
- [32] Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone* 2017;96:29–37. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2016.10.007>.
- [33] Valsamis HA, Arora SK, Labban B, McFarlane SI. Antiepileptic drugs and bone metabolism. *Nutr Metab* 2006. doi:<http://dx.doi.org/10.1186/1743-7075-3-36>.
- [34] Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Melton LJ, Khaltaev N. A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone* 2008. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2007.11.001>.
- [35] Vestergaard P. Epilepsy, osteoporosis and fracture risk - a meta-analysis. *Acta Neurol Scand* 2005;112:277–86. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0404.2005.00474.x>.
- [36] Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med* 2013. doi:<http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0404.2005.00474.x>.
- [37] Kim SH, Lee JW, Choi KG, Chung HW, Lee HW. A 6-month longitudinal study of bone mineral density with antiepileptic drug monotherapy. *Epilepsy Behav* 2007. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2006.11.007>.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejphar

Neuropharmacology and analgesia

The effect of levetiracetam on rat bone mineral density, bone structure and biochemical markers of bone metabolism

Iva Karesova^{a,*}, Julius Simko^b, Sona Fekete^a, Eva Zimcikova^c, Jana Malakova^a, Helena Zivna^d, Ladislava Pavlikova^a, Vladimir Palicka^a^a Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Charles University in Prague, Faculty of Medicine and University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic^b Department of Neurology, Charles University in Prague, Faculty of Medicine and University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic^c Department of Social and Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Czech Republic^d Radioisotope Laboratories and Vivarium, Faculty of Medicine, Hradec Kralove, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Antiepileptic drugs
Levetiracetam
Bone mineral density
Bone markers
Biomechanical properties

ABSTRACT

Some data suggest that exposure to levetiracetam (LEV) might be associated with a risk for bone health in the model of orchidectomized rats. The aim of this study was to investigate if there is any significant risk of LEV for bone health in the model of gonadally intact animals.

Wistar rats were divided into a control group and a test group, 8 rats in each group. The control rats received standard laboratory diet (SLD) while rats in the test group were fed SLD enriched with LEV for 12 weeks. Dual energy X-ray absorptiometry was used to measure BMD of the whole body, femur and lumbar vertebrae. The concentrations of bone markers were examined in bone homogenate. Both femurs and tibiae were used for biomechanical testing.

We found in the LEV group significantly decreased absolute and relative values of adipose tissue, higher whole-body BMD, higher right tibia cortical thickness, and a significantly increased concentration of Bone Alkaline Phosphatase (BALP) and cross-linked C-telopeptide of type I collagen (CTX-I) compared with the control group.

The results suggest that the long-term administration of LEV in the model of gonadally intact rats does not have a negative effect on bone. Significant increase in BMD and cortical thickness of the right tibia may indicate even a positive influence on the properties of bone. Further studies will be necessary in animals and humans to confirm these findings.

1. Introduction

Epilepsy is one of the most common chronic neurological disorders, characterized by recurrent seizures of cerebral origin (Hamed et al., 2014). The disease affects more than 50 million people worldwide (Shen et al., 2014). Anti-epileptic drugs (AEDs) are the main form of treatment for people with epilepsy and the treatment with AEDs is frequently lifelong (Shen et al., 2014; Fitzpatrick, 2004). However AEDs are prescribed as first-line treatment also for a variety of non-epileptic conditions as well, mainly bipolar spectrum disorders and chronic pain states (Reimers, 2014). Only one out of three AED users takes these drugs for epilepsy (Reimers, 2014). AEDs are associated with adverse effects on bone health and with increased risk of fracture (Koo et al., 2013). It is estimated that patients with epilepsy have a 2–6 times greater risk of bone fractures compared with the general population (Svalheim et al., 2011). Aetiology of osteopathy in epileptic

patients is multifactorial with an important role of a usually lower level of physical activity and probably also a shorter period of the exposure to the sun. The probability of a decrease in BMD increases with the length of AEDs medication, combination of AEDs, institutionalization and the presence of other risks for bone tissue in the case history (Desai et al., 1996). Enzyme-inducing AEDs are particularly implicated in bone loss, but some studies suggest that also valproate, an enzyme inhibitor, is associated with reduced bone mineral density (BMD) and bone loss (Anwar et al., 2014). Evidence for the effect of newer AEDs on bone metabolism and BMD is limited and further investigation is required (Anwar et al., 2014).

Levetiracetam (LEV) is a relatively new and one of the most widely-prescribed non enzyme-inducing AEDs, effective in the treatment of partial and generalized seizures (Artemiadis et al., 2016; Anwar et al., 2014). LEV is an analogue of the nootropic agent piracetam and has anti-seizure properties (Shetty, 2013; Erbaş et al., 2016). It has also

* Corresponding author.

E-mail address: karesova.iva@gmail.com (I. Karesova).<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.02.010>

Received 6 November 2017; Received in revised form 14 December 2017; Accepted 7 February 2018

Available online 08 February 2018

0014-2999/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

been proposed that the attractiveness of LEV as an AED is boosted by its beneficial pharmacokinetic attributes, including excellent oral bioavailability not dependent on the P450 cytochrome system, linear kinetics, minimal plasma protein binding, and rapid achievement of a steady state concentration (Shetty, 2013; Peyrl et al., 2015). The drug is safe and generally well tolerated (Koo et al., 2013). Literature data suggest that LEV may have minimal (if any) adverse effects on bone (Artemiadis et al., 2016; Koo et al., 2013; Erbaş et al., 2016; Nissen-Meyer et al., 2008), and the effect on bone may even be positive, as demonstrated by a recent retrospective cohort study (Phabphal et al., 2013). However, in orchidectomised rats we have demonstrated that LEV treatment may significantly reduce BMD and bone mineral content (BMC), and have an adverse effect on bone metabolism (Fekete et al., 2013). In this study we have exposed gonadally intact animals to LEV to investigate whether the effect applies also in the model of gonadally intact animals.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiment used eight-week-old male albino Wistar rats (Biotest s.r.o., Konarovice, Czech Republic). The animals were hosted in groups of 4 in plastic cages. During the experimental period the animals were maintained in controlled conventional conditions (12 h light and 12 h dark, temperature 22 ± 2 °C, air humidity 30–70%). Tap water and standard laboratory diet (SLD, VELAS, a.s., Lysa nad Labem, Czech Republic) or SLD enriched with LEV were given ad libitum. Drinking water was available ad libitum. The weights of the rats were monitored once a week. All animals received humane care in accordance with the guidelines set by the Institutional Animal Use and Care Committee of Charles University, Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Czech Republic. The protocol of the experiment was approved by the same committee.

2.2. Experiment design

The rats were divided into two groups of 8 animals: 1st group (Control group): rats fed with SLD; and 2nd group (LEV group): rats fed with SLD enriched with LEV (101 mg/25 g of the diet; Levetiracetam, UCB Pharma). On the second day the LEV group began to receive SLD enriched with LEV and the Control group only SLD, both diets ad libitum. After 12 weeks, the animals were killed by blood withdrawal from the abdominal aorta under ether anesthesia, and the obtained serum was aliquoted and stored at -80 °C for ensuing biochemical analyses. After kill of the rats, both tibiae and femurs were dissected free of soft tissue, wrapped in gauze moistened with saline and frozen to -80 °C till required for analysis.

2.3. Analysis of serum and bone homogenates

Blood serum levels also of levetiracetam were determined at the end of the experiment. Concentrations of levetiracetam in the samples were determined by the modified high-performance liquid chromatography method with UV photodiode-array detection (Lancelin et al., 2007). Levetiracetam and internal standard UCB 17025 were extracted after alkalization of the sample (0.05 ml) into dichloromethane. Organic solvent was evaporated and the residue was dissolved and injected for HPLC analysis. Compounds were separated on a Zorbax SB-C8 column (Agilent Technologies, USA) at flow rate 1.1 ml/min. The mobile phase was composed of 10% acetonitrile, 7% methanol and 83% of a 20 mM phosphate buffer pH 6.7 with 0.1% triethylamine. UV detection was performed at a wavelength of 200 nm.

Bone homogenate was prepared from the femur. After animal kill, both femurs were carefully excised; after removal of all the surrounding skin, muscle and other soft tissue, they were stored at -80 °C until

required. The diaphysis part of the femur (0.1 g) was disrupted and homogenized by Tissuelyser II (Qiagen, Netherlands). The homogenization consisted of the following steps. Liquid nitrogen was poured into the grinding jar over the ball and femur sample and 0.5 ml of phosphate buffer was added (PBS, PENTA Prague, Czech Republic). The femur tissue was ground at 30 Hz for 1 min. After this procedure a further 1.5 ml of phosphate buffer was added and ground at 10 Hz for 15 s. The raw tissue homogenate was centrifuged at 10,000 g at 4 °C for 10 min, and the resulting supernatant was collected and stored at -80 °C.

Levels of the markers of cross-linked C-telopeptide of type I collagen (CTX-I), amino-terminal propeptide of procollagen type I (PINP), sclerostin (SOST), Bone Alkaline Phosphatase (BALP) and Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand (RANKL) were analyzed in this bone homogenate using the ELISA method. Bone-marker levels were determined using kits from the firm Uscn Life Science Inc., Wuhan, China (PINP, ng/ml; CTX-I, pg/ml; SOST, pg/ml; RANKL, pg/ml), except for levels of BALP which were determined using a kit from the firm BlueGene Biotech, Shanghai, China (BALP, ng/ml).

2.4. Dual energy X-ray absorptiometry analysis

The rat bone mineral density (BMD, g/cm^2) was measured by means of dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) on a Hologic Delphi A device (Hologic, MA, USA) at the Osteocentre of the Faculty Hospital Hradec Kralove, Czech Republic. Before measurements, a tissue calibration scan was performed with the Hologic phantom for the small animal. BMD of the whole body, in the lumbar vertebrae and in both femurs (Fig. 1), and the total lean and fat masses were evaluated by computer using the appropriate software program for small animals (DEXA; QDR-4500A Elite; Hologic, Waltham, MA, USA). All animals were scanned by the same operator.

2.5. Biomechanical testing procedure

Mechanical testing of the rat femoral shaft and femoral neck was done with a special electromechanical custom-made testing machine

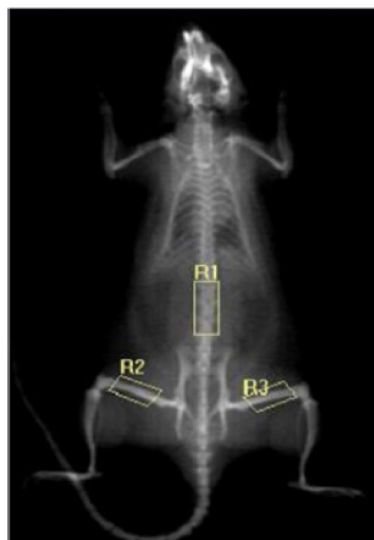


Fig. 1. Evaluation of BMD in three areas of the rat skeleton R1 – lumbar columna (L3–L5); R2 – left femur; R3 – right femur.

(Martín Kosek & Pavel Trnecka, Hradec Kralove, Czech Republic) according to our methods described in a previous report (Gradosova et al., 2011). For the three-point bending test, the femur or tibia was placed on a holding device with the two support points 18 mm apart. A small stabilizing preload to 10 N was used to fix the bone between the contacts. A constant deformation rate of 6 mm/min was generated until maximal load failure and the breaking strength (maximum load, N) was recorded. When the bone was broken, the thickness of the cortical part of the bone was measured by means of a sliding micrometer (OXFORD 0–25MM 30DEG POINTED MICROMETER, Victoria Works, Leicester, Great Britain). The proximal part of the femur was used for compression test of the femoral neck. The diaphysis of the bone was embedded into a container using a methacrylate resin, and a vertical load was applied to the top of the femoral head. A small stabilizing preload to 10 N was applied and increased at a constant speed of 6 mm/min until failure of the femoral neck. The breaking strength (maximum load, N) was recorded by the measuring unit (Digitalanzeiger 9180, Burster präzisionsmesstechnik gmbh & co kg, Gernsbach, Germany). All bones were analyzed by the same operator.

2.6. Open field test

An open field apparatus made of a wooden box (60 × 60 × 60 cm) was used to test the open field exploratory behavior of the rats. The floor of the apparatus was divided into 16 evenly-spaced squares surrounded by walls of 60 cm. The entire apparatus was painted black except for the floor, which was white and was divided by lines into 16 squares. In the novel test situation, each animal was placed in the low right corner of the test apparatus for a maximum of 5 min to observe the following behaviors:

- Ambulation:** the number of squares crossed by the rat
 - Rearing:** the number of times the rat stood on its hind limbs
 - Self grooming:** the number of responses of grooming, scratching, licking and washing made by each individual rat
 - Fecal pellets:** the number of fecal pellets excreted by each individual rat
 - Central latency:** time to enter the central part of the apparatus (that means four squares in the center of the apparatus)
- Before each trial, the floor and the walls were cleaned with cotton soaked in 70% alcohol.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the program NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical System, Kaysville, Utah, USA). Results of all measurements made after 12 weeks of the experiment are presented as the median and the 25th and 75th percentiles.

3. Results

3.1. Body weight and composition and tissue weights

The weight of the LEV group was decreased, but statistically insignificantly so versus the control group. DXA revealed that the LEV group showed significant decrease in fat mass (g, %) versus the control group. The lean body mass was increased versus the control group, but not statistically significantly. The concentration of LEV corresponded to the human therapeutic level of the drug (35, 3–235 mol/l) (Table 1).

3.2. Level of bone markers

Levels of bone markers from specimens from the femur were measured to assess the effects of treatment with LEV on bone turnover. LEV administration for 12 weeks caused an increase in BALP, CTX-I, RANKL and PINP, and a decrease in sclerostin levels versus the control group. There was statistically significant increase of BALP and CTX-I (Table 2).

Table 1

Weight, fat mass and serum levetiracetam concentration after 90 days of drug exposure.

Parameter	Control	LEV
Final body weight (g)	408,1 (387,5–429,75)	393,4 (383–405,2)
Fat (g)	61,8 (60,65–63,5)	35,85 (31,58–37,1) ^a
Fat (%)	15,4 (14,65–15,9)	8,95 (7,9–9,4) ^a
Lean body mass (g)	345,1 (323,95–366,85)	358,8 (344,8–372,4)
Serum drug concentration (μmol/l)	–	225,35 (215,23–235,25)

Data are expressed as medians (25th–75th percentiles).

^a P < 0,05 Control versus LEV.

Table 2

Levels of bone markers.

Parameter	Control	LEV
BALP (ng/ml)	1069 (0882–1888)	3,62 (2,12–4,87) ^a
CTX-I (pg/ml)	83,015 (46,301–152,004)	340,24 (114,50–569,41) ^a
RANKL (pg/ml)	359,41 (348,886–592,977)	581,58 (467,16–791,77)
PINP (ng/ml)	0 (0–0,12)	4,45 (0–8,80)
Sclerostin (pg/ml)	469,62 (377,474–539,791)	420,27 (380,67–505,97)

Data are expressed as medians (25th–75th percentiles).

^a P < 0,05 Control versus LEV.

3.3. Dual energy X-ray absorptiometry

Bone mineral density was determined by dual energy X-ray absorptiometry after 12 weeks levetiracetam administration. In the LEV group there was an unexpected significant increase in BMD of the whole body compared with the control group. There was no statistically significant difference in the BMD in the areas of the lumbar vertebrae or both femurs versus the control group (Table 3).

3.4. Biomechanical properties

We examined the impact of levetiracetam on bone mechanical characteristics as a measure of the effects of levetiracetam on bone metabolism. After levetiracetam administration for 12 weeks there was no statistically significant difference in parameters between the LEV group and control group, except for a statistically significant increase in right tibial cortical thickness in the LEV group (Table 4).

3.5. Open field test

The behaviors quantified in the Open Field Test were not significantly different between the control group and LEV group (Table 5).

4. Discussion

Research over recent decades has added to the considerable evidence that older AEDs may have diffuse and profound effects on bone

Table 3

Effect of levetiracetam on bone densitometric parameters.

Parameter	Control	LEV
Whole body		
BMD (g/cm ²)	0164 (0160–0166)	0176 (0173–0178) ^a
Diaphysis right femur		
BMD (g/cm ²)	0185 (0176–0196)	0178 (0172–0189)
Diaphysis left femur		
BMD (g/cm ²)	0186 (0177–0186)	0182 (0173–0190)
Lumbar column (L3–L5)		
BMD (g/cm ²)	0220 (0197–0222)	0,22 (0215–0225)

Data are expressed as medians (25th–75th percentiles).

^a P < 0,05 Control versus LEV.

Table 4
Biomechanical and geometric parameters of rat right and left femurs.

Parameter	Control	LEV
LF length (mm)	37,44 (36,94–38,26)	37,38 (37,12–37,99)
RF length (mm)	37,02 (36,705–38,165)	37,31 (36,92–37,72)
LF diameter (mm)	3,39 (3,315–3,63)	3,52 (3,46–3,74)
RF diameter (mm)	3,49 (3,4–3,655)	3,59 (3,52–3,7)
Cortical LF thickness (mm)	0,65 (0,605–0,67)	0,60 (0,588–0,64)
Cortical RF thickness (mm)	0,705 (0,645–0,718)	0,65 (0,595–0,665)
Maximal load of the left femoral shaft	187,5 (176,25–203,5)	191,5 (179,75–228,5)
Maximal load of the right femoral shaft	223 (215,25–238)	233 (226,75–243,75)
Maximal load of the left femoral neck	112 (101,75–157)	147,5 (139–160,75)
Maximal load of the right femoral neck	139 (128,5–147,5)	151 (126–152)
LT length (mm)	41,01 (40,255–42,085)	40,93 (40,56–41,97)
RT length (mm)	41,01 (40,13–41,685)	40,38 (39,87–41,6)
LT diameter (mm)	2,56 (2,545–2,755)	2,71 (2,56–2,915)
RT diameter (mm)	2,78 (2,735–3,13)	2,86 (2,56–2,96)
Cortical RT thickness (mm)	0,555 (0,538–0,592)	0,61 (0,58–0,63) ^a
Maximal load of the left tibial shaft (N)	247,5 (231–266,25)	278 (254,25–287,25)
Maximal load of the right tibial shaft (N)	106,5 (100,25–108,5)	104 (90,5–126)

Data are expressed as medians (25th–75th percentiles).

^a P < 0,05 Control versus LEV.

Table 5
Open field test.

Parameter	Control	LEV
Ambulation (n. squares)	93 (81–120)	88 (64–104)
Rearing (n. times)	18 (13–152)	13 (12–16)
Self-grooming (n. times)	2 (1–3)	1 (0–2)
Fecal pellets (number)	0 (0–1)	0 (0–0)
Central latency (sec)	44 (32–100)	55 (46–87)

Data are expressed as medians (25th–75th percentiles).

^a P < 0,05 Control versus LEV.

mineral density. Patients prescribed newer non enzyme-inducing AEDs are less likely to have a diagnosis of osteoporosis (Phabphal et al., 2013). There are only a few longitudinal studies with newer AEDs and their effect on bone – most of the studies are cross-sectional. Evidence relating to the effect of LEV on BMD and bone metabolism is limited. Monitoring of bone quality is problematic in humans since the results of studies may be affected by physical activity, diet, seizure frequency, differences in baseline BMD amongst subjects, and past intake of other AEDs. By contrast, the animal model provides a system which is isolated from disease, lifestyle, drugs and other confounding factors.

In this longitudinal study in rats there occurred a slightly significant increase in whole body BMD (P < 0,05) in the LEV group. We observed also in this group a significant increase in both a marker of bone formation (BALP) (P < 0,01) and a marker of bone resorption (CTXI) (P < 0,05), indicating greater bone turnover, but this effect was not associated with significant changes of BMD or mechanical strength. Amongst the geometric parameters we found a statistically significant increase in right tibia cortical thickness (P < 0,05). Both absolute and relative values of adipose tissue were significantly decreased (P < 0001, P < 0,01).

These results are consistent with the animal study by Anwar et al., in which there was no effect on BMD in albino female mice after 4 months of oral administration of LEV (Anwar et al., 2014). The findings on BMD are also in agreement with a study by Nissen-Meyer et al. Their results suggest that LEV could have a biphasic effect on bone. Reduced biomechanical strength of trabecular bone and reduced levels of serum osteocalcin, a marker of bone formation, were observed after low dose

LEV (concentration 122 ± 41 µmol/l) but not by high dose LEV (concentration 277 ± 65 µmol/l) (Nissen-Meyer et al., 2008). In our experiment, the serum level of LEV was 225,35 µmol/l (215,23–235,25 µmol/l), which is comparable to the high dose LEV in Nissen-Meyer's study. Also some human studies suggest that exposure to LEV has no negative impact on BMD: duration of exposure to newer non enzyme-inducing AEDs (including LEV) was associated with higher T-scores (hip, femoral neck, and lumbar spine) compared with non-users, and patients were less likely to receive a diagnosis of osteoporosis (Artemiadis et al., 2016). Phabphal et al. reported that all patients who switched to LEV from phenytoin had significant improvement in BMD (Phabphal et al., 2013). Contrastingly, another study has suggested that patients on long-term treatment with LEV have a higher risk for decrease of BMD; however, the validity of this study is limited because of the lack of measurement of baseline BMD before LEV treatment (Beniczky et al., 2012).

We report that LEV significantly elevated bone turnover. Regarding the impact of LEV on bone turnover markers (BTMs), the data are scarce and mixed. The study by Koo et al. presents that no differences were observed in biochemical parameters (BALP, C-telopeptide, insulin-like growth factor-1, calcium, phosphorus, parathyroid hormone, osteocalcin, 25-hydroxyvitamin D) after LEV monotherapy over 1 year (Koo et al., 2013). Similarly, Anwar et al. did not find any significant changes in BTM in female mice (Anwar et al., 2014). As we mentioned above, LEV treatment in the rat model resulted in significantly reduced levels of serum osteocalcin (Nissen-Meyer et al., 2008). Another study tested whether substituting LEV has lesser adverse effects on bone than older AEDs (valproate, carbamazepine). They found that patients randomized to older AED treatment had a decrease in serum levels of CTX-I and PINP, and patients randomized to LEV treatment had a decrease in serum levels of CTX-I, indicative of reduced bone resorption (Hakami et al., 2016). Although BTMs are frequently used in clinical trials and provide valuable information on the efficacy of osteoporosis treatments, their predictive value is limited because of their large biological variation. Currently the WHO recommends a DEXA scan as the gold standard for estimation of BMD (Wheater et al., 2013). To our knowledge there are no relevant data concerning the effect of LEV on the levels of sclerostin or RANKL. LEV is considered to be a weight-neutral antiepileptic drug (Gidal et al., 2003). It is difficult to explain the significant absolute / relative decrease in fatty tissue which we observed in both this study and in the orchidectomized rat model (Fekete et al., 2013). The result is surprising, especially in the light of the literature data, which reports a significant decrease in estradiol level and a decrease in aromatase expression after LEV administration (Svalheim et al., 2008; Cincioğlu-Palabiyik et al., 2017). As an expected consequence of the lack of estrogen we should consider the weight gain as due to the accumulation of adipose tissue, which is reported in both humans and rodents (Kim et al., 2014). It cannot be ruled out that the reduction in adipose tissue found by us could have been caused by a reduction in the volume of received diet by the LEV group. The consumption of diet from the feeder did not differ significantly, but we cannot exclude that the residues of incompletely-consumed granules in the litter were not higher in SDL enriched LEV. In our study the open field test (OFT) was used to test the animals for behavioral changes. We found no significant changes in the behavior of rats in the LEV group versus control. LEV seems to have no effect on the behavior of rats in this study. By contrast, another study suggests that mice under treatment with LEV spent less time in the center field than control group mice in the open field test (Moon et al., 2014).

In a previous study we published that LEV treatment significantly reduces BMD of the left and right femoral diaphysis in ORX rats. Administration of LEV in the ORX rat model significantly decreased the level of osteoprotegerin (a marker of bone formation) in serum and increased the level of CTX-I in bone homogenate. The results did not indicate any change in biomechanical bone strength in ORX rats (Fekete et al., 2013). Reproductive hormones have a bone-saving effect and

deficiency of androgens negatively affects body composition (Gradosova et al., 2012). We propose that sex hormone deficiency may be one of the important factors for the higher sensitivity of bone to antiepileptic drug-induced osteopathy. To our knowledge, this is the first report of a diverse effect of LEV on BMD, bone metabolism markers and biomechanical properties between groups of rats with different levels of sex hormone. The basic mechanism of effect of LEV on bone is still unclear.

There are several limitations that should be considered in evaluating the present study. Firstly, the sample size was small: although statistical significance is evident, the capacity to identify a small effect is limited. Secondly, behavioral activity was evaluated only by using OFT.

5. Conclusion

In conclusion, our study extends previous reports of the effects of LEV on bone, and suggests that long-term administration of LEV in the model of gonadally intact rats has no negative effect on bone. A significant increase in BMD and the cortical thickness of the right tibia may indicate even a positive influence on the properties of bone. It will be necessary to conduct further studies in animals and humans to confirm these findings.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dagmar Jezkova and Katerina Sildbergerova for their skilful technical assistance during the whole experiment, and Eva Cermakova, MA and doc. Jan Kremlacek for statistical analysis. The authors are grateful to Ian McColl MD, PhD for assistance with the manuscript. This study was supported by Charles University in Prague project SVV-2015-260181, SVV-2016-260289 and project PROGRES Q40-07.

Conflict of interest

Iva Karesova, Julius Simko, Sona Fekete, Eva Zimcikova, Jana Malakova, Helena Zivna, Ladislava Pavlikova, and Vladimir Palicka declare that they have no conflict of interest.

References

Anwar, M.J., Radhakrishna, K.V., Vohora, D., 2014. Phenytoin and sodium valproate but not levetiracetam induce bone alterations in female mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 92, 507–511.

Artemiadis, A.K., Lambrinou, I., Voskou, P., Tsvigoulis, G., Safouris, A., Bougea, A., Giannopoulos, S., Gatzonis, S., Triantafyllou, N., 2016. Preliminary evidence for gender effects of levetiracetam monotherapy duration on bone health of patients with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 55, 84–86.

Beniczky, S.A., Viken, J., Jensen, L.T., Andersen, N.B., 2012. Bone mineral density in adult patients treated with various antiepileptic drugs. *Seizure* 21, 471–472.

Cincioglu-Palabiyik, M., Üner, M., Ertoy-Baydar, D., Sara, Y., Karahan, H., Kelicen-Uğur, P., 2017. Chronic levetiracetam decreases hippocampal and testicular aromatase

expression in normal but not kainic acid-induced experimental model of acute seizures in rats. *Neuroreport* 28, 903–909.

Desai, K.B., Ribbens, W.J., Taylor, G.J., 1996. Incidence of five common fracture types in an institutional epileptic population. *Injury* 27, 97–100.

Erbaş, O., Öltulu, F., Yılmaz, M., Yavaşoğlu, A., Taşkıran, D., 2016. Neuroprotective effects of chronic administration of levetiracetam in a rat model of diabetic neuropathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 114, 106–116.

Fekete, S., Simko, J., Gradosova, I., Malakova, J., Zivna, H., Palicka, V., Zivny, P., 2013. The effect of levetiracetam on rat bone mass, structure and metabolism. *Epilepsy Res.* 107, 56–60.

Fitzpatrick, L.A., 2004. Pathophysiology of bone loss in patients receiving anticonvulsant therapy. *Epilepsy Behav.* 5, S3–S15.

Gidal, B.E., Sheth, R.D., Magnus, L., Herbeuval, A.F., 2003. Levetiracetam does not alter body weight: analysis of randomized, controlled clinical trials. *Epilepsy Res.* 56, 121–126.

Gradosova, I., Zivna, H., Palicka, V., Hubena, S., Svejtkovska, K., Zivny, P., 2012. Protective effect of atorvastatin on bone tissue in orchidectomized male albino Wistar rats. *Eur. J. Pharmacol.* 679, 144–150.

Gradosova, I., Zivna, H., Svejtkovska, K., Palicka, V., Tichy, A., Zivny, P., 2011. The role of atorvastatin in bone metabolism in male albino Wistar rats. *Pharmazie* 66, 606–610.

Hakami, T., O'Brien, T.J., Petty, S.J., Sakellarides, M., Christie, J., Kantor, S., Todaro, M., Goredik, A., Seibel, M.J., Yerra, R., Wark, J.D., 2016. Monotherapy with levetiracetam versus older AEDs: a randomized comparative trial of effects on bone health. *Calcif. Tissue Int.* 98, 556–565.

Hamed, S.A., Moussa, E.M., Youssef, A.H., Abd ElHameed, M.A., NasrEldin, E., 2014. Bone status in patients with epilepsy: relationship to markers of bone remodeling. *Front. Neurol.* 5, 142.

Kim, J.H., Cho, H.T., Kim, Y.J., 2014. The role of estrogen in adipose tissue metabolism: insights into glucose homeostasis regulation. *Endocr. J.* 61, 1055–1067.

Koo, D.L., Joo, E.Y., Kim, D., Hong, S.B., 2013. Effects of levetiracetam as a monotherapy on bone mineral density and biochemical markers of bone metabolism in patients with epilepsy. *Epilepsy Res.* 104, 134–139.

Lancelin, F., Franchon, E., Kraoul, L., Garcia, I., Brovedani, S., Tabauti, K., Landré, E., Chassoux, F., Paubel, P., Piketty, M.L., 2007. Therapeutic drug monitoring of levetiracetam by high-performance liquid chromatography with photodiode array ultraviolet detection: preliminary observations on correlation between plasma concentration and clinical response in patients with refractory epilepsy. *Ther. Drug Monit.* 29, 576–583.

Moon, J., Lee, S.T., Choi, J., Jung, K.H., Yang, H., Khalid, A., Kim, J.M., Park, K.I., Shin, J.W., Ban, J.J., Yi, G.S., Lee, S.K., Jeon, D., Chu, K., 2014. Unique behavioral characteristics and microRNA signatures in a drug resistant epilepsy model. *PLoS One* 9, 2008. How can antiepileptic drugs affect bone mass, structure and metabolism? Lessons from animal studies. *Seizure* 17, 187–191.

Peyri, A., Weichert, N., Kühl, J.S., Ebell, W., Hermáiz, Driever, P., 2015. Levetiracetam as a possible cause of secondary graft failure after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 19, 75–77.

Phabphal, K., Geater, A., Limapichat, K., Sathirapanya, P., Setthawatcharawanich, S., Leelawattana, R., 2013. Effect of switching hepatic enzyme-inducer antiepileptic drug to levetiracetam on bone mineral density, 25 hydroxyvitamin D, and parathyroid hormone in young adult patients with epilepsy. *Epilepsia* 54, 94–98.

Reimers, A., 2014. New antiepileptic drugs and women. *Seizure* 23, 585–591.

Shen, C., Chen, F., Zhang, Y., Guo, Y., Ding, M., 2014. Association between use of anti-epileptic drugs and fracture risk: a systematic review and meta-analysis. *Bone* 64, 246–253.

Shetty, A.K., 2013. Prospects of levetiracetam as a neuroprotective drug against status epilepticus, traumatic brain injury, and stroke. *Front. Neurol.* 4 (172–172).

Svalheim, S., Røste, L.S., Nakken, K.O., Taubøll, E., 2011. Bone health in adults with epilepsy. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 191, 89–95.

Svalheim, S., Taubøll, E., Surdova, K., Ormel, L., Dahl, E., Aleksandersen, M., McNeilly, A., Gjerstad, L., Ropstad, E., 2008. Long-term levetiracetam treatment affects reproductive endocrine function in female Wistar rats. *Seizure* 17, 203–209.

Wheatler, G., Elshahaly, M., Tuck, S.P., Datta, H.K., van Laar, J.M., 2013. The clinical utility of bone marker measurements in osteoporosis. *J. Transl. Med.* 11, 201.