

# Wpływ agonisty receptorów adrenergicznych $\beta_2$ – clenbuterolu na mineralizację kości piszczelowej szczura w warunkach ustalonej osteopenii

RADOSŁAW P. RADZKI, MAREK BIEŃKO, MAŁGORZATA KAPICA,  
IWONA PUZIO, PIOTR DOBROWOLSKI\*\*, RAFAŁ FILIP\*

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

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

\*\*Zakład Anatomii Porównawczej i Antropologii Instytutu Biologii UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

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

## Effect of $\beta_2$ -adrenergic receptor agonist clenbuterol on the mineralization of tibiae in rats with established osteopenia

### Summary

The purpose of the study was to determine the effect  $\beta_2$ -adrenergic receptor agonist–clenbuterol on tibiae mineralization of female rats with established osteopenia. The experiments were conducted on 30 female 3-months-of-age Wistar rats with an initial body weight of about 250 g. The sham-operation – SHO (n=10) and bilateral ovariectomy – OVX (n=20) were performed. After 60 days of osteopenia induction the ovariectomized rats were divided into a group fed a standard diet (n=10) and a group that received a diet supplied with clenbuterol at a dose of 5 mg/kg. After 14 days of the experiment the tibiae was isolated and tested using a DEXA densitometer, peripheral quantitative computer tomography (pQCT) and three-point bending test. The obtained results proved that a 14 day period of clenbuterol treatment significantly increased mechanical properties content and mineral density, both planar (BMD) and volumetric (vTotBMD) of the tibiae of ovariectomized rats.

**Keywords:** clenbuterol, adrenoreceptors, rats, bone biomechanics

Clenbuterol (4-amino-a-[(*tert*-butylamino)methyl] 3,5-dichlorobenzyl) cechuje się wysoką specyficznością do receptorów adrenergicznych typu  $\beta_2$ . Dzięki sympatykomimetycznym właściwościom, clenbuterol wykorzystano w terapii schorzeń układu oddechowego (3, 19). Stymulacja receptorów  $\beta_2$ -adrenergicznych wpływa również istotnie na wzrost syntezy białek przy jednoczesnym obniżeniu odkładania tkanki tłuszczowej, co zapoczątkowało jego użycie jako dopingu w sporcie (2, 6) oraz stymulatora wzrostu w produkcji zwierzęcej wielu gatunków zwierząt (4, 12). Z drugiej jednak strony zaobserwowano, że stymulacja receptorów adrenergicznych typu  $\beta_2$  hamuje zanik mięśni po urazach, odnerwieniu oraz w przebiegu długotrwałego unieruchomienia (1, 15). Duncan i wsp. stwierdzili istotny wpływ clenbuterolu na zwiększoną gęstość włókien kolagenowych wokół naczyń krwionośnych, a także lewej komory serca szczurów (7). Badania innych autorów dowodzą istotnego wpływu stymulacji  $\beta_2$ -adrenoreceptorów na wzrost stężenia IGF-I – cytokiny pełniącej kluczową rolę w procesie formowania tkanki kostnej (13, 23).

Celem badań było określenie wpływu agonisty receptorów  $\beta_2$ -adrenergicznych clenbuterolu na mineralizację kości piszczelowej szczurów w warunkach ustalonej osteopenii, indukowanej obustronną ovariectomią.

### Materiał i metody

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej w Lublinie nr 207/2001. Badania prowadzono na 30 samicach szczurów rasy Wistar o masie ciała ok. 250 g. Zwierzęta utrzymywano w typowych dla tego gatunku warunkach ze stałym dostępem do wody i paszy LSM, standardowo stosowanej w hodowli zwierząt laboratoryjnych (Agropol Motycz, Polska). Po siedmiodniowej aklimatyzacji zwierzęta podzielono na grupy, u których wykonano operację pozorną – SHO (n = 10) lub ovariectomię – OVX (n = 20). Zabiegi operacyjne wykonano w znieczuleniu ogólnym. Operację rzekomą wykonano z cięcia w linii białej. Jajniki wyizolowano, a następnie nietknięte reponowano. W przebiegu ovariectomii wyizolowane jajniki usunięto. Po sześćdziesięciodniowym okresie indukcji osteopenii grupę ovariectomizowanych szczurów podzielono wtórnie na zwierzęta otrzymujące dietę standardową LSM (OVX/S) oraz dietę

LSM z dodatkiem clenbuterol (Sopharma, Bulgaria) w dawce 5 mg/kg paszy (OVX/Cl). Zwierzęta grupy pozornie operowanej otrzymywały dietę standardową (SHO/S). Po 14 dniach zwierzęta usypiano w CO<sub>2</sub>. Bezpośrednio po eutanazji izolowano kości obie piszczelowe.

**Analiza materiału kostnego.** Zawartość minerału (BMC) oraz powierzchniową gęstość mineralną (BMD) kości piszczelowej oceniono aparatem Norland Excell Plus (Fort Atkinson WI, USA) wykorzystującym technologię skolimowanej wiązki promieniowania rentgenowskiego oraz programu umożliwiającego badanie małych zwierząt (Small Subject Scan). Urządzenie pomiarowe kalibrowano przed każdorazową serią pomiarową.

W badaniu tomograficznym, przy zastosowaniu wysokiej rozdzielczości obwodowego ilościowego tomografu komputerowego (pQCT) XCT Research SA Plus (Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim Niemcy) określono wolumetryczną (rzeczywistą) gęstość mineralną (vTotBMD), całkowitą powierzchnię kości i wskaźnik wytrzymałości mechanicznej kości (SSI) piszczelowej. Tomograficzną analizę kości piszczelowej wykonano w 50% długości kości, przy wielkości woksela 0,07 mm i prędkości skanowania 4 mm/min. Współczynnik progowy określono na poziomie 0,900 cm<sup>-1</sup>. Ocenę wytrzymałościową, uzyskaną w badaniu tomograficznym, uzupełniono o analizę mechaniczną kości w oparciu o trójpunktowy test ugięcia z wykorzystaniem aparatu obciążeniowego Instron 4302 (18). Kości charakteryzowano takimi parametrami wytrzymałościowymi, jak wartością siły maksymalnej oraz wartością siły w punkcie przekraczania granicy sprężystości. Uzyskane wyniki przeliczono na moment siły  $F \cdot L/4$  (F – działająca siła; L – odległość pomiędzy punktami podporu), a wartości wyrażono jako N • mm.

**Ocena statystyczna wyników.** Uzyskane wyniki przedstawiono jako średnią ± SEM. Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o test t-Studenta dla zmiennych niepowiązanych, wykorzystując program Statystyka 5.0 StatSoft, Inc.

## Wyniki i omówienie

Liczne badania dowodzą obecności receptorów  $\alpha$  i  $\beta$  adrenergicznych na osteoblastach, jak i osteoklastach. Stymulacja  $\alpha_1$ -adrenoreceptorów zwiększa aktywność fosfatazy zasadowej w komórkach linii osteoblastycznej MC3T3E1 (22). Kellenberger i wsp. obserwowali, że po podaniu isoproterenolu następuje wzrost aktywności cykazy adenylowej w tkance kostnej, w izolowanych komórkach kostnych, jak również w osteoblastopodobnych liniach komórek ROS 17/2.8 i SaOS-2, co potwierdza istotną rolę receptorów  $\beta$ -adrenergicznych w metabolizmie tkanki kostnej (10). Efektem wzrostu aktywności cykazy adenylowej jest wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia cAMP, który pełni kluczową rolę jako przekaźnik informacji II-go rzędu w przebiegu stymulacji receptorów adrenergicznych (9, 16).

Estrogeny pełnią kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy tkanki kostnej, wyrażającej się zrównoważeniem procesów jej formowania, uwarunkowanego aktywnością

osteoblastów oraz osteoklastyczną osteolizą. W ciągu roku przebudowie ulega ok. 25% tkanki kostnej gąbczastej i od 2% do 6% kości korowej (14). Tempo metabolizmu tkanki kostnej, o ujemnym bilansie, ulega zintensyfikowaniu w warunkach niedoborów hormonalnych, wynikających z niedoczynności gonad (menopauza i andropauza) lub całkowitego braku wydzielania hormonów płciowych po gonadektomii (5). Szeroko opisywanym efektem braku wpływu hormonów jajnikowych jest przyrost masy ciała, obserwowany zarówno u zwierząt doświadczalnych, jak i pomenopauzalnych kobiet (17, 21). Również wyniki naszych badań potwierdzają te obserwacje. Masa ciała owariektomizowanych samic (OVX/S) była statystycznie istotnie większa w porównaniu do samic, u których wykonano operacje rzekome (SHO/S) (323,64 g ± 6,72 vs. 350,58 g ± 5,92) (p < 0,05). Masa ciała szczurów otrzymujących przez okres 14 dni paszę standardową wzbogaconą o clenbuterol była najwyższa i wynosiła 404,02 g ± 6,54 (p < 0,05) (tab. 1). Owariektomizowane szczury otrzymujące clenbuterol cechowały się statystycznie większą masą kości piszczelowej w porównaniu do grup SHO/S oraz OVX/S (p ≤ 0,05) (tab. 1). Podobna tendencja zmian dotyczyła długości badanych kości (tab. 1).

Współcześnie denzytometryczna ocena materiału kostnego, wykorzystująca metodę podwójnej absorpcji promieniowania Rtg, jest uznanym standardem w badaniach stanu czynnościowego układu kostnego. Po 74 dniach braku wpływu hormonów gonadalnych stwierdzono statystycznie istotnie niższą powierzchniową gęstość mineralną (BMD) oraz zawartość minerału (BMC) w kości piszczelowej samic grupy OVX/S w porównaniu do SHO/S (tab. 2). Zastosowanie diety wzbogaconej o clenbuterol istotnie zwiększyło wartości tych

**Tab. 1** Masa ciała, długość i masa kości piszczelowej. Wartości przedstawiają  $\bar{x} \pm S.E.M.$  (n = 10)

	SHO/S	OVX/S	OVX/Cl
Masa ciała (g)	323,64 ± 6,72 <sup>a</sup>	350,58 ± 5,92 <sup>b</sup>	404,02 ± 6,54 <sup>c</sup>
Masa kości (g)	1,07 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,12 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,04 <sup>b</sup>
Długość kości (mm)	39,90 ± 0,12 <sup>a</sup>	42,70 ± 0,10 <sup>a</sup>	46,67 ± 0,21 <sup>b</sup>

Objaśnienie: a, b, c – różne litery oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami w kolumnach (p ≤ 0,05)

**Tab. 2** Gęstość i zawartość minerału tkanki kostnej analizowana metodą DEXA oraz rzeczywista, wolumetryczna gęstość mineralna, wskaźnik wytrzymałości oraz pole przekroju poprzecznego trzonu kości piszczelowej zwierząt grup kontrolnych i doświadczalnej. Wartości przedstawiają  $\bar{x} \pm S.E.M.$  (n = 10)

	SHO/S	OVX/S	OVX/Cl
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0,173 ± 0,002 <sup>a</sup>	0,148 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,168 ± 0,003 <sup>a</sup>
BMC (g)	0,361 ± 0,005 <sup>a</sup>	0,332 ± 0,002 <sup>b</sup>	0,354 ± 0,004 <sup>a</sup>
vTotBMD (mg/cm <sup>3</sup> )	1543,42 ± 10,1 <sup>a</sup>	1202,63 ± 13,5 <sup>b</sup>	1420,51 ± 11,2 <sup>a</sup>
SSI (mm <sup>3</sup> )	6,15 ± 0,09 <sup>a</sup>	4,62 ± 0,04 <sup>b</sup>	5,57 ± 0,06 <sup>a</sup>
Pole przekroju poprzecznego (mm <sup>2</sup> )	15,33 ± 0,06 <sup>a</sup>	11,45 ± 0,03 <sup>b</sup>	13,31 ± 0,09 <sup>c</sup>

Objaśnienie: jak w tab. 1.

parametrów w porównaniu do grupy OVX/S o 13,5% (BMD) ( $p \leq 0,05$ ) oraz 6,6% (BMC) ( $p \leq 0,05$ ).

Obwodowa ilościowa tomografia komputerowa (pQCT) jest współcześnie najnowocześniejszym podejściem metodycznym umożliwiającym nieinwazyjne pomiary gęstości, geometrii i struktury wewnętrznej wybranych rejonów kośćca obwodowego (11, 20). Komputerowa ocena kości umożliwia również pomiary wskaźnika wytrzymałości mechanicznej (SSI – Strength Strain Index), a poprzez to przyżyciową ocenę ryzyka złamań w przebiegu schorzeń metabolicznych kośćca o różnej etiologii (8). Wolumetryczna, całkowita gęstość mineralna kości piszczelowej (vTotBMD) owariotomizowanych szczurów wykazała statystycznie istotny spadek wartości w porównaniu do wartości uzyskanych w grupie SHO/S ( $1202,63 \pm 13,5 \text{ mg/cm}^3$  vs.  $1543,42 \pm 10,1 \text{ mg/cm}^3$ ) ( $p \leq 0,05$ ). Zastosowanie diety z dodatkiem clenbuterolu zwiększyło wartość tego parametru w porównaniu do grupy OVX/S o 18,1% ( $p \leq 0,05$ ) (tab. 2). Brak oddziaływania hormonów jajnikowych zaznaczył się również obniżeniem pola przekroju poprzecznego, które u OVX/S samic było 33,9% ( $p \leq 0,05$ ) mniejsze niż u pozornie operowanej kontroli. Clenbuterol podawany przez 14 dni zwiększył wartość tego parametru w porównaniu do grupy OVX/S o 16,2% ( $p \leq 0,05$ ), lecz mimo to pole przekroju poprzecznego było statystycznie istotnie niższe niż w kości piszczelowej samic grupy SHO/S ( $p \leq 0,05$ ) (tab. 2). Komputerowa analiza trzonu kości piszczelowej wykazała niższe wartości wskaźnika wytrzymałości mechanicznej (SSI) kości piszczelowej szczurów z ustaloną osteopenią w porównaniu do pozornie operowanej kontroli ( $4,62 \pm 0,12 \text{ mm}^3$  vs.  $6,15 \pm 0,09 \text{ mm}^3$ ) ( $p \leq 0,05$ ). Średnia wartość SSI u owariotomizowanych samic otrzymujących przez 14 dni clenbuterol wynosiła  $5,57 \pm 0,10 \text{ mm}^3$  i była blisko 20% wyższa niż w kości piszczelowej owariotomizowanych samic żywnych dietą standardową. Badanie tomograficzne uzupełnione zostało oceną wytrzymałości tkanki kostnej w oparciu o trójpunktowy test ugięcia. Uzyskane wyniki potwierdzają korzystny wpływ agonisty receptorów  $\beta_2$ -adrenergicznych na siłę maksymalną oraz granicę sprężystości badanych kości w porównaniu do grupy owariotomizowanych samic wolnych od clenbuterolu ( $p \leq 0,05$ ) (tab. 3).

Podsumowując, układ adrenergiczny pełni istotną rolę w metabolizmie tkanki kostnej. Wyrazem tej aktywności są efekty 14-dniowego stosowania clenbuterolu, polegające na wzroście wytrzymałości mechanicznej oraz

**Tab. 3. Siła maksymalna oraz granica sprężystości trzonu kości piszczelowej zwierząt grup kontrolnych i doświadczalnych. Wartości przedstawiają  $\bar{x} \pm S.E.M.$  (n = 10)**

	SHO/S	OVX/S	OVX/CI
Siła maksymalna (N • mm)	75,33 ± 1,56 <sup>a</sup>	60,45 ± 1,10 <sup>b</sup>	84,43 ± 2,05 <sup>a</sup>
Granica sprężystości (N • mm)	43,54 ± 1,48 <sup>a</sup>	30,32 ± 1,14 <sup>b</sup>	51,11 ± 1,98 <sup>a</sup>

Objaśnienie: jak w tab. 1.

zwiększeniu zawartości minerału (BMC) i gęstości mineralnej (BMD i vTotBMD) kości piszczelowej samic szczurów z ustaloną osteopenią. Uzyskane wyniki wskazują na konieczność prowadzenia dalszych badań nad wpływem układu adrenergicznego na mineralizację kości, a także nad możliwością wykorzystania agonistów receptorów adrenergicznych, takich jak clenbuterol, w terapii i profilaktyce schorzeń metabolicznych kośćca.

## Piśmiennictwo

1. Agrawal S., Thakur P., Katoch S. S.: Beta adrenoceptor agonists, clenbuterol, and isoproterenol retard denervation atrophy in rat gastrocnemius muscle: use of 3-methylhistidine as a marker of myofibrillar degeneration. *Jpn. J. Physiol.* 2003, 53, 229-237.
2. Beckett A. H.: Clenbuterol and sport. *Lancet* 1992, 340, 1165-
3. Boyd D., O'Keefe M., Smyth M. R.: Matrix solid-phase dispersion as a multi-residue extraction technique for beta-agonists in bovine liver tissue. *Analyst.* 1994, 119, 1467-1470.
4. Brambilla G., Civitareale C., Pierdominici E., De Giovanni F., Anastasio A.: Synovial fluid as a matrix of selection in the detection of beta-adrenergic agonist drugs in carcasses and fresh meat. *Analyst.* 1994, 119, 2591-2593.
5. Compston J. E.: Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 2001, 81, 419-447.
6. Dumestre-Toulet V., Cirimele V., Ludes B., Gromb S., Kintz P.: Hair analysis of seven bodybuilders for anabolic steroids, ephedrine, and clenbuterol. *J. Forensic Sci.* 2002, 47, 211-214.
7. Duncan N. D., Williams D. A., Lynch G. S.: Deleterious effects of chronic clenbuterol treatment on endurance and sprint exercise performance in rats. *Clin. Sci. (Lond)*. 2000, 98, 339-347.
8. Ferretti J. L., Capozza R. F., Zanchetta J. R.: Mechanical validation of a tomographic (pQCT) index for noninvasive estimation of rat femur bending strength. *Bone* 1996, 18, 97-102.
9. Kazaniets M. G., Enero M. A.: Role of cyclic AMP in the release of noradrenaline from isolated rat atria. Effect of pretreatment with clenbuterol. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1992, 346, 311-314.
10. Kellenberger S., Muller K., Richener H., Bilbe G.: Formoterol and isoproterenol induce c-fos gene expression in osteoblast-like cells by activating beta2-adrenergic receptors. *Bone* 1998, 22, 471-478.
11. Macdonald H. M., Kontulainen S. A., kelvie-O'brien K. J., Petit M. A., Janssen P., Khan K. M., McKay H. A.: Maturity- and sex-related changes in tibial bone geometry, strength and bone-muscle strength indices during growth: A 20-month pQCT study. *Bone* 2005,
12. Mazzanti G., Daniele C., Boatto G., Manca G., Brambilla G., Loizzo A.: New beta-adrenergic agonists used illicitly as growth promoters in animal breeding: chemical and pharmacodynamic studies. *Toxicology* 2003, 187, 91-99.
13. Meinel L., Zoidis E., Zapf J., Hassa P., Hottiger M. O., Auer J. A., Schneider R., Gander B., Luginbuehl V., Bettschart-Wolfisberger R., Illi O. E., Merkle H. P., von R. B.: Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation. *Bone* 2003, 33, 660-672.
14. Mundy G. R., Martin T. J.: Physiology and pharmacology of bone. Springer-Verlag, Berlin 1993.
15. Navegantes L. C., Resano N. M., Baviera A. M., Migliorini R. H., Kettelhut I. C.: Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab.* 2004, 286, E642-E647.
16. Ordway G. A., O'Donnell J. M., Frazer A.: Effects of clenbuterol on central beta-1 and beta-2 adrenergic receptors of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1987, 241, 187-195.
17. Papakitsou E. F., Margioris A. N., Dretakis K. E., Trovas G., Zoras U., Lyrinis G., Dretakis E. K., Stergiopoulos K.: Body mass index (BMI) and parameters of bone formation and resorption in postmenopausal women. *Maturitas.* 2004, 47, 185-193.
18. Radzki R. P., Bienko M., Puzio I., Studziński T.: Wpływ estradiolu i tamoksifenu na właściwości fizyczne kości udowej i ramiennej kurcząt brojlerów. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 1090-1094.
19. Sander K., Deegen E., Ohnesorge B.: Influencing respiratory gas analytical lung function parameters by intravenous injection of clenbuterol in horses with chronic lung diseases. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 2002, 109, 295-299.
20. Schneider P., Reiners C., Cointny G. R., Capozza R. F., Ferretti J. L.: Bone quality parameters of the distal radius as assessed by pQCT in normal and fractured women. *Osteoporos. Int.* 2001, 12, 639-646.
21. Schoppen S., Carbajal A., Perez-Granados A. M., Vivas F., Vaquero M. P.: Food, energy and macronutrient intake of postmenopausal women from a menopause program. *Nutr. Hosp.* 2005, 20, 101-109.
22. Suzuki A., Palmer G., Bonjour J. P., Caverzasio J.: Catecholamines stimulate the proliferation and alkaline phosphatase activity of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Bone* 1998, 23, 197-203.
23. Young O. A., Watkins S., Oldham J. M., Bass J. J.: The role of insulin-like growth factor I in clenbuterol-stimulated growth in growing lambs. *J. Anim. Sci.* 1995, 73, 3069-3077.

Adres autora: dr Radosław P. Radzki, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: radoslaw.radzki@ar.lublin.pl