

Antioksidativni i fitoestrogeni učinak ikarina na osteoporozi štakora izazvanu retinoičnom kiselinom

Tarabene, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:550706>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Matea Tarabene

ANTIOKSIDATIVNI I FITOESTROGENI UČINAK IKARINA
NA OSTEOPOROZU ŠTAKORA IZAZVANU RETINOIČNOM
KISELINOM

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na Zavodu za animalnu fiziologiju, pod vodstvom dr.sc. Nada Oršolić, red. prof. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

ANTIOKSIDATIVNI I FITOESTROGENI UČINAK IKARINA NA OSTEOPOROZU ŠTAKORA IZAZVANU RETINOIČNOM KISELINOM

Matea Tarabene

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Osteoporoza je bolest koštanog tkiva koju karakterizira smanjenje mase kostiju što ih čini podložnijima lomovima. Brojni podaci ukazuju da flavonoidi uključujući ikarin imaju snažna antioksidativna, fitoestrogenska i antiosteoporotska svojstva. Temeljem navedenog glavni ciljevi ovog istraživanja bili su: (i) izazvati osteoporozu kod štakora visokim dozama retinoične kiseline (model osteoporoze; RMO), (ii) utvrditi učinak ikarina kao terapija osteoporoze u RMO, (iii) usporediti učinak ikarina s komercijalnim lijekom – alendronatom, (iv) istražiti antioksidativnu sposobnost ikarina na stanicama jajnika, (v) utvrditi učinak ikarina na koštani sustav RMO i zdravih štakora te (vi) usporediti genotoksičnost ikarina i alendronata na RMO i zdravim štakorima. Rezultati ukazuju da ikarin povećava masu kostiju i maternice kao i mineralnu gustoću kostiju kroz antioksidativnu i estrogensku aktivnost. Ikarin pokazuje manji genotoksični učinak od alendronata.

76 stranice, 25 grafičkih priloga, 2 tablice, 155 bibliografskih referenci; izvornik na hrvatskom jeziku

Rad je pohranjen u Centralnoj biološkoj biblioteci Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb, Hrvatska.

Ključne riječi: ikarin, retinoična kiselina, osteoblasi, osteoklasti, estrogen, oksidativni stres

Voditelj: Dr.sc. Nada Oršolić, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Petra Korać, doc.

Dr. sc. Sunčica Bosak, doc.

Rad prihvaćen: 13.09.2017

ANTIOXIDATIVE AND PHYTOESTROGEN EFFECTS OF ICARIIN ON RETINOIC ACID INDUCED OSTEOPOROSIS IN RATS

Matea Tarabene
Rooseveltovej trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Osteoporosis is a bone disease characterized by low bone mass which makes the bones susceptible to fractures. Icariin is a type of flavonoid that promotes osteocyte differentiation and inhibits the formation of osteoclasts which lowers the bone resorption rate. Numerous data indicate that flavonoids including icariin have strong antioxidant, phytoestrogen and antiosteoporotic properties. The main objectives of this thesis are: (i) promoting osteoporosis in rats with high dose of retinoic acid, (ii) evaluating icariin's ability as a therapeutic in RMO, (iii) comparing the effects of icariin to a commercial drug-alendronate, (iv) investigating icariin's antioxidative abilities on the ovaries, (v) assessing icariin's effect on the skeletal system of RMO and healthy rats as well as (vi) comparing the genotoxicity of icariin and alendronate in RMO and healthy rats. Our results indicate that icariin increases bone mass and mass of uterus, as well as bone mineral density through antioxidant and estrogenic activity. Icariin shows smaller genotoxic effects of alendronate.

76 pages, 25 figures, 2 tables, 155 references; original in Croatian

Thesis deposited in Central Biological Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia.

Keywords: icariin, retinoic acid, osteoblasts, osteoclasts, estrogen, oxidative stress

Supervisor: Nada Oršolić, Ph D, Full Professor

Reviewers: Petra Korać, Ph D, Asst. Prof.

Sunčica Bosak, Ph D, Asst. Prof.

Thesis accepted: 13.09.2017.

1.Uvod.....	1
1.1. Koštano tkivo.....	1
1.2. Proces remodeliranja kostiju.....	1
1.2.1. Osteoblasti.....	2
1.2.2. Osteoklasti.....	3
1.3. Markeri remodeliranja kostiju.....	7
1.3.1. Biljezi pregradnje kostiju.....	7
1.3.2. Biljezi razgradnje kostiju.....	10
1.4. Osteoporoza.....	13
1.4.1.Signalni put OPG/RANK/RANKL	16
1.4.2. Utjecaj fitoestrogena na osteoporozu.....	17
1.4.3. Utjecaj oksidativnog stresa na osteoporozu.....	19
1.5. Retinoična kiselina.....	21
1.6. Fitoestrogeni.....	22
1.6.1.Flavonoidi.....	22
1.6.2. Ikarin.....	24
1.7. Alendronat.....	25
2. Materijali i metode.....	26
2.1. Materijali	26
2.1.1. Životinje	26
2.1.2. Reagensi	26
2.2. Plan pokusa.....	27
2.3. Metode.....	27
2.3.1. Praćenje promjene mase životinja.....	27
2.3.2. Uzimanje uzoraka.....	28
2.3.3. Mjerenje mase maternice.....	28
2.3.4. Mjerenje mineralne gustoće kostiju.....	28
2.3.5. Određivanje ukupnih proteina po Lowry-ju	29
2.3.6. Mjerenje lipidne peroksidacije	29

2.3.7. Mjerenje aktivnosti glutaciona	30
2.3.8. Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze	30
2.3.9. Mjerenje aktivnosti katalaze.....	31
2.3.10. Komet test.....	32
2.3.11. Statistička obrada podataka.....	32
3. Rezultati.....	33
3.1. Promjena tjelesne mase (TM) životinja tijekom pokusa.....	33
3.2. Indeks tjelesne težine kostiju.....	34
3.3. Relativna težina bedrene kosti.....	37
3.4. Mineralna gustoća kostiju.....	40
3.5. Pokazatelji estrogenske aktivnosti.....	43
3.6. Antioksidativni učinak ikarina.....	44
3.7. Komet test.....	49
4. Rasprava.....	52
5. Zaključci.....	55
6. Literatura.....	56
7. Životopis.....	76

Vincit qui se vincit. Astra inclinant, ser non obligant.

Ovaj diplomski rad posvećujem svojim roditeljima Kristini i Vjekoslavu, baki Mariji, sestri Maji te prijateljima Ani, Jeleni, Josipu, Mateu i Petri koji su uvijek bili tu za mene; bez Vas ništa ne bi bilo moguće.

Mojoj mentorici, dr.sc. Nadi Oršolić, mogu samo zahvaliti na brizi i savjetima. Hvala Vam na uloženom trudu i vremenu, hvala što ste bili glas razuma i razumijevanja i hvala Vam što ste pristali biti dio ove priče.

Kratice korištene u tekstu

8-OH-dG	8 hidroksi 2-deoksigvanozin
13 cRA	retinoična kiselina
AOPP	napredni oksidacijski proteinski produkt
AP (BAP)	alkalna fosfataza
BMC	mineralni sastav kosti
BMD	mineralna gustoća kosti
BMP	morfogeni protein kosti
BSA	albumin iz goveđeg seruma
BSP	sijaloprotein
CAT	katalaza
CSF-1	makrofag kolonija stimulirajući factor-1
CTX	telopektidi kolagena tipa 1
DKKI-1	Dickkopf-1
DMSO	dimetil sulfoksid
DPD	deoksipiridinolin
EDTA	etilendiamintetraacetatna kiselina
ER	estrogen receptor
GSH	glutation-S-peroksidaza
IL-1, IL-6	interleukin-1, interleukin-6
MDA	malondialdehid
MMP	matriks metaloproteaza
MSCF	makrofag kolonija stimulirajući faktor
OC	osteoklacin
OHP	5-hidroksiprolin
OPG	osteoprotegerin

OVX	ovarijektomija
PBS	fosfatni pufer
PICP	karboski-terminalni propeptid
PINP	amino-erminalni propeptid
PPAR	receptori peroksisoma zaduženi za aktivaciju proliferacije
PTH	paratiroidni hormon
PU.1	transkripcijski factor SPI ₁ gena
PYD	piridinolin
RANKL	receptor aktivatora nuklearnog faktora kappa-B-ligand
RAR	receptor retinoične kiseline
RARE	elementi odgovora retinoične kiseline
RMO	retinoični model osteoporoze
ROS	reaktivne kisikove vrste
RUNX2	runt povezani transkripcijski factor 2
SDS	natrijev dodecil sulfat
SOD	superoksid dismutaza
TGF-β	transkripcijski factor-β
TNB	5-tionitrobenzoična kiselina
TRAcP	tartar rezistentna kisela fosfataza
Wnt-β	Wnt-β katenin signalni put
XOD	ksantin oksidaza

1. UVOD

1.1. Koštano tkivo

Koštano tkivo predstavlja jedan tip potpornog vezivnog tkiva koje kod odraslog organizma zamjenjuje hrskavično tkivo, karakteristično za stadij embrija. Minerali kalcija (Ca) nalaze se unutar organskog matriksa pružajući čvrstoću kostima.

Kolagen je glavna komponenta matriksa koji formira jedinstvene mreže između stanica te, kao i Ca, pruža čvrstoću kostima (Golub 2009). Postoji preko 20 vrsta kolagena (Ricard-Blum i sur. 2005). Kolageni se tradicionalno klasificiraju na one koji su više zastupljeni (tip I, II i III) i na one koji su manje zastupljeni (tip V i XI). Strukturu kolagena čini trostruka helikalna regija s Gly-X-Y ponavljanjima (Gordon i sur. 2010). Većina organskog matriksa kosti (otprilike 95%) otpada na kolagen tipa I. Primarna struktura kolagena tipa I u kosti slična je onoj u koži, ali sadrži određene sekundarne posttranslacijske modifikacije koje ga kemijski čine različitim od onoga u koži (Simon 2007). Pokazalo se da promjene u biosintezi kolagena, prouzrokovane mutacijama u kolagenskim genima, mogu rezultirati brojnim bolestima kostiju kao što su bolesti krhkih kostiju (engl. *osteogenesis imperfecta*) (mutacija u kolagenu tipa I), ahondrogeneza tipa II (mutacija u kolagenu tipa II) te Kniest i Stickler sindrom, genetički poremećaj vezivnog tkiva kojeg karakteriziraju facijalne abnormalnosti te problemi s vidom, sluhom i zglobovima (Goyal i sur. 2016).

U konačnom izgledu kostiju važnu ulogu igraju stanice osteoblasta i osteoklasta koje će biti detaljnije opisane u daljnjem tekstu. Brojne su stanice, uključujući monocite, makrofage i fibroblaste, u kontaktu s endotelnom površinom kostiju stoga i one utječu na aktivnost osteoblasta i osteoklasta (Rodan 1992).

1.2. Proces remodeliranja kostiju

Proces remodeliranja kostiju uključuje razgradnju stanica s jedne površine te formiranje novih na drugoj, obližnjoj, površini. Te dvije specifične radnje, razgradnja i pregradnja kostiju, izvode se pomoću specijaliziranih stanica koje su vremenski i prostorno povezane (Rodan 1992).

1.2.1. Osteoblasti

Osteoblasti su kubične stanice okruglaste stanične jezgre, smještene na koštanoj površini u jednom sloju (Slika 1). Osteoblasti imaju izražena Golgijeva tijela i hrapavu endoplazmatsku mrežicu (Mackie 2003). Osteoblasti sintezom organskog matriksa, kojem prethodi proces mineralizacije, formiraju kosti. U prvom redu su to proteini povezani s kolagenom tipa I, a osim njih sintetiziraju se i ne-kolagenski proteini kao što je osteokalcin (Shetty i sur. 2016). Osteokalcin sadrži g-karboksiglutaminsku kiselinu i ovisan je o vitaminu K te zajedno s ostalim ne-kolagenskim proteinima igra važnu ulogu u staničnoj adheziji i kemotaksiji (Zhang i sur. 2016). Sudbina zrelog osteoblasta je trojaka: može postati obložna stanica, osteocit ili može odumrijeti apoptozom (Weinstein i sur. 2000). Osteoblasti nisu samo stanice odgovorne za stvaranje kostiju već imaju i brojne druge uloge. Oni održavaju stanje hematopoeze promovirajući okoliš koji pogoduje sintezi krvotvornih matičnih stanica.

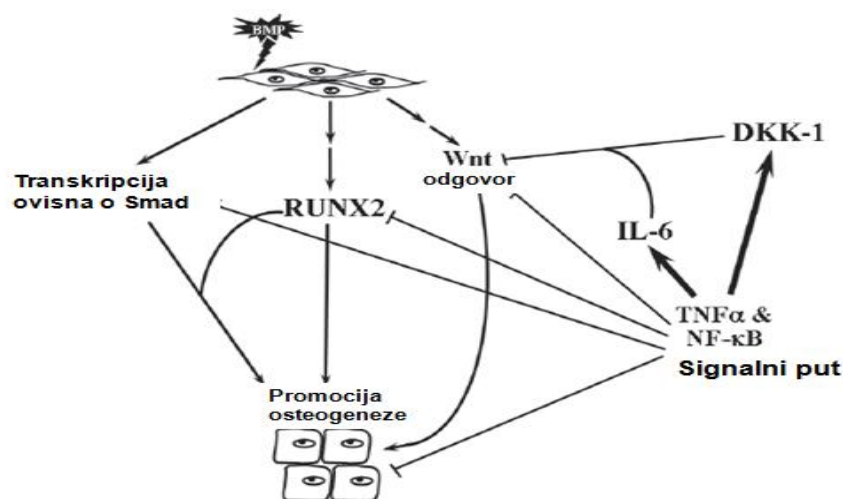


Slika 1. Osteoblasti na histološkom presjeku

Preuzeto s: http://www.mhhe.com/biosci/ap/histology_mh/spbonel.jpg

Wnt signalni put jedan je od nekolicine kaskadnih puteva važnih za formaciju kostiju. Diferencijaciju osteoblasta inducira morfogeni protein kosti (BMP) koji pripada superobitelji transformacijskih faktora rasta- β (TGF- β). Wnt/ β -katenin signalni put regulira diferencijaciju, proliferaciju i aktivnost osteoblasta dok ujedno blokira apoptozu. β -katenin inhibira osteoklastogenezu povećavanjem udjela osteoprotegerina (OPG)/RANKL (Krishnan i sur. 2006). U zdravom koštanom tkivu omjer pregradnje i razgradnje kostiju je u ravnoteži međutim upalni procesi dovode do neravnoteže između ta dva procesa. Pregradnja kostiju ovisi i o TNF-ovisnoj ekspresiji Dickkopf-1 (DKK-1), koji suprimira Wnt signal. Razgradnja

kostiju je pod utjecajem RANKL faktora, ključnog faktora u diferencijaciji i aktivaciji osteoklasta. DKK-1 je nužan kod remodeliranja zglobova, a ukoliko je blokiran dovodi do konstitutivne aktivacije Wnt signalnog puta i pregradnje kostiju (Diarra i sur. 2007). Interleukin-6 (IL-6) zajedno s $\text{TNF-}\alpha$ inhibira aktivnost Wnt signalnog puta (Slika 2). IL-6 također igra značajnu ulogu u upalnim procesima u zglobovima gdje djeluje zajedno s DKK-1, ali sam mehanizam djelovanja još nije u potpunosti poznat (Malysheva i sur. 2016).

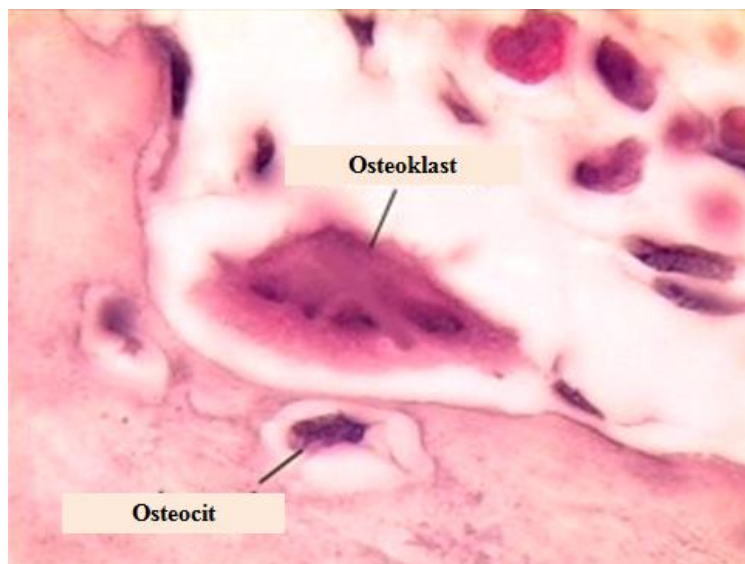


Slika 2. Utjecaj interakcije IL-6 kod remodeliranja zglobova s Wnt signalnim putem. Upala inhibira BMP-Smad odgovor i aktivnost ciljnoga gena RUNX2, koji je važan u diferencijaciji osteoblasta. $\text{TNF-}\alpha$ inducira ekspresiju IL-6 i DKK-1, a njihova kooperacija utječe na Wnt signalni put.

Preuzeto i prerađeno prema radu: Malysheva i sur. 2016.

1.2.2. Osteoklasti

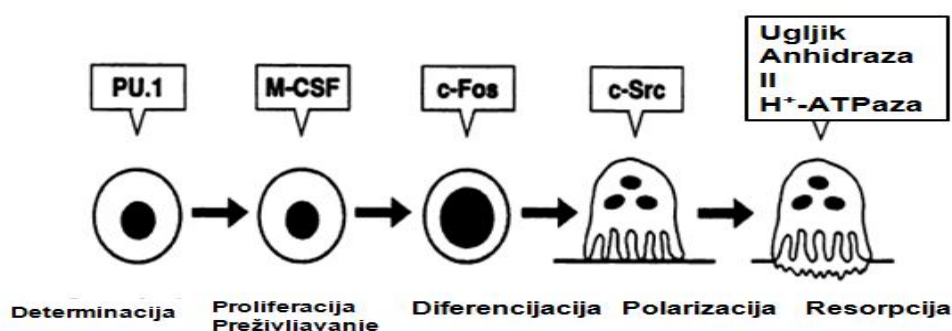
Osteoklasti su stanice koje razgrađuju kosti (Slika 3), a odlikuje ih veliki broj jezgara, polarnost i velika masa. Membrana stanica nalazi se u blizini površine kostiju gdje sudjeluje u održavanju ionskih crpki (Matsumoto i sur. 2014). Membrana koja je u kontaktu s kostima sadrži kontraktilne proteine kao što je aktin. Periferni rub stanica membrane zajedno s površinom kosti čini “zonu brtvljenja”. Stanice se vežu za matriks pomoću integrinskih receptora (Yavropoulou i sur. 2016). Razgradnja se događa u toj zoni. Osteoklasti nastaju iz istih stanica kao i makrofagi; fagocitiraju otpadne produkte i stvaraju citokine (Katz i sur. 2010). Za citokine se pokazalo da povećavaju razinu sinteze osteoklasta, njihovu diferencijaciju i funkciju (Canalis i sur. 1991).



Slika 3. Osteoklasti na histološkom prikazu

Preuzeto s: http://www.mhhe.com/biosci/ap/histology_mh/osteocll.jpg

Sam proces je reguliran mijeloidnim i B limfoidnim transkripcijskim faktorom PU.1, koji, ukoliko je mutiran, ne generira makrofage i osteoklaste čime dolazi do razvoja sklerotskih bolesti (Tondravi i sur. 1996). Ekspresija idućeg faktora CSF-1 ovisi o PU.1 te ukoliko je on mutiran dolazi do razvoja nefunkcionalnih prekursora osteoklasta (Kodama i sur. 1991). Prije se vjerovalo da samo c-fos dovodi do osteoklastogeneze. Naime, on djeluje na povećanje sinteze makrofaga, a smanjuje sintezu osteoblasta te na taj način sudjeluje u diferencijaciji prekursora osteoklasta (Grigoriadis i sur. 1994). Ostali faktori koji pridonose razvoju osteoporoze uključuju mutacije c-src i nedostatak funkcionalne H^+ -ATPaze kao i nedostatak Ugljikove anhidraze II. koja sudjeluje u procesima razgradnje kostiju (Felix i sur. 1990). PU.1 dovodi do kaskadnog procesa koji u konačnici vodi do razgradnje kostiju (Slika 4).



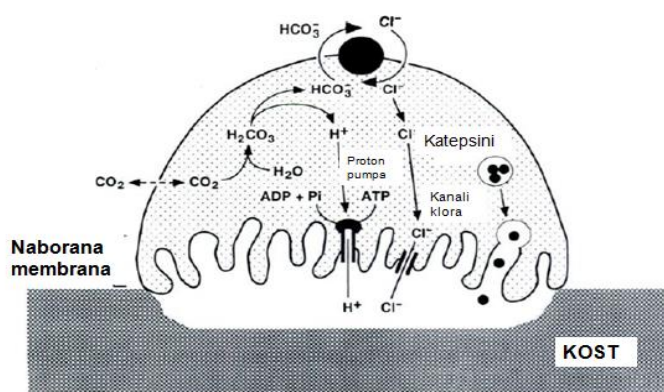
Slika 4. Proces razgradnje kostiju. Proces je kaskadni put reguliran s transkripcijskim faktorom PU.1 koji aktivira nizvodne faktore kao što je factor rasta CSF-1 koji regulira

proliferaciju i preživljavanje prekursora osteoklasta. C-fos utječe na diferencijaciju odnosno stvaranje zrelih osteoklasta. C-src dovodi do polarizacije osteoklasta s kosti, dok Ugljikova anhidraza II. i H^+ -ATPaza utječu na proces razgradnje kostiju.

Preuzeto iz rada: Teitelbaum i sur. 1997.

Minerali iz kostiju se počinju razgrađivati nakon smanjenja pH vrijednosti u okolišu osteoklasta potom slijedi demineralizacija enzimima (pH optimum pri 4,5; Blair i sur. 1986). H^+ -ATPaza ima karakteristike protonske crpke koja čini okoliš između osteoklasta i matriksa kiselim (Blair i sur. 1989).

Proces (Slika 5) započinje nakon što se pod utjecajem Ugljikove anhidraze II. hidratizira ugljikov IV oksid (CO_2) u ugljičnu kiselinu (H_2CO_3) koja potom disocira na vodikove (H^+) i bikarbonatne ione (HCO_3^-). Izlučivanje protona u naboranu membranu aktivan je proces kojeg katalizira hidroliza adenozin trifosfata (ATP). Izmjena HCO_3^- s kloridnim ionima (Cl^-) iz izvanstaničnog prostora ne ovisi o ATP-u (Teti i sur. 1989). Crpke se uspostavljaju nakon što prekursori osteoklasta stupe u kontakt s površinom kostiju dok je izmjena iona pod utjecajem H^+ -ATPaza (Teitelbaum i sur. 1997).



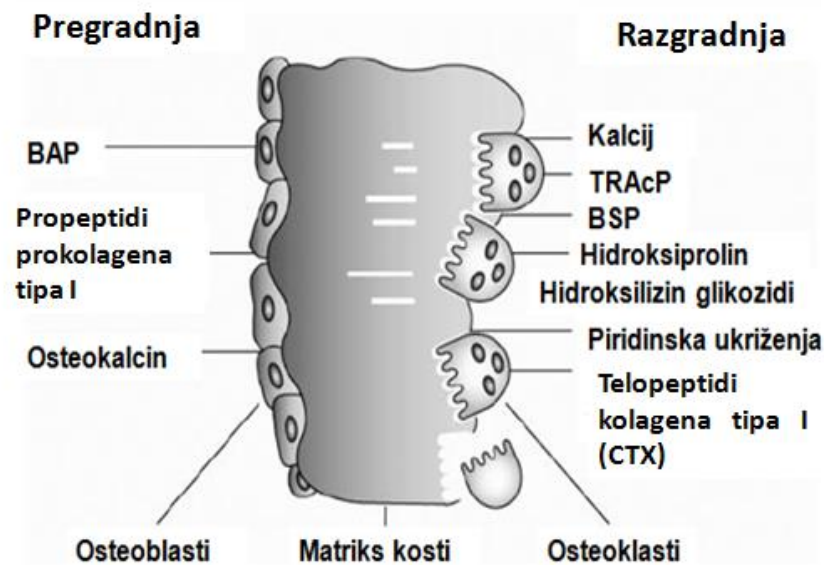
Slika 5. Model razgradnje kostiju. Osteoklast se veže za površinu kosti što promovira nastajanje naborane membrane i resorptivnog mikrookoliša ispod stanica. Klorovodična kiselina, produkt H^+ -ATPaze i Cl^- kanala, sekretira se u naboranu membranu što rezultira razgradnjom minerala. Vezikule, koje sadrže kisele kolagenolitičke enzime u formi katepsina, fuzioniraju se s membranom kostiju kako bi degradirali organski matriks. Unutarstanični pH održava se kontinuiranom pasivnom izmjenom $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ aniona ionskim crpkama na površini stanica. Preuzeto iz rada: Teitelbaum i sur. 1997.

Određeni hormoni i faktori rasta reguliraju funkcije osteoblasta i osteoklasta. Hormoni djeluju direktno na stanice ili indirektno na receptore alterirajući specifična mjesta na receptorima za koja se inače vežu signalne molekule. Paratiroidni hormoni (PTH) sudjeluju u razgradnji kostiju povećanjem sinteze osteoklasta (Kastir i sur. 2016). Kontinuirana izloženost PTH-u inhibira sintezu kolagenskog matriksa (Hock i sur. 1990).

Kalcitonin je hormon koji inhibira razgradnju kostiju djelujući direktno na receptore osteoklasta. Remodeliranje kosti održava čvrstima stvarajući ravnotežno stanje između procesa pregradnje i razgradnje (Dehghan i sur. 2016). Smatra se da je masa kostiju najveća u kasnim 20-im i ranim 30-im godinama kada su procesi pregradnje i razgradnje u ravnoteži nakon čega slijedi progresivni godišnji gubitak mase kostiju od 0,3-0,5%. Do ubrzanog gubitka mase kostiju dolazi nakon početka menopauze (Simon 2007).

1.3. Biljezi remodeliranja kostiju

Većina današnjih biljega uključuje enzimске i ne-enzimске peptide derivirane iz staničnih i ne-staničnih odjeljaka kostiju koji se uglavnom klasificiraju prema tome da li sudjeluju u procesu pregradnje ili procesu razgradnje kostiju (Slika 6).



Slika 6. Biokemijski biljezi remodeliranja kostiju.

BAP-alkalna fosfataza, TRAcP- kisela fosfataza otporna na tartar, BSP-sijaloprotein, CTX-telopeptidi kolagena tipa I

Preuzeto iz rada: Seibel 2005.

1.3.1. Biljezi pregradnje kostiju

Biljezi nastaju diferencijacijom osteoblasta, a njihova koncentracija se mjeri iz seruma ili iz plazme.

Alkalna fosfataza (AP)

AP je membranski ubikvitinski tetramerni enzim vezan preko C-terminalnog glikan-fosfatidil sidra na membrane osteoblasta (Cundy i sur. 2008). Aktivnost ovisi o različitim tkivima kao što su jetra, posteljica i kosti; 90% zastupljen kod izoformi kostiju i jetre (Clowes i sur. 2002).

Precizna funkcija enzima još je nepoznata, ali se smatra da igra važnu ulogu u formiranju osteoida i mineralizaciji kostiju (Harris 1990). Koštani i jetreni oblici AP, koji su najzastupljeniji u serumu, nastaju posttranslacijskim modifikacijama koje su vidljive kroz različiti stupanj glikozilacije tkivno nespecifičnog genskog produkta (različiti udio sijalinske kiseline i vezanih šećernih ostataka). Vrijednosti ukupne AP veće su u muškaraca nego u žena, a kao glavni uzrok se navodi suprimirajući učinak estrogena (Cundy i sur. 2008).

Osteokalcin (OC)

OC je 5,8 kDa teški, hidroksiapatit-vezujući, nekolageni protein koštanog matriksa sintetiziran od strane osteoblasta, odontoblasta i hipertrofičnih hondrocita. Jedna od glavnih karakteristika OC je gama-karboksi-glutaminska kiselinska ovisna o vitamin K (Gla) koja je odgovorana za vezanje Ca (Zhang i sur. 2016).

Iako je protein poznat preko 20 godina, njegova uloga u procesu formiranja kostiju nije do kraja poznata. Raspravlja se najviše o njegovoj ulozi u procesu mineralizacije kostiju, o ulozi glasnika za kalcitriol u razgradnji kostiju te o ulozi inhibitora leukocitne esteraze i aktivnosti faktora rasta. Klinička istraživanja su pokazala da nedostatak vitamina K može dovesti do poremećaja karboksilacije OC, što rezultira nerazmjernim povećanjem koncentracije cirkulirajućeg oblika OC u cirkulaciji (Lee i sur. 2000). Rađeni su pokusi na OC *knock-out* miševima kod kojih je zabilježena veća gustoća kostiju u odnosu na divlji tip (Ducy i sur. 1996) pa se smatralo da on sudjeluje u procesu remodeliranja kostiju preko mehanizma negativno povratne sprege.

Budući da se vrlo brzo izlučuje kroz bubrege, poluživot cirkulirajućeg OC je oko 4-5 minuta. OC i njegovi ulomci se nakupljaju i povećava im se koncentracija u serumu kada je promijenjena funkcija bubrega (Cundy i sur. 2008).

Propeptidi prokolagena tipa I

Kolagen tipa I je glavni protein koštanog matriksa (>90% sadržaja matriksa) te u manjoj mjeri kože, dentina, tetiva i brojnih drugih tkiva. Osteoblasti sintetiziraju kolagen u obliku pre-prokolagena. Prokolagen je stoga 50% duža molekula od konačnog proteina, a njegova funkcija je sprječavanje prijevremene agregacije molekule kolagena u fibrile unutar stanice (Čepelak i sur. 2009).

Karakteristika tih prekursorskih molekula je kraći amino (N-) terminalni propeptid (PINP) i duži karboksi (C-) terminalni propeptid (PICP) (Granchy i sur. 2016). Prije sazrijevanja kolagenskih fibrila C- i N-propeptidi se cijepaju s prokolagen tipa I specifičnim izvanstaničnim tkivnim endopeptidazama. PICP ima molekularnu masu od 115 kDa, stabiliziran je disulfidnim vezama, iz cirkulacije je uklonjen endotelnim stanicama jetre uz pomoć manoznog receptora pa stoga ima kratki polu-život od 6-8 minuta. PINP ima molekularnu masu od 70 kDa, bogat je prolinima i hidroksiprolinima, a iz cirkulacije je uklonjen endotelnim stanicama jetre (Čepelak i sur. 2009).

1.3.2. Biljezi razgradnje kostiju

Izuzevši kisele fosfataze otporna na tartar većina biljega razgradnje kostiju su degradacijski proizvodi kolagena tipa I. U novije vrijeme ne-kolagenski protein, kao što je sijaloprotein kosti (BSP, engl. *Bone Sialoprotein*), i osteoklast-derivirani enzimi, kao što su katepsin K i L, istraživani su kao mogući biljezi razgradnje kostiju (Seibel 2005).

Telopeptidi kolagena tipa I (CTX)

Prilikom razgradnje kolagena tipa I, N- i C-terminalni telopeptidni ulomci se otpuštaju u cirkulaciju i uklanjaju bubrezima (Garnero i sur. 2008). Koristeći imunocitokemijski postupak mjerimo količinu C-terminalnog telopeptidnog kolagena (CTX) u mokraći. Pritom se koriste monoklonska antitijela odnosno sintetski oktapeptid koji se veže za specifično mjesto na kolagenu (Glu-Lys-Ala-His-beta-Asp-Gly-Gly-Arg), nazvano beta-CTX. Trenutno se CTX smatra najučinkovitijim biljegom razgradnje kostiju (Garnero i sur. 2008).

5-Hidroksiprolin (OHP)

OHP nastaje posttranslacijskom hidroksilacijom prolina te čini 12-14% svih amino kiselina zastupljenih u zreom kolagenu. Većina OHP nastaje u jetri tijekom procesa razgradnje kostiju (Lowry i sur. 1985) nakon čega se izlučuje u urin. Njegova koncentracija u urinu je direktno proporcionalna količini razgrađene kosti (Smith 1980). Zbog činjenice da OHC možemo naći i u koži (Prockop i sur. 1979) urinarni OHP smatramo ne-specifičnim pokazateljem količine razgradnje.

3-Hidroksipiridinska kolagenska ukriženja

Simultano sa sintezom kolagena sintetiziraju se i piridinolin (PYD) i deoksipiridinolin (DPD). Trifunkcionalna ukriženja povezuju nekoliko kolagenskih peptida te na taj način mehanički stabiliziraju molekule kolagena (Shetty i sur. 2016). Tijekom razgradnje kostiju ukriženi kolageni bivaju proteolitički razgrađeni, a njihova se ukriženja otpuštaju u cirkulaciju i urin (Robins i sur. 1994). Mjerenja hidroksipiridinskih ukriženja nisu pod utjecajem razgradnje novosintetiziranog kolagena pa su njihove količine striktni pokazatelji razgradnje zrelih kolagena. Nadalje, obje forme pokazuju veliku specifičnost za koštano tkivo. PYD pronalazimo u hrskavičnom tkivu i ligamentima dok je DPD skoro u potpunosti ograničen na kosti i dentin (Seibel 2005). Budući da kosti imaju veći stupanj remodeliranja nego hrskavice i ligamenti, količina PYD i DPD u serumu ili urinu većinski je porijeklom iz koštanog tkiva. Trenutno su piridinska ukriženja najbolji indikatori razgradnje kostiju (Shetty i sur. 2016).

Koštani sijaloprotein (BSP)

BSP je fosforilizirani glikoprotein s molekularnom masom od 70-80 kDa koji čini 5-10% ukupnog ne-kolagenskog koštanog matriksa (Baranowski i sur. 2016). Pokazalo se da igra značajnu ulogu u sintezi produkata aktiviranih osteoblasta te je pronađen u malignim i osteoklastima sličnim staničnim linijama. BSP je otkriven u mineraliziranim tkivima kao što su: kosti, dentin i kalcificirana hrskavica (Chen i sur. 1991). Sa svojom Arg-Gly-Asp (RGD) integrin prepoznavajućim slijedom poboljšava vezanje osteoblasta i osteoklasta za površinu, veže se za $\alpha 2$ lanac kolagena te pojačava resorpciju koštanog tkiva osteoklastima (Wei i sur. 2016). Igra važnu ulogu u adherenciji stanica s matriksom (Hunter i sur. 1994).

Kiselna fosfataza otporna na tartar (TRAP, TRAcP)

Sve kiselne fosfataze, osim izoforme 5 koja je stoga nazvana tartrat-otpornom kiselom fosfatazom (TRAP ili TRAcP), inhibirane su L(+)-tartratom. Izoforma 5 se može podijeliti u 2 podskupine: izoformu 5a i izoformu 5b. Osteoklasti imaju TRAP-5b izoformu. Porijeklo TRAP-5a nije poznato, ali postoji mogućnost da je eksprimirana makrofagnom aktivnošću. TRAP-5a sadrži sijalinsku kiselinu dok je izoforma TRAP-5b ne sadrži (Halleen i sur. 2000).

Katepsin K

Katepsin K je cisteinska proteaza koja uklanja helikalne i telopeptidne regije kolagena (Halleen i sur. 2000). Izlučuju ga osteoklasti tijekom razgradnje kostiju. Imunocitokemijski je dokazano da se on nalazi u granulama i vakuolama duž citoplazme osteoklasta odakle se izlučuje u lakune gdje se događa razgradnja kolagena što može poslužiti kao dobar biljeg razgradnje kostiju (Goto i sur. 2003).

1.4. Osteoporoza

Osteoporoza predstavlja heterogenu skupinu abnormalnih procesa karakteriziranih gubitkom mase kostiju koja rezultira smanjenjem mineraliziranih kostiju (Johnell i sur. 2006). Smanjuje se debljina korteksa te broj i veličina spužvaste (trabekularne) kosti (Parafitt i sur. 1992). Kompaktnost spužvastog tkiva glavni je pokazatelj jačine kostiju. Osteoporoza vodi do smanjene jačine kostiju zbog čega su podložnije lomovima. Tim promjenama su podložne, kako spužvaste tako i kompaktne kosti, ali je gubitak koštane mase vidljiviji u spužvastom tkivu (Parafitt i sur. 1983). Do bolesti dolazi kada se više kosti razgradi nego što osteoblasti mogu nadoknaditi. Osteoblasti i osteoklasti su pod utjecajem hormona, citokina i raznih drugih faktora kao što su PTH, kalcitonin i 1,25-dihidroksivitamin D3 (Gravallese i sur. 2001). Pokazalo se da manjak estrogena ima značajan utjecaj na ubrzani gubitak koštane mase (Glazier i sur. 2001). Manjak estrogena utječe na razinu specifičnih citokina kao što su IL-1 i IL-6 (Hurwitz 1993). Kako se smanjuje razina estrogena tako razina upalnih citokina raste, a sam proces razgradnje kostiju postaje učestaliji (Rubin 2005). Razina kalcitonina je manja kod žena nego kod muškaraca iako se za njega nije pokazalo da utječe na pojavu osteoporoze povezane sa starošću (Rachner i sur. 2011). Fizička aktivnost kosti dulje drži zdravima. Većina ljudi s osteoporozom je mršavija te nemaju mnogo mišićne mase (Hahn i sur. 2016). Prehrana siromašna kalcijem, fosforom i vitaminom D povezana je s gubitkom mase kostiju (Veldurthy i sur. 2016). Osim prehrane, konzumacija alkohola i kofeina, pušenje cigareta te rana menopauza dovode do gubitka mase kostiju (Xie i sur. 2016).

Rasa i spol igraju značajnu ulogu. Tako pripadnici crne rase imaju veću masu kostiju od bijelaca i azijata; također muškarci imaju veću masu kostiju od žena (Chin i sur. 2016). Obiteljska anamneza, odnosno genetika, također povećava mogućnost obolijevanja od osteoporoze, naročito ukoliko su postmenopauzalne žene u obitelji sklone prijelomima kostiju (Simonsen i sur. 2016). Neka su istraživanja pokazala korelaciju između abnormalnosti receptora vitamina D s pojavom osteoporoze, međutim to nije primjenjivo na širu populaciji već je ograničeno na samo mali broj pacijenata (Cooper i sur. 1996). Osteoporozi povezanu sa starošću možemo, prema genetičkim i hormonalnim faktorima, podijeliti u dva tipa (Riggs i sur. 1986). Tip I se pojavljuje kod hipogonadnih (smanjena razina testosterona kod muškaraca i estrogena kod žena) muškaraca i žena. Postmenopauzalne žene, žene kod kojih dolazi do preuranjene menopauze (posljedica anoreksije ili opsesivnog programa tjelovježbe) te muškarci s nižim razinama testosterona imaju povećan rizik od razvoja osteoporoze (Chin i sur. 2016). Kao posljedica niže razine estrogena dolazi do povećanja razine citokina koji

pogoduju sintezi osteoklasta pa pacijentice, kod kojih dominira spužvasto tkivo, imaju povećan rizik od prijeloma kostiju (Kim i sur. 2016).

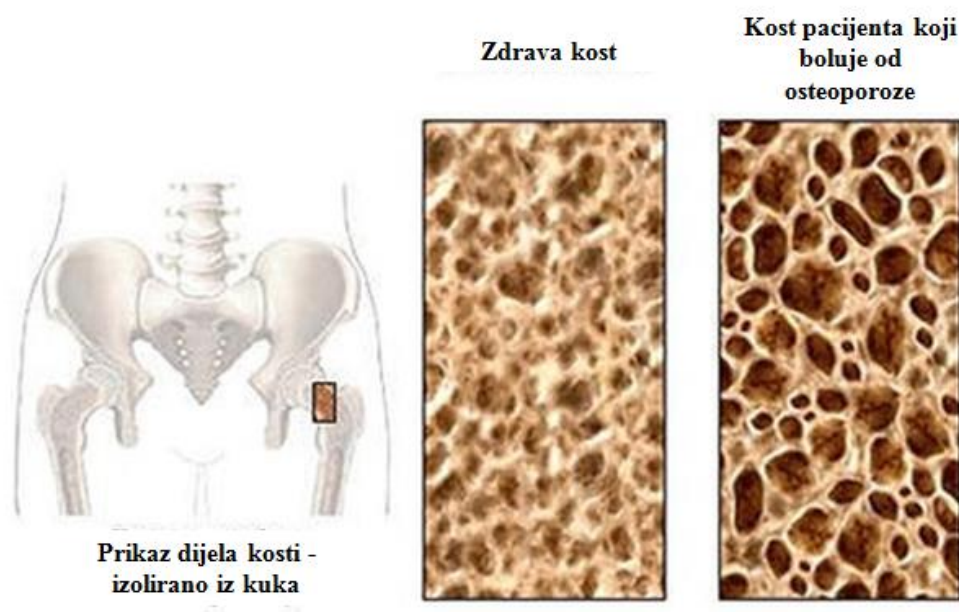
Tip II je povezan s normalnim starenjem te se pojavljuje kod osoba starije životne dobi (Melton i sur. 1986). Proces starenja povezan je s progresivnim padom razine i aktivnosti osteoblasta (Parafitt 1982). Za ovaj su tip karakteristični lomovi kortikalnih kostiju kao što su bedrena kost i zdjelica. Rizičnu skupinu predstavljaju pojedinci koji imaju povećanu endogenu proizvodnju glukokortikoida ili oni s kroničnim upalama.

Glukokortikoidi smanjuju sekreciju gonadotropina i suprimiraju stvaranje adrenalnog androgena. Ti lijekovi smanjuju apsorpciju Ca čak i u uvjetima normalne razine kalcetriola u serumu. Nadalje, inhibiraju funkciju osteoblasta, povećavaju osjetljivost stanica na PTH te potencijalno pojačavaju aktivnost osteoklasta. Također inhibiraju stvaranje osteoprotegerina, faktora koji inhibira RANKL (Matsuno 2016). Inhibicijom inhibitora RANKL-a dolazi do povećane sinteze osteoklasta. Za glukokortikoidnu terapiju se pokazalo da je povezana s gubitkom mase kostiju te ponajviše zahvaća spužvaste kosti. Posljedice ovise o dozi i duljini trajanja terapije. Glukokortikoidi također utječu na ravnotežu Ca pa se preporuča upotreba dodataka prehrani bogatih vitaminom D i Ca kao prevencija upalnih procesa (Hahn i sur. 1979). Upotreba određenih diuretika, u prvom redu tiazid derivata, smanjuje pojavu hiperkalciurije (prekomjerno izlučivanje Ca mokraćom) povezane s upotrebom glukokortikoida (Cauley i sur. 1993). Pokazalo se da upotreba bisfosfonata pogodno djeluje na smanjenje učinka glukokortikoidne terapije. Pacijenti s kroničnim upalama imaju povećan rizik od razvoja osteoporoze, a u kombinaciji s glukokortikoidnom terapijom rizik se dodatno povećava. Stariji pacijenti su podložniji prijelomima zbog slabije koordinacije, slabijeg vida, slabijih mišića ili zbog konzumacije nekih lijekova (Hadji i sur. 2016).

Primarna osteoporoza je posljedica starenja, dok sekundarnu karakteriziraju abnormalnosti povezane s raznim bolestima kao što su endokrini poremećaji (npr. hiperadrenokortizam), kronična upala (npr. reumatoidni artritis), nedostatak minerala kostiju itd. (Simon 2007). Postoje i drugi lijekovi za koje se pokazalo da mogu doprinijeti razvoju osteoporoze kao što su metotreksat (oslabljuje funkciju osteoblasta), heparin (povećava aktivnost osteoklasta) i antiepileptici (utječu na metabolizam vitamina D i na apsorpciju Ca; Laan i sur. 1993). Dokazano je da su neke bolesti povezane s povišenim rizikom obolijevanja od osteoporoze. Neke od njih su: dijabetes, kronična upala pluća te alkoholizam (Ramachandran i sur. 2016).

Klinička manifestacija bolesti

Prijelomi kostiju, bolovi i stvaranje deformiteta glavni su pokazatelji razvoja bolesti (Slika 7). Bol je najčešći simptom i to najčešće u području aksijalnog kostura (lubanja, kralježnica i udovi). Spontani lomovi s minimalnim traumama predstavljaju signal za posumnjati u postojanje bolesti. Osteoporotski lomovi nastaju zbog pada ili naglog pokreta (skakanje, podizanje teških predmeta itd.). Međutim, generalna bol u kostima može biti indikacija drugih malignih oboljenja kao što je metastatski tumor ili čak osteomalacija (poremećaj mineralizacije kostiju). Povećana stopa mortaliteta uglavnom je posljedica brojnih lomova ili uzastopnih operacija (Kwon i sur. 2016).



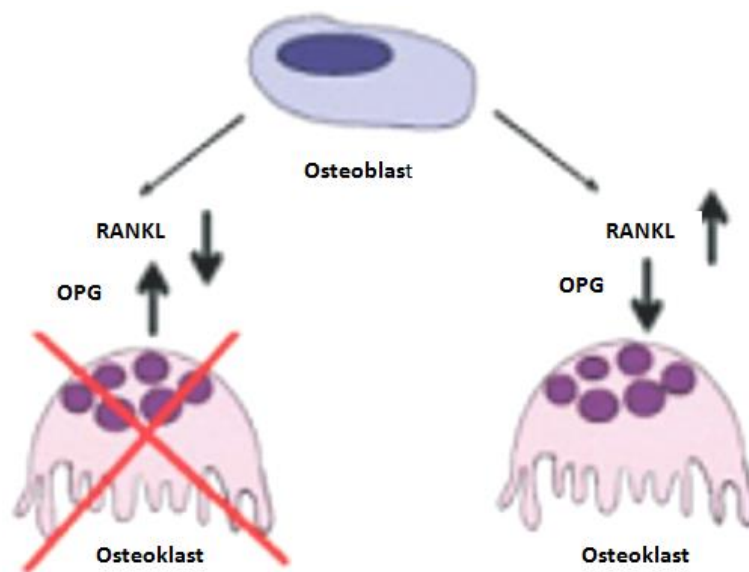
Slika 7. Razlika između normalne kosti i kosti pacijenta oboljelog od osteoporoze. Koštana masa se izgrađuje uglavnom do tridesete godine, a poslije četrdesete godine se postepeno smanjuje (po 1% godišnje).

Preuzeto s: <http://www.abelia.cz/images/osteoporosis2.jpg>

1.4.1. Signalni put OPG/RANK/RANKL

Otkriće receptora aktivatora puta nuklearnog faktora (RANK)/RANK ligand (RANKL)/ osteoprotegerin (OPG) pridonijelo je boljem razumijevanju načina regulacije pregradnje i razgradnje kostiju. RANKL i OPG su članovi porodice tumor necrosis faktor (TNF, engl. *tumor necrosis factor*), a vezivanje receptora aktivatora RANK ne samo da regulira osteoklasnu formaciju, aktivaciju i opstanak u normalnom tkivu kosti već i nekoliko drugih patoloških stanja. Otkriće receptor aktivatora nuklearnog faktora RANK/RANKL/osteoprotegerin (OPG) signalnog puta u osteoklasnom formiranju (Slika 8) i djelovanju, pokazalo je veliku ulogu TNF receptor obitelji u koštanom metabolizmu (Whyte i sur. 2004; Tat i sur. 2009).

RANKL se sintetizira u membrani u topljivom obliku osteoblastičnih, imunoloških te nekih zloćudnih tumorskih stanica. Veže se na površinski receptor osteoklasta RANK i stimulira resorpciju kostiju kroz osteoklastogenezu i aktivaciju zrelih osteoklasta. Osteoprotegerin (OPG) pripada TNF obitelji, luče ga stanice osteoblasta, te djeluje kao receptor za RANKL čime sprječava međureakciju između RANKL i RANK, odnosno sprječava osteoklastogenezu (Tat i sur. 2009). Ukoliko se poveća razina ekspresije RANKL snižava se razina OPG. RANKL/OPG omjer izražen u pre-osteoblastnim stanicama je veći nego u zrelim osteoblastima (favorizira sazrijevanje osteoklasta) (Boyce i sur. 2008). RANKL se eksprimira i u tumorskim malignim stanicama čime se regulira proliferacija tumorskih stanica (Boyce i sur. 2006; Tat i sur. 2009). RANK se sintetizira kao tip 1 homotrimeričnog transmembranskog proteina te se eksprimira u različitim tkivima skeletnih mišića, jetre, debelog crijeva, prostate, timusa itd. (Tat i sur. 2009). Broj i aktivnost osteoklasta u kostima ovisi o omjeru dostupnog RANKL i OPG (Simonet i sur. 1997; Lacey i sur. 1998). Visoki omjer je pokazatelj procesa pregradnje kostiju dok je niski omjer pokazatelj procesa razgradnje kostiju (Vega i sur. 2007; Tat i sur. 2009).



Slika 8. Signalni put OPG/RANK/RANKL. OPG smanjuje sintezu osteoklasta inhibirajući diferencijaciju osteoklastnih prekursora. Veže se za RANKL somatskih stanica blokirajući na taj način RANKL/RANK međureakciju između osteoblasta i osteoklastnih prekursora što ima za posljedicu inhibiciju diferencijacije osteoklastnih prekursora u zrele osteoklaste. Preuzeto s http://www.jisponline.com/articles/2011/15/3/images/JIndianSocPeriodontol_2011_15_3_190_85659_f8.jpg

1.4.2. Utjecaj fitoestrogena na osteoporozi

Hormonalne promjene tijekom menopauze rezultiraju sniženjem razine estrogena što dovodi do povećanog rizika od razvoja osteoporoze (Xu i sur. 2016). Nedostatak estrogena dovodi do povećane frekvencije remodeliranja kostiju što dovodi do disbalansa koji rezultira gubitkom mase kostiju (Manolagas 2000). Iako se hormonske terapije rutinski koriste u liječenju osteoporoze, pokazalo se da izazivaju brojne nuspojave kao što su povećani rizik od razvoja karcinoma dojke i jajnika (Oostra i sur. 2015). Estrogen utječe na kosti aktivacijom estrogenskih receptora (Moggs i sur. 2004). Biološki aktivne molekule, kao što su fitokemikalije, induciraju fitoestrogene (koji štite biljku u stresnim uvjetima tj. djeluju kao njezin mehanizam zaštite) čije je djelovanje slično djelovanju estrogena.

Mehanizam djelovanja

Fitoestrogeni omogućavaju bolji prijenos Ca čak i pri niskim koncentracijama estrogena. Međutim taj učinak nije zabilježen u uvjetima bez estrogena (Cotter i sur. 2005). Mehanizam se temelji na povećanoj ekspresiji određenih proteina kao što su kalcitropni receptor, neki citokini te faktori rasta koštanog matriksa dok je s druge strane smanjena ekspresija nekih kao što je matriks metaloproteaza (MMP), koja predstavlja cinkovu endopeptidazu ovisnu o Ca, a sudjeluje u razgradnji izvanstaničnog matriksa (Pie i sur. 2006). Smanjena je i razina IL-6 proteina (Rickard i sur. 2003) što se povezuje s činjenicom da su fitoestrogeni stabilne molekule male molekularne mase koje pasivno prolaze kroz membranu stanica (Adlercreutz 1997). Pokazalo se da je njihova sposobnost vezanja za estrogenske receptore različita ovisno o vrsti receptora. Naime postoje dva receptora za estrogen (ER)-estrogen receptor α (ER- α) i estrogen receptor β (ER- β) koji stvaraju specifične homo- ili hetero-dimere s DNA slijedovima čime se aktivira transkripcija specifičnih gena. ER- β ima anti-proliferacijski učinak te djeluje kao tumor supresor (Weihua i sur. 2000). Fitoestrogeni se bolje vežu za ER- β (Kuiper i sur. 1998).

Pokazalo se da pozitivno djeluju i na alkalne fosfataze, enzime koji hidroliziraju fosfatne skupine brojnih molekula uključujući proteine i nukleotide, te na taj način povećavaju proces mineralizacije kostiju (Khaw i sur. 2004). Također stimuliraju diferencijaciju osteoblasta (Jia i sur. 2003) te na taj način sprječavaju resorpciju kostiju u *in vitro* uvjetima. Neke tirozin kinaze direktno inhibiraju prijenos osteoklasta kroz membranu (Williams i sur. 1998).

Samo sazrijevanje osteoklasta je pod utjecajem dva faktora, makrofag kolonija stimulirajućeg faktora (MCSF) te receptora kojeg aktivira NF- κ B ligand. Suprimiranjem aktivnosti NF- κ B receptora dolazi do povećane sinteze osteoprotegerina pa se proces razgradnje kostiju prevodi u proces pregradnje kostiju (Chen i sur. 2002). Utječu i na receptore peroksisoma zadužene za aktivaciju proliferacije (PPAR). PPAR su jezgreni receptorni proteini koji funkcioniraju kao transkripcijski faktori u procesima diferencijacije, razvoja i tumorigeneze. Igraju značajnu ulogu u procesu osteogeneze, ali samo pri višim koncentracijama (Dang i sur. 2004).

Fitoestrogenska terapija

Fitoestrogeni su derivati iz biljaka čija je struktura slična onoj steroidnih hormona. Iako im je učinkovitost manja od one endogenih estrogena koriste se kao terapija protiv osteoporoze izazvane menopauzalnim promjenama (Limer i sur. 2004). Flavonoidi (izoflavoni) su klasificirani kao fitoestrogeni jer oponašaju učinak estrogena (Grippe i sur. 2007). Fitoestrogeni su endokrini aktivni estrogeni koji se nalaze u biljkama te se smatra da sprječavaju pojavu osteoporoze promovirajući zdravlje kostiju. Visoke koncentracije fitoestrogena su pronađene u soji (Franke i sur. 2009) koja pozitivno djeluje na postmenopauzalne žene jer sprječava pojavu ateroskleroze te smanjuju rizik od nastanka raka (Foth i sur. 2000). Fitoestrogeni se vežu za receptore estrogena (prilikom procesa pregradnje kostiju; Joo i sur. 2004).

Posebno značajnima pokazali su se genistein i daidzein koji sudjeluju u očuvanju mase kostiju (King i sur. 2015). Soja, nakon uklanjanja glikolne skupine, pokazuje povećanu aktivnost sinteze estrogena naspram skupina tretiranih sojom kod koje nije uklonjena glikolna skupina (Ganry 2005). Danggui Buxue Tang, kineski narodni lijek koji sadrži *Radix astragali* i *Radix angelicae sinensis* (korijenasti ginseng) stimulira proliferaciju osteoblasta aktivirajući promotore estrogena (Dong i sur. 2006). Crvena djetelina (*Trifolium pratense*) sadrži fitoestrogene koji poboljšavaju zdravlje kostiju (nakon menopauze) smanjujući rizik od razvoja ateroskleroze (Booth i sur. 2006). Unatoč pozitivnim učincima, neka su laboratorijska istraživanja pokazala da pretjerana upotreba fitoestrogena može imati ozbiljne posljedice (Reinwald i sur. 2006). Prevelika upotreba fitoestrogena izazvala je, kod miševa, pojavu raka sluznice maternice (Johnson i sur. 2001). McLachlan i sur. (2006) su uočili da pretjerana konzumacija fitoestrogena pogađa rast dojki i laktaciju te ima ulogu u razvoju bolesti maternice.

1.4.3. Utjecaj oksidativnog stresa na osteoporozu

Oksidativni stres nastaje zbog povećane količine reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) čime slabe antioksidativne sposobnosti stanica (Hailliwell 1994). Slobodni radikali dovode do oštećenja biomolekula kao što su DNA, proteini i lipidi. Antioksidativni enzimi kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation-S-peroksidaza (GSH) mogu smanjiti razinu unutarstaničnog ROS. Sve više istraživanja pokazuje da oksidativni stres dovodi do

pojave ateroskleroze kao i drugih bolesti kao što su neurodegenerativne bolesti, dijabetes i rak. Nedavno je predloženo da oksidativni stres može biti i uzrok razvoja osteoporoze jer u animalnim modelima dolazi do poremećaja u pregradnji kostiju, smanjuje se diferencijacija i preživljavanje osteoblasta, a povećava se aktivnost osteoklasta. Količina 8-hidroksi 2-deoksigvanozina u kostima (8-OH-dG), oksidativnog DNA adukta, povezana je s gustoćom koštanog tkiva tj. veća razina 8-OH-dG označava veću razinu oksidativnog stresa što prouzrokuje povećanu razgradnju kostiju. ROS promoviraju stvaranje RANKL stimulirajući proces osteoklastogeneze u koštanom tkivu (Baek i sur. 2010).

Malondialdehid (MDA), krajnji produkt procesa lipidne peroksidacije, koristi se kao parametar za mjerenje razine oksidativnog stresa (Kilic i sur. 2014). Napredni oksidacijski proteinski produkti (AOPP) predstavljaju novi biljeg koji je stabilan i jednostavan za otkrivanje. AOPP stvara ditirozinske ostatke i ukriženja (engl. *cross-links*) (Witko-Sarsat i sur. 1996). Razina AOPP u serumu negativno je korelirana s promjenama u mineralnoj gustoći kostiju (Zhang i sur. 2011) te može dovesti do ubrzane razgradnje kostiju kod starijih štakora (Zeng i sur. 2014). Dokazano je da AOPP inhibira proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta (Zhong i sur. 2009). Razina AOPP u plazmi je povećana kod postmenopauzalnih žena koje boluju od osteoporoze. Koncentracija AOPP u plazmi je povezana s količinom razgrađene kosti (Wu i sur. 2015). Proces remodeliranja kostiju se ubrzava nakon pojave menopauze (Parafitt i sur. 1995).

1.5. Retinoična kiselina

Retinoična kiselina je metabolit vitamina A (retinola) koja se veže za receptor retinoične kiseline (RAR) koji se veže za DNA kao heterodimer pomoću retinoičnog receptora x (RXR) u regiji koja se naziva elementi odgovora na retinoičnu kiselinu (RARE). Vezanjem liganda dolazi do konformacijske promjene receptora koji dimerizira prenoseći na taj način signal izvana unutar stanica. Na taj se način inducira kaskadni prijenos signala koji rezultira indukcijom ili represijom transkripcije ciljanih gena (Duester 2008). Na taj način retinoična kiselina kontrolira diferencijaciju stanica (Vankatesch i sur. 2013).

1.6. Fitoestrogeni

Fitoestrogeni su različite biljne tvari čiji aktivni metaboliti imaju sličnu kemijsku strukturu kao i estrogen. Točnije, dijele kemijsku sličnost s estradiolom (17- β -estradiol) te stoga imaju estrogeno i/ili antiestrogeno djelovanje. Primarno djeluju tako što se vežu za receptore estrogena (ER- α i ER- β), ali se mogu i natjecati za vezno mjesto na receptorima (ER- α i ER- β) te time smanjiti vezanje estrogena. Pokazano je da imaju veći afinitet za receptore ER- β . Pri smanjenom stvaranju estrogena aktivni metaboliti fitoestrogena vežu se za receptore i pokazuju djelovanje slično estradiolu koje je znatno slabije od djelovanja estradiola. Kod povišenih razina estrogena aktivni metaboliti fitoestrogena vežu se za receptore i tako smanjuju mogućnost vezanja samog estrogena. Fitoestrogeni se dijele u dvije osnovne skupine, izoflavonoide i lignane, dok se izoflavonoidi dijele na izoflavone i kumestane. Najpoznatiji izoflavoni su genistein i daidzein (Yildiz 2006). Izoflavonoidi su derivati flavona i imaju karakterističnu kemijsku strukturu od dva benzenska prstena na koja mogu biti vezane dvije ili više hidroksilnih skupina. Uključuju flavonole, flavanone, flavane i katehine (Gašparević-Ivanek 2003).

1.6.1. Flavonoidi

Flavonoidi pripadaju skupini polifenola koji se mogu naći kod brojnih biljnih vrsta. Mogu se podijeliti u tri skupine: flavoni (bioflavonoidi), izoflavoni (fitoestrogeni) i neoflavonoidi (bijeli flavonoidi). Hrana bogata flavonoidima je u prvom redu voće posebice citrusno i bobičasto voće, ali ih se može naći i u povrću kao što su luk, celer, kupus, paprike itd. Udio flavonoida u hrani varira ovisno o uvjetima uzgoja, obrade i skladištenja (USDA database for flavonoid content of selected foods 2013). Nakon konzumacije flavonoida uočeno je povećanje u gustoći kostiju, naročito kostiju kralježnice i kukova (Hardcastle i sur. 2011). Čaj koji obiluje flavonoidima, bitan je izvor katehina koji štite od prijeloma kuka (Johnell i sur. 1995).

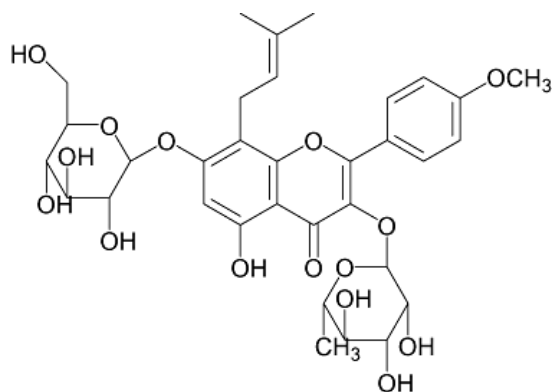
Mehanizam djelovanja flavonoida

Osteociti su stanice unutar mineralizirane kosti koje šalju signal osteoklastima koji potom započinju proces razgradnje kostiju (Das i sur. 2013). Putevi koji održavaju aktivnim proces remodeliranja uključuju signalni put RANKL/RANK (Nishimura i sur. 2012). Signalni put RANKL/RANK regulira remodeliranje kostiju *in vivo* (Boyce i sur. 2006). Citokini koji induciraju stvaranje hrskavice i kostiju pozitivno djeluju na diferencijaciju osteoblasta (Nishimura i sur. 2012).

BMP potiče ekspresiju Runx2 gena, jednog od bitnih promotora osteogeneze (Shen i sur. 2011). Estrogen inhibira nastanak osteoklasta potičući njihovu apoptozu (Khosla i sur. 2011). Nedostatak estrogena potiče upalni proces koji vodi do povećanja upalnih citokina te se povećava proizvodnja ROS. Flavonoidi djeluju na taj process (Nieves 2013). Upalni citokini (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-7 i IL-17) stimuliraju proizvodnju osteoklasta i razgradnju kostiju induciranjem ekspresije RANKL (Shen i sur. 2012). Flavonoidi uspješno otklanjaju količinu cirkulirajućih citokina IL-6 i TNF- α (Peluso i sur. 2013), smanjuju aktivnost RANKL i nekih matriks metaloproteaza koje razgrađuju kolagen. Također povećavaju Runx2 signalni put, osteokalcin, Smad i Wnt signalni put te razinu alkalne fosfataze, a inhibiraju degradaciju kolagena (Horcajada i sur. 2012).

1.6.2. Ikarin

Ikarin (8-prenil derivat kaempferola 3,7-O-diglukozida) je kemijska komponenta klasificirana kao flavonol glikozid, vrsta flavonoida (Slika 9).



Slika 9. Kemijska struktura ikarina.

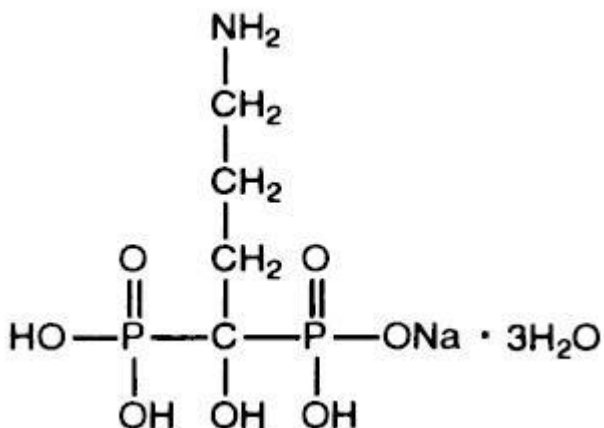
Preuzeto iz rada: Li i sur. 2013.

Komponenta je prvotno izolirana iz biljnog roda *Epimedium* koja se koristi u kineskoj tradicionalnoj medicini (Liu i sur. 2012). Istraživanje je pokazalo da 60-mg ikarina u kombinaciji s 15-mg daidizeina i 3-mg genisteina može smanjiti gubitak mase kostiju kod menopauzalnih žena (Zhang i sur. 2007). Nian i sur. (2009) su pokazali da upotreba ikarina kod štakora kojima su odstranjeni jajnici pozitivno djeluje na gustoću i čvrstoću kostiju te sprječava inhibiciju serumskog Ca, procesa kojeg inducira ovarijektomija (OVX). Također ikarin potiče proliferaciju, diferencijaciju i mineralizaciju kosti te sekreciju osteokalcina (Huang i sur. 2007).

Ikarin djeluje na povećanje osteogene diferencijacije djelujući na Runx2 i BMP signalne putove (Zhao i sur. 2008). Inhibirajući stvaranje osteoklasta utječe na smanjenje razgradnje kostiju (Cheng i sur. 2007). Svaki fitoestrogen ima različiti afinitet vezanja za receptore estrogena (Gutendorf i sur. 2001). Ikarin sprječava gubitak mase kostiju potičući aktivnost osteoblasta pri niskim koncentracijama estrogena (Zhang i sur. 2006). Sam stil života, u prvom redu zdravi stil života kojeg karakterizira zdrava prehrana i fizička aktivnost, mogu imati značajan utjecaj na prevenciju osteoporoze. Kombinacija ikarina i tjelovježbe ima sinergistički učinak na sprječavanje smanjenja mase kostiju naročito bedrene kosti. Potiče se sinteza transkripcijskih faktora za specifične osteoblaste (Liu i sur. 2012).

1.7. Alendronat

Trenutno dostupna terapija u liječenju osteoporoze jest kombinacija alendronatne kiseline u obliku natrij alendronat trihidrata te Ca i vitamina D. Alendronat je nehormonski lijek koji pripada skupini bisfosfonata (Slika 10). Alendronat svoju efikasnost i biodostupnost duguje dvama negativno nabijenim fostanim skupinama koje smanjuju mogućnost izlaganja alendronata drugim tkivima (Shinkai i sur. 1996). U ljekarnama se prodaje pod nazivom *Fosamax*. Alendronat inhibira proces razgradnje kostiju. Bisfosfonati su sintetski analozi pirofosfatima koji vežu hidroksiapatite, kemijske spojeve pronađene u osteoklastima. Za razliku od pirofosfata alendronat specifično inhibira osteoklastnu resorpciju kosti bez mineralizacije novo sintetizirane kosti, što nije slučaj kod pirofosfata. Većinom se skladišti u matriksu kosti, a polu-život mu iznosi 10 godina (Berkhout i sur. 2016).



Slika 10. Komercijalni lijek kod liječenja osteoporoze- alendronat

Preuzeto s: <http://www.drugsdb.com/images/2012/03/fosamax-side-effects.jpg>

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Životinje

Kao modelni organizam, koristili smo ženke štakora visoko srodnog soja Y-59. Starost štakora je bila 3 mjeseca, a masa oko 150 g. Životinje su dobivene uzgojem u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Životinje su držane u kavezima dimenzija 20x32x20 cm s maksimalno 5 životinja po kavezu. Uvjeti su bili standardni (ciklus od 12 sati dana i 12 sati mraka, temperatura 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka). Životinje su bile hranjene komercijalnom hranom (4 RF 21, Mucedola S.R.L., Italija). Voda i hrana su bile konstantno dostupne.

Istraživanje je provedeno u skladu sa etičkim načelima Republike Hrvatskoj, prema Zakon o zaštiti laboratorijskih životinja (NN 19, 1999) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, DHHS (NIH) Publ # 86-23).

2.1.2. Reagensi

- Fiziološku otopinu (Natrii chloridi infundibile, Pliva d.o.o, Hrvatska) smo koristili za obradu zdrave skupine i simulaciju stresa uzrokovanog obradom.
- Isotreonin (13cRA; 13 *cis*-retinoična kiselina) (Accutane[®], Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Švicarska) smo koristili intragastrički (*ig*) u dozi 80 mg kg⁻¹ u svrhu poticanja osteoporoze. Kapsule isoterona otopili smo u ulju i koristili u obliku suspenzije.
- Alendronat (Alendor[®] 70, Pliva d.o.o., Hrvatska) smo koristili intragastrički kao pozitivnu kontrolu u dozi od 2 i 40 mg kg⁻¹. Alendronat smo otopili u destiliranoj vodi i koristili u obliku suspenzije.
- Ikarin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) smo koristili intragastrički u svrhu liječenja osteoporoze u dozi od 100 mg kg⁻¹.

- Ketamin (Narektan[®], Vetoquinol AG, Belp Bern, Švicarska) smo koristili kao anestetik tijekom rukovanja životinjama.

2.2. Plan pokusa

Tijekom prvih 15 dana životinje (n=28) smo obrađivali s 13cRA u dozi 80 mg kg⁻¹ kako bi prouzročili osteoporozu. Narednih 14 dana dio životinja (n=7) je uzet kao model za osteoporozu dok dio životinja smo uporabili za obradu s ikarinom u dozi 100 mg kg⁻¹ (n=7) ili s alendronatom u dozi 40 mg kg⁻¹ i u dozi od 2 mg kg⁻¹ (skupina n=7). Dodatnih 7 životinja iste starosti smo uzeli kao zdravu kontrolu koja je dobivala fiziološku otopinu intragastrički. Tijekom intragastričke primjene pripravaka, životinje smo anestezirali ketaminom.

2.3. Metode

2.3.1. Praćenje promjene mase životinja

Kako bi se procjenila toksičnosti pojedinog pripravaka, životinje su vagane na digitalnoj vagi svakih 7 dana. Praćen je gubitak i rast mase životinja. Gubljenje mase životinja je pokazatelj toksičnosti pripravka. Mjera toksičnosti izražena je za pojedinačnu životinju pomoću formule:

$$\%promjena\ mase = \frac{Masa\ tijekom\ obrade - Početna\ masa}{Masa\ tijekom\ obrade} \times 100$$

2.3.2. Uzimanje uzoraka

Nakon što je životinjama dana zadnja doza istraživanih pripravaka uzeta im je krv (24 sata nakon obrade). Krv je korištena za komet test. Nakon uzimanja krvi, životinje su bile eutanazirane. Za daljnu obradu smo uzeli obje bedrene kosti, maternicu i jajnike. Kostima smo izmjerili masu, duljinu i promjer te ih upotrijebili za analizu mineralne gustoće kostiju (BMD, *engl. Bone Mineral Density*). Nakon mjerenja izvađene uzorke smo izvagali i pohranili odvojeno na -20 °C.

2.3.3. Mjerenje mase maternice

Nakon što je izolirana, maternica je očišćena od masnog i vezivnog tkiva te je izvagana na digitalnoj vagi. Relativnu masu maternice izrazili smo kao masu maternice u gramima u odnosu na 100 grama tjelesne mase štakora (g/100) i izračunali prema formuli:

$$\text{Relativna masa maternice} \left(\frac{g}{100 g} \right) = \frac{\text{Ukupna masa maternice}}{\text{Završna tjelesna masa}} \times 100$$

2.3.4. Mjerenje mineralne gustoće kostiju

Za mjerenje BMD desnih bedrenih kostiju korištena je denzitometrijska metoda dvoenergetske rendgenske apsorpcijometrije. Analiza je provedena na uređaju Hologic QDR[®] 4000 (HologicInc., Zaventem, Belgium) s odgovarajućim softverom za male životinje 1.0 visoke razlučivosti prema uputama proizvođača. Kako bi dobili podatke o BMD rađena su mjerenja površine koštanog područja (area – cm²) i mineralni sadržaj kostiju (BMC, *engl. Bone Mineral Content*). Objе su vrijednosti mjerene na proksimalnim i distalnim dijelovima vrata bedrenih kostiju (metafize), a iz dobivenih podataka je izračunata vrijednost BMD (g cm⁻²). Koeficijent varijacije (QC, *engl. Coefficient of variation*) za BMD bedrenih kostiju iznosio je 1,15% odnosno 1,1% (0,61%).

2.3.5. Određivanje ukupnih proteina po Lowry-ju

Za određivanje ukupnih proteina jajnika smo koristili metodu prema Lowry i sur. (1951). Osnova metode jest kemijska reakcija bakrovih iona (Cu^{2+}) s peptidnim vezama u lužnatom mediju. Vezanjem se Cu^{2+} reducira u Cu^+ te se formira kompleks s proteinom. Potom slijedi reakcija bakar-protein kompleksa s Folin reagensom (komercijalni reagens koji sadrži fosfovolframsku i fosfomolibdensku kiselinu) pri čemu nastaje plavo obojenje.

Uzorci jajnika, su homogenizirani na ultrazvučnom homogenizatoru te razrijeđeni fosfatnim puferom (PBS) na način da je omjer mase naspram pufera 1:10. Potom su uzorci centrifugirani u centrifugi 10 minuta na 5000 okr/min. Dobivena suspenzija je uzeta za daljnje analize dok je talog odbačen. Potrebne otopine (A, B i C) priređene su neposredno prije provedbe reakcije:

- A) 2% Na_2CO_3 u 1 M NaOH;
- B) 1% natrij kalij tartarat u destiliranoj vodi;
- C) 0,5% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ u destiliranoj vodi.

Miješanjem 480 mL otopine A, 10 mL otopine B i 10 mL otopine C je dobivena radna otopina D. Komercijalni Folin reagens smo razrijedili destiliranom vodom u omjeru 1:1. Uzeli smo 100 μL suspenzije i 2 mL radne otopine D smo homogenizirali u staklenoj epruveti vorteksiranjem i inkubirali na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta inkubacije smo dodali 0,2 mL razrijeđenog Folinovog reagensa, ponovno vorteksirali i inkubirali na sobnoj temperaturi narednih 30 minuta. Dobiveni uzorak je potom prebačen u kivete kako bi im se mjerila absorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 600 nm. Kako bi dobili čim točnije podatke o količini proteina u uzorku napravljen je baždarni pravac s otopinama poznatih koncentracija albumina iz goveđeg seruma (BSA, engl. *Bovine serum albumin*), a dobiveni rezultat je izražen kao miligram proteina po mililitru (mg mL^{-1}).

2.3.6. Mjerenje lipidne peroksidacije

Malondialdehid (MDA) je korišten kao indikator lipidne peroksidacije, produkta oksidacije lipida. Korištena je metoda predložena od strane Ohkawa i sur. (1979). Uzorci su pripljemeni na isti način kao i oni za mjerenje količine ukupnih proteina po Lowry-ju. Pripremljeni su potrebni reagensi: 100 μL SDS (8,1% Na-dodecil sulfat), 750 μL HCl (20%, pH= 3,5) i 750 μL TBA (0,8% tiobarbiturna kiselina). Kako bi lakše otopili TBA korišteno je vrlo malo (~10-15 μL) dimetil sulfoksida (DMSO). Dobivenu suspenziju (1 mL) smo

temeljito pomiješali vorteksiranjem nakon čega je provedena reakcija između MDA i tiobarbiturne kiseline u vodenoj kupelji na 95 °C kroz 1 sat. Nakon toga su uzorci ostavljeni da se ohlade na sobnoj temperaturi te su potom centrifugirani 15 min na 5000 okr/min. Dobivena suspenzija je prebačena u kivete te je mjerena apsorbanacija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 532 nm. Iz dobivenih apsorbanacija smo izračunali količinu MDA korištenjem ekstinkcijskog koeficijenta za MDA ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), a dobiveni podatci su prikazani u nanomolima MDA po miligramu proteina (nmol mg^{-1} proteina).

2.3.7. Mjerenje aktivnosti glutathiona

Uzorci tkiva su pripremljeni kao i oni za mjerenje lipidne peroksidacije. Homogenizirani su u fosfatnom puferu (PBS) i centrifugirani u centrifugi (10 min na 5000 okr/min). Dobivena suspenzija (100 μL) je pomiješana u staklenoj kiveri s 5 μL HCl, 700 μL Na-pufera i 50 μL Ellmanova reagensa (DTNB, 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline). Na-pufer je priređen miješanjem 0,3 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ i 0,3 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ pri pH 7,4. U reakciji s Ellmanovim reagensom, reducirani glutathion (GSH) stvara kromofor 5-tionitrobenzoničnu kiselinu (TNB). Njena je koncentracija mjerena spektrofotometrijski na 412 nm. Dobiveni rezultat je izražen kao nanomol reduciranog GSH po miligramu proteina ($\mu\text{g mg}^{-1}$ proteina).

2.3.8. Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) određena je prema metodi po Flohé i Ötting (1971). Metoda je posredna i temelji se na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza.

U ovoj metodi korištene su dvije slijepe probe. Prva slijepe proba sastojala se samo od otopine A (Tablica 1) te je apsorbanacija u spektrofotometru mjerena na 550 nm tijekom 3 min. Druga slijepe proba služila je za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze (XOD). U kiveri je dodano redom: 25 μL dH_2O , 1,45 mL otopine A i 15-30 μL ksantin oksidaze (0,8 U/mL) (Tablica 1). Odmah nakon dodavanja enzima i brzog miješanja mjerena je promjena apsorbanacije, odnosno aktivnost enzima ksantin oksidaze tijekom 3 min na 550 nm. Aktivnost ksantin oksidaze mora biti oko 0,025 U/min. U ovom slučaju volumen XOD koji je odgovarao bio je 25 – 30 μL . Nakon što se postigla optimalna aktivnost SOD, analizirali smo

uzorke. U svaku reakcijsku smjesu umjesto dH₂O dodano je 25 µL uzorka te odgovarajući volumen ksantin oksidaze i odmah nakon toga mjerena je apsorbancija u spektrofotometru. Enzimska aktivnost mjerena je kao postotak inhibicije aktivnosti ksantin oksidaze koja se računa prema formuli: $\% \text{ inhibicije} = 100 - (\Delta A_{\text{uzorka}} / \Delta A_{\text{slijepa proba}}) \times 100$. Enzimska aktivnost SOD računa se prema formuli: $\text{aktivnost SOD} = 10^{((\% \text{ inhibicije} + 12,757) / 30,932)}$. Aktivnost SOD izražena je kao U/mg proteina.

Tablica 1. Priprema otopina za određivanje aktivnosti SOD (superoksid dismutaze)

50 mM PBS	Pomiješati 17 mL (1,56 g NaH ₂ PO ₄ × 2H ₂ O u 50 mL dH ₂ O) i 183 mL (5,678 g Na ₂ HPO ₄ u 200 mL dH ₂ O), namjestiti pH=7,8 te nadopuniti do 800 mL
50 mM PBS s 0,1 mM EDTA	3,72 mg EDTA u 100 mL 50 mM PBS
Reakcijska otopina A	190 mL 0,05 mM citokroma C (29 mg citokroma C u 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA do 190 mL) i 19 mL 1 mM ksantina (3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH, teško se otapa, lagano zagrijavati)
Reakcijska otopina B XOD (aktivnost 0,8 U/mL)	40 µL ksantin oksidaze (XOD) i 960 µL dH ₂ O

2.3.9. Mjerenje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze odredili smo spektrofotometrijskom metodom po Aebiju (1984). U toj se metodi aktivnost katalaze određuje kao količina potrošenog vodikovog peroksida (H₂O₂). U reakcijsku smjesu (kiveta ukupnog volumena 1 mL) dodali smo 980 µL 10 mM H₂O₂, a ostatak do ukupnog volumena od 1 mL je bio uzorak odgovarajućeg razrijeđenja. Nakon toga smo na spektrofotometru mjerili smanjenje količine H₂O₂ pri 240 nm tijekom jedne minute. Aktivnost katalaze izražena je preko ekstinkcijskog koeficijenta H₂O₂ ($\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) prema formuli: $c = (A_{\text{uzorka}} / (\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} \times l)) \times \text{razrijeđenje}$, gdje je l jednak putu koji zraka svijetla prođe kroz kivetu i iznosi 1 cm. Rezultat je izražen kao U/mg proteina što odgovara µmol razgrađenog H₂O₂ po minuti po miligramu proteina.

2.3.10. Komet test

Sakupljene stanice krvi smo analizirali standardnom izvedbom komet testa koju su predložili Singh i sur. (1988). Uzorci su bili pripremljeni za elektroforezu i uronjeni u ohlađeni (4 °C) pufer za lizu [1% natrijev sarkozinat (Sigma), 2,5 M NaCl (Kemika), 100 mM Na₂EDTA (Sigma), 10 mM Tris-HCl (Sigma), 1% Triton X-100 (Sigma) i 10% dimetil sulfoksid (Sigma)] pH 10. Uzorke smo potom prebacili u pufer za denaturaciju [0,3 M NaOH (Kemika), 1 mM Na₂EDTA (Sigma)], pH 12. Elektroforezu smo napravili u vodoravnoj kadici za elektroforezu (Life Technologies Ltd) u puferu za denaturaciju [0,3 M NaOH (Kemika), 1 mM Na₂EDTA (Sigma)], istosmjernom strujom stalne jakosti 300 mA i napona 25 V. Neutralizacija je odrađena ispiranjem s 0,4 M Tris-HCl puferom (Sigma), pH 7,5. Uzorke smo obojali etidij-bromidom i analizirali pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filtrom od 515 - 560 nm. Mjerenja dužine repa, % DNA u repu i repnog momenta provedena su pomoću programa za analizu slike *Comet Assay II*, proizvođača *Perceptive Instruments Ltd*.

2.3.11. Statistička obrada podataka

Podatke smo iskazali kao srednje vrijednosti (SV) ± standardna devijacija (SD) i/ili standardna pogreška (SP).

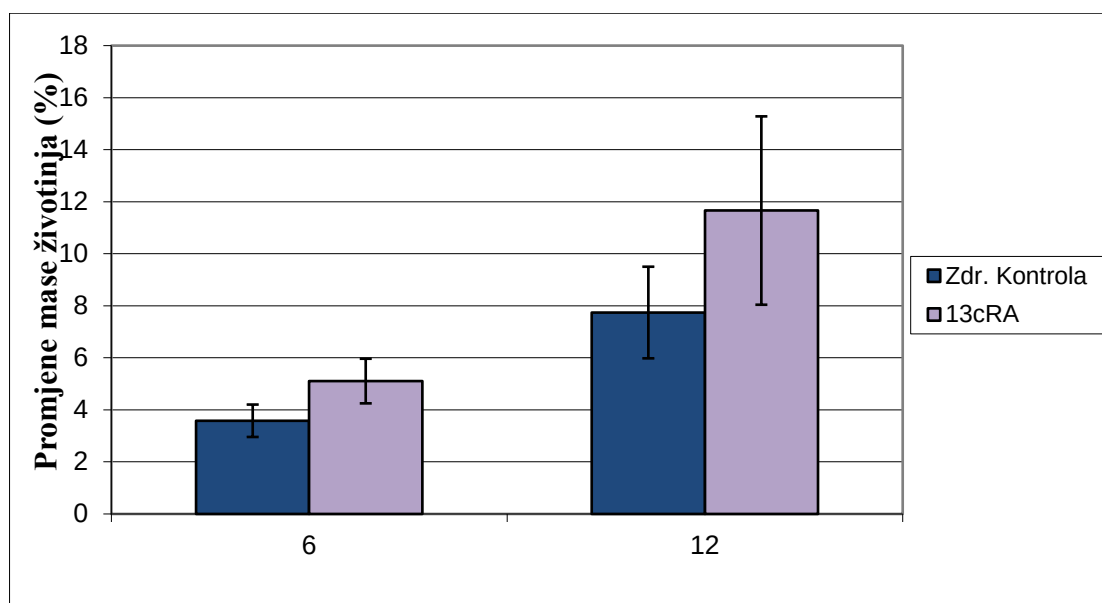
Obradu podataka je rađena u računalnom programu Microsoft Excel 2013, a za statističku analizu podataka je korišten statistički program STATISTICA 7.0 (StatSoft, Tulsa, SAD), primjenom analize varijance (ANOVA). Statistička točnost određena je sa $P < 0,05$.

3. REZULTATI

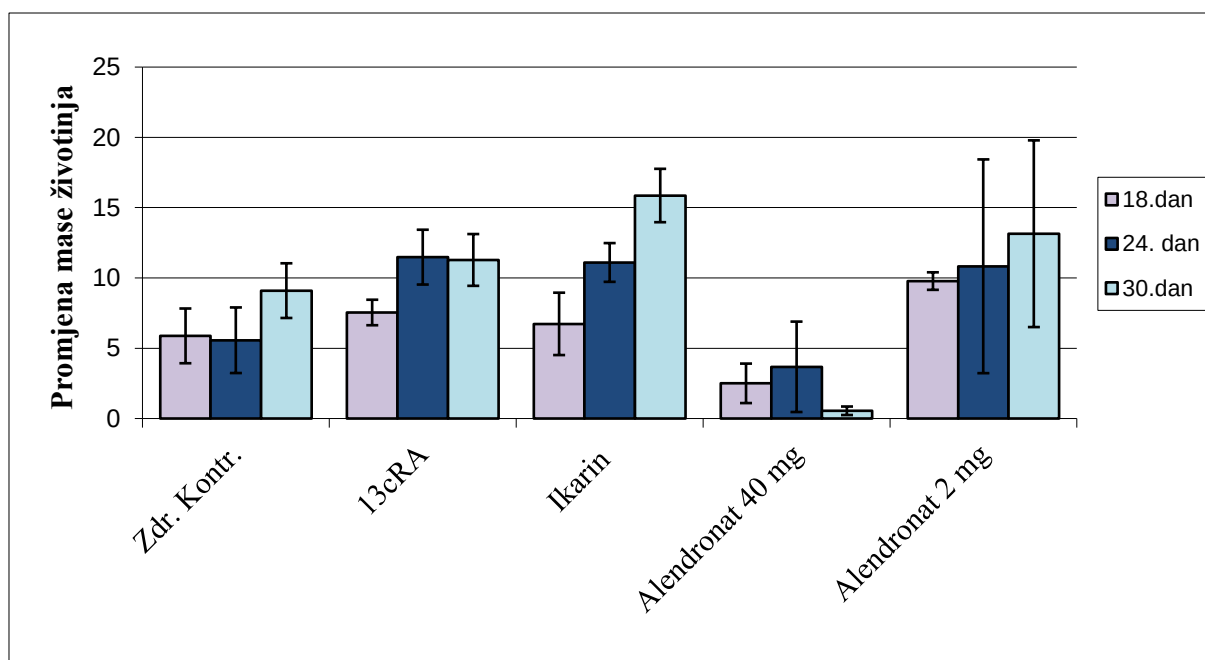
Štakori (n=28) su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg⁻¹) ili alendronatom (2 i 40 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n=7). Rezultati su prikazani kao SV±SD (SP).

3.1. Promjena tjelesne mase (TM) životinja tijekom pokusa

Životinje koje su korištene za pokus u početku nisu imale značajne razlike u tjelesnoj masi (Slika 11). Promjena tjelesne mase nakon obrade s 13cRA je zabilježena nakon 30 dana (Slika 12); statistički značajnu razliku postoji između skupina osteoporotičnih životinja obrađenih s ikarinom i alendronatom u dozi od 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$).



Slika 11. Učinak retinoične kiseline na promjenu mase životinja nakon 6 i 12 dana. Promjena mase životinja izražena je u postotcima (%). Nije postojala statistički značajna promjena mase nakon 6 dana kao ni nakon 12 dana između zdravih životinja i životinja obrađenih s 13cRA. Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze)



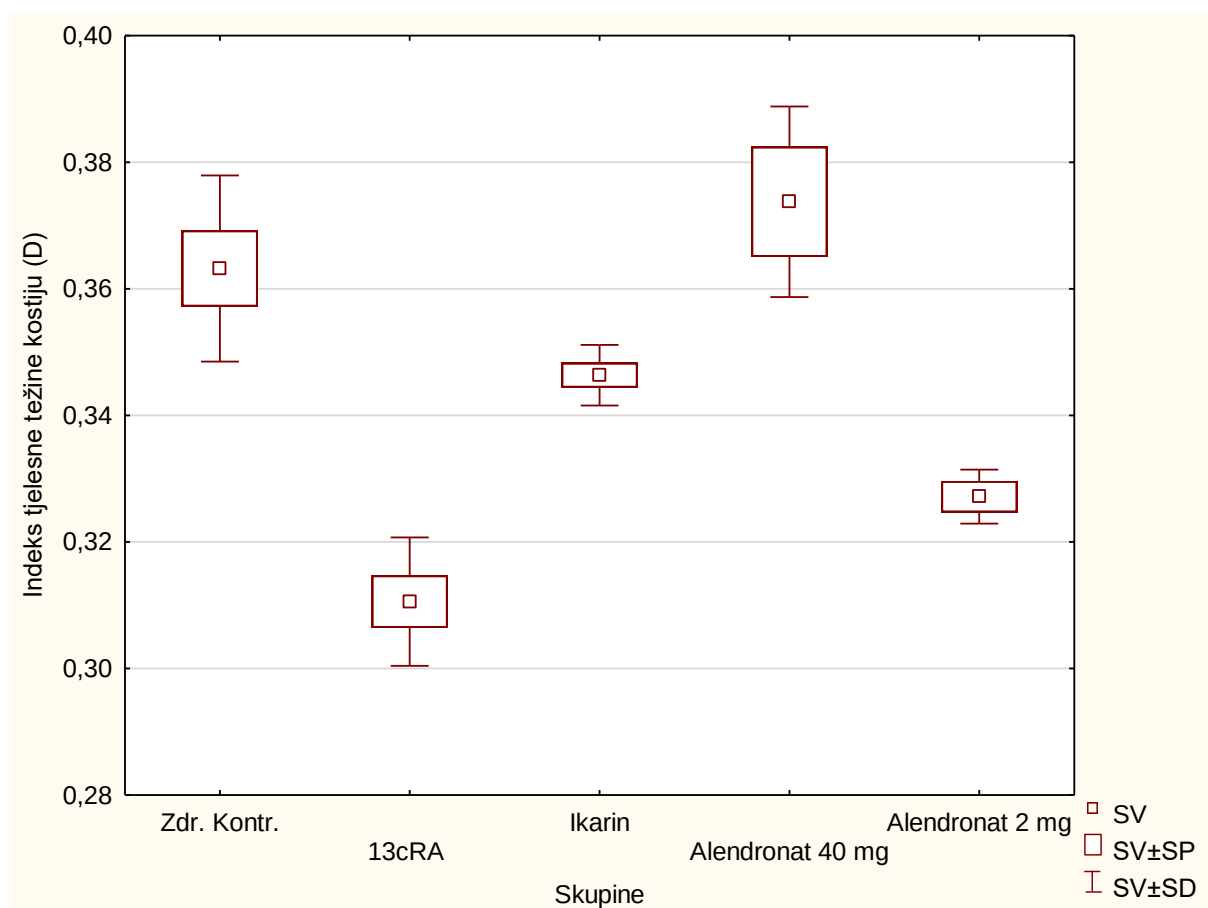
Slika 12. Učinak ikarina ili alendronata na promjenu tjelesne mase u štakora s osteoporozom izazvanom retinoičnom kiselinom. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg⁻¹) ili alendronatom (2 ili 40 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: n = 7. Mjerenja: 18. dan, 24. dan i 30. dan.

Alendronat (40 mg kg⁻¹) vs Ikarin ($P < 0,05$)

Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze)

3.2. Indeks tjelesne težine kostiju

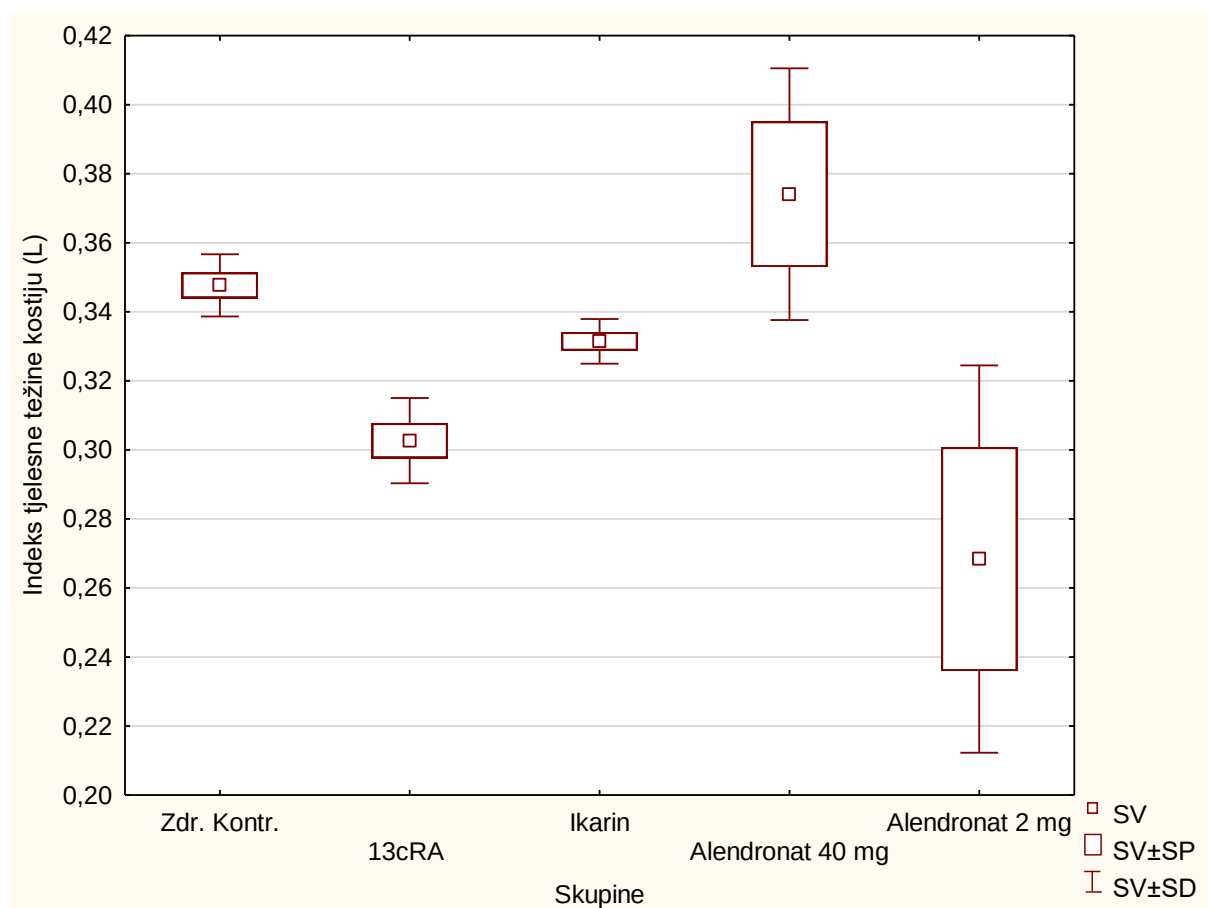
Radi točnosti rezultata indeks težine kosti izračunat je kao omjer težine kosti i tjelesne težine svake pojedinačne životinje. Po završetku pokusa vidljiva je statistički značajna promjena indeksa tjelesne težine desne bedrene kosti (Slika 13) između obrade životinja s 13cRA u odnosu na zdravu kontrolu ($P < 0,01$). Također je zabilježena statistički značajna razlika između 13cRA i skupine obrađene alendronata u dozi od 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,01$). Kod lijeve bedrene kosti (Slika 14) statistički značajna razlika je uočena između 13cRA i zdrave kontrole ($P < 0,05$) te između 13cRA i alendronata u dozi od 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$).



Slika 13. Učinak ikarina ili alendronata na indeks težina desnih (D) bedrenih kostiju u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini ($n = 7$). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SP$.

Zdr. Kontr. vs 13cRA ($P < 0,001$); 13cRA vs Ikarin ($P < 0,05$); 13cRA vs Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,01$)

Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška; SD-standardna devijacija



Slika 14. Učinak ikarina ili alendronata na indeks težina lijevih (L) bedrenih kostiju u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini ($n = 7$). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SP$.

Zdr. Kontr. vs 13cRA ($P < 0,05$); 13cRA vs Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$)

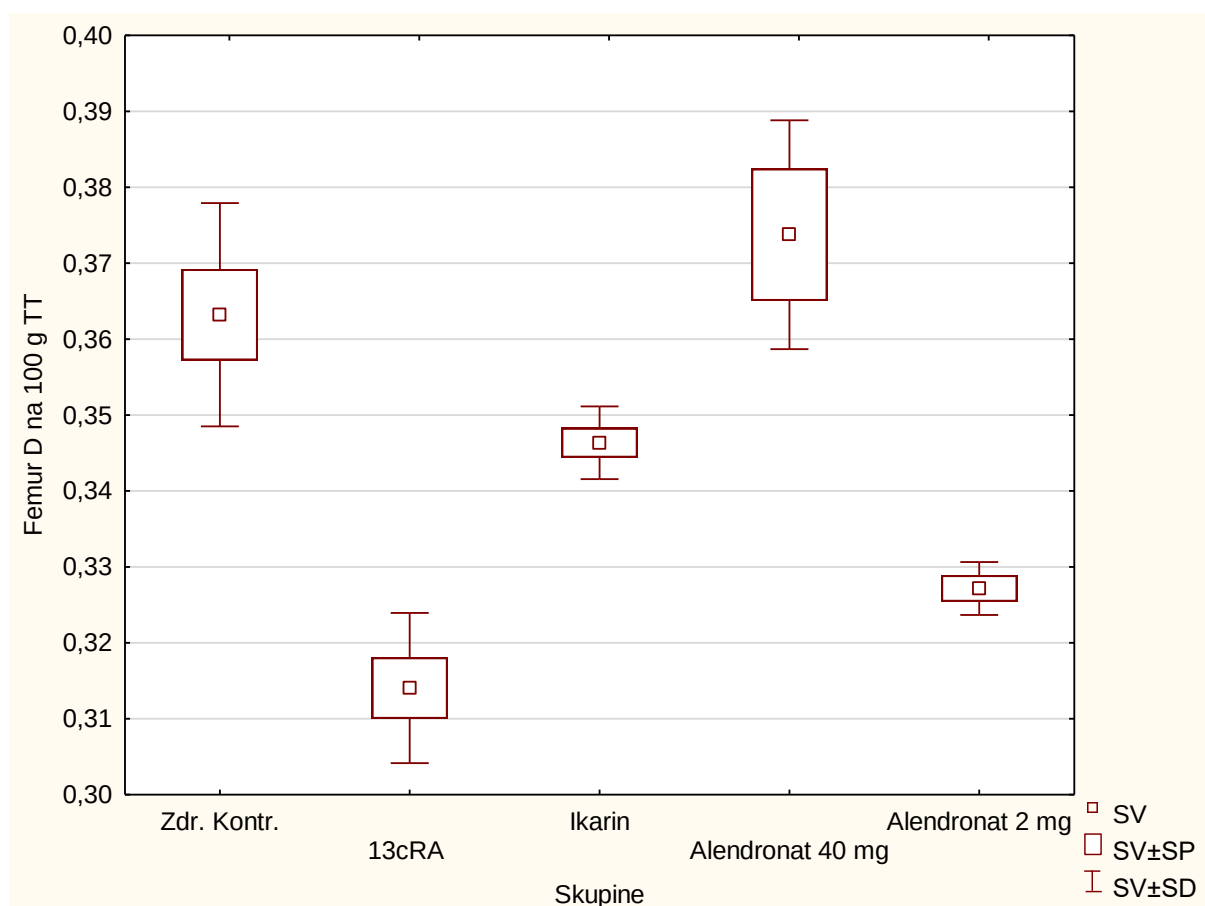
Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška; SD-standardna devijacija

3.3. Relativna težina bedrene kosti

Relativne težine kosti su preračunate na 100 g tjelesne težine radi točnosti rezultata s obzirom na gubitak ili pojačani prirast težine pojedinih skupina.

Iz rezultata mjerenja desnih bedrenih kostiju (Slika 15) vidljiv je statistički značajan porast relativnih težina kosti između: zdrave kontrolne skupine i RMO skupine ($P < 0,001$); skupine obrađene ikarinom i RMO skupine ($P < 0,05$); skupine obrađene alendronatom 40 mg kg^{-1} i RMO skupine ($P < 0,01$).

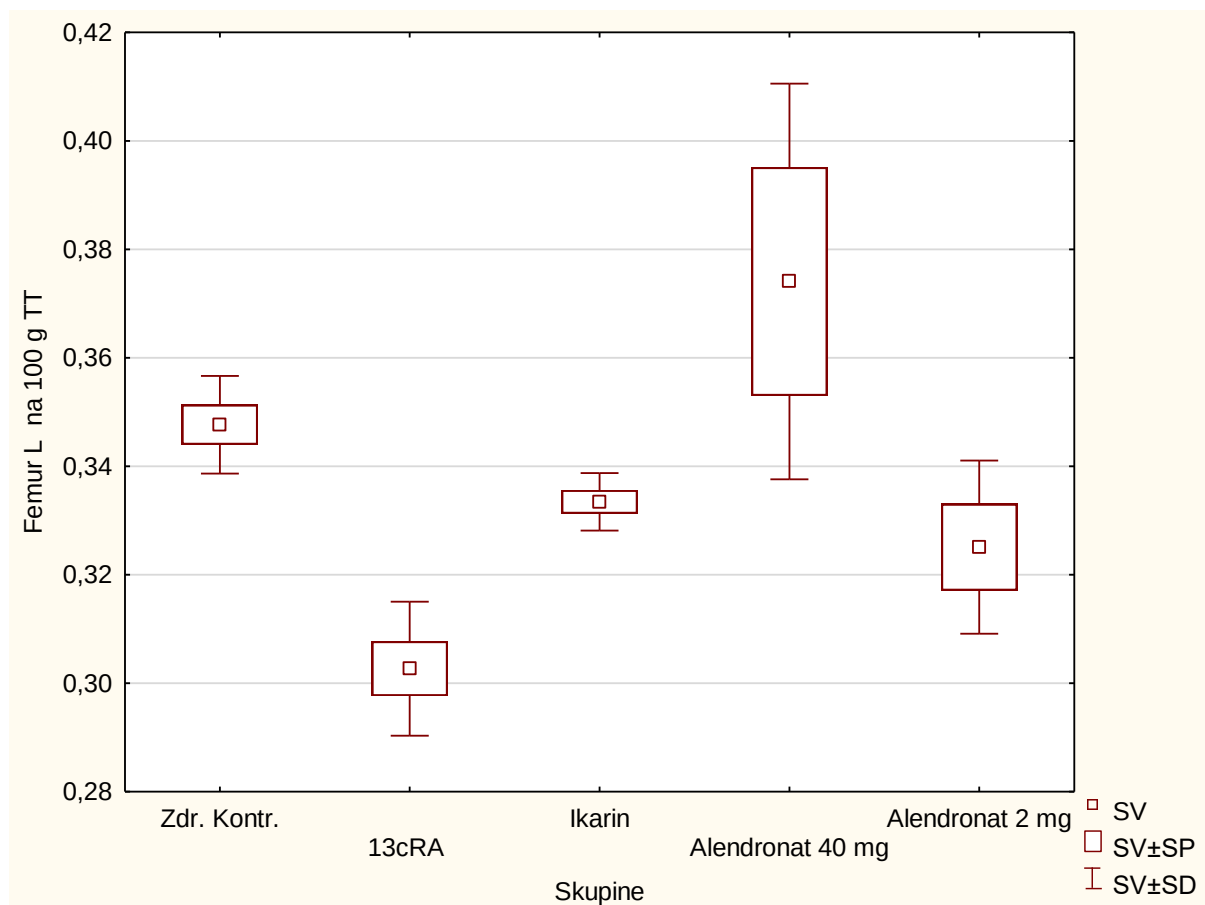
Iz rezultata mjerenja lijevih bedrenih kostiju (Slika 16) vidljiv je statistički značajan porast relativnih težina kosti između: zdrave kontrolne skupine i RMO skupine ($P < 0,05$); skupine obrađene alendronatom 40 mg kg^{-1} i RMO skupine ($P < 0,05$).



Slika 15. Učinak ikarina ili alendronata na relativnu težinu desnih (D) bedrenih kostiju (femur) u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini ($n = 7$). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SP$.

Kontr. vs 13cRA ($P < 0,001$); 13cRA vs Ikarin ($P < 0,05$); 13cRA vs Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,01$)

Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška; SD-standardna devijacija



Slika 16. Učinak ikarina ili alendronata na relativnu težinu lijevih (L) bedrenih kostiju (femur) u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini ($n = 7$). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SP$.

Zdr. Kontr. vs 13cRA ($P < 0,05$); 13cRA vs Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$)

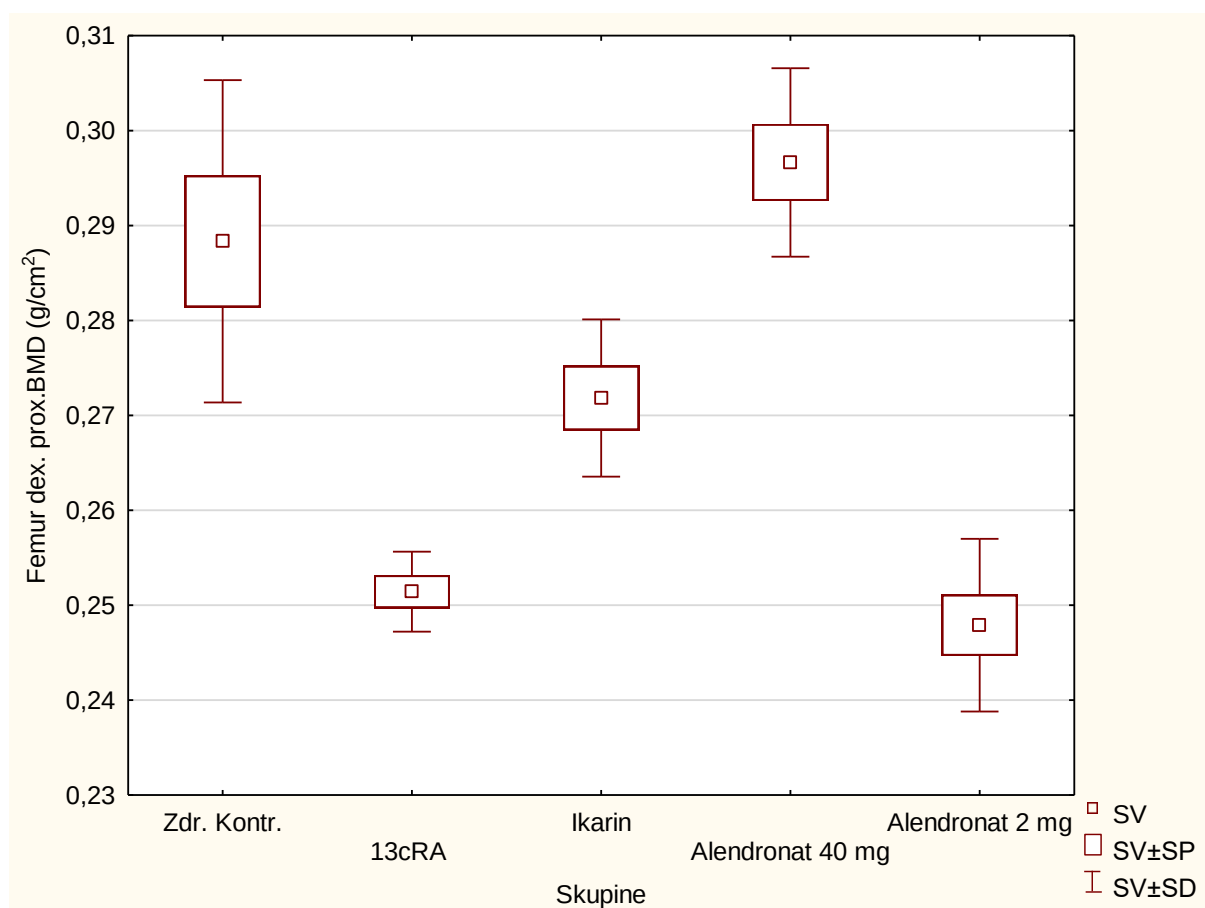
Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška; SD-standardna devijacija

3.4. Mineralna gustoća kostiju

Mineralna gustoća kosti mjerena je u proksimalnom i distalnom dijelu desne bedrene kosti. Analizom podataka utvrđen je statistički značajan porast BMD u proksimalnom dijelu kosti (Slika 17) između: zdrave kontrolne skupine i RMO skupine ($P < 0,05$); zdrave kontrolne skupine i skupine obrađene alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,01$);

Statistički značajna razlika postoji između skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) i RMO skupine u oba dijela kosti (prox. - $P < 0,01$; dist. - $P < 0,001$) kao i u skupine obrađene alendronatom $40 \text{ (mg kg}^{-1})$ u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom $2 \text{ (mg kg}^{-1})$ u oba koštana dijela ($P < 0,001$).

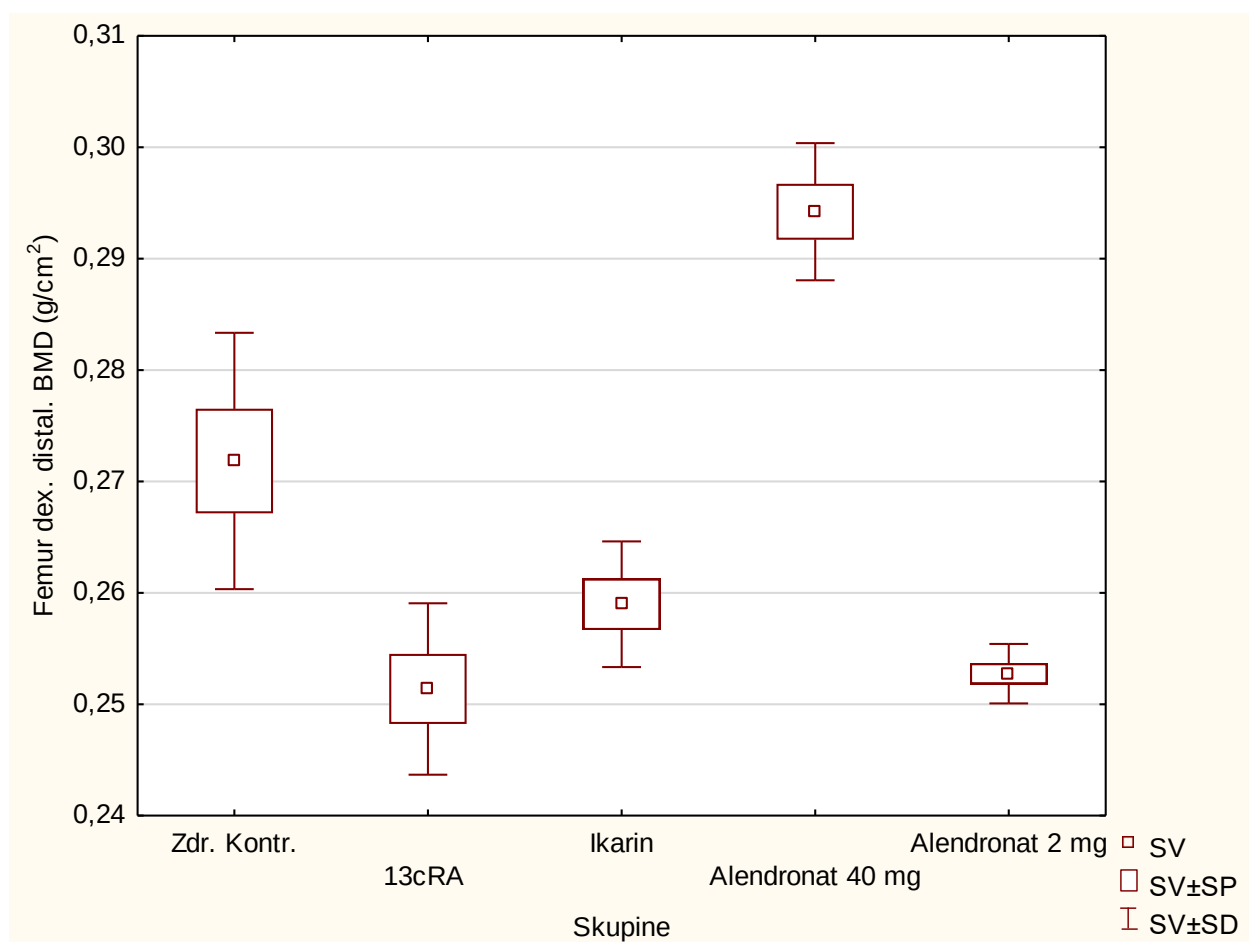
Statistički značajna razlika u distalnom dijelu kosti postoji između skupine obrađene alendronatom $40 \text{ (mg kg}^{-1})$ i skupine obrađene ikarinom ($P < 0,05$).



Slika 17. Učinak ikarina ili alendronata na BMD proksimalnog dijela bedrene kosti (femura) u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg⁻¹) ili alendronatom (2 i 40 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n= 7). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Zdr. Kontr. vs 13cRA ($P < 0,05$); Zdr. Kontr. vs Alendronat 2 mg kg⁻¹ ($P < 0,01$); 13cRA vs Alendronat 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,01$); Alendronat 40 mg kg⁻¹ vs Alendronat 2 mg kg⁻¹ ($P < 0,001$)

Kratice: Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška; SD-standardna devijacija



Slika 18. Učinak ikarina ili alendronata na BMD distalnog dijela bedrene kosti (femura) u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg⁻¹) ili alendronatom (2 i 40 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n = 7). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

13cRA vs Alendronat 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,001$); Ikarin vs Alendronat 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$);

Alendronat 40 mg kg⁻¹ vs Alendronat 2 mg kg⁻¹ ($P < 0,001$)

Kratice: Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška; SD-standardna devijacija

3.5. Pokazatelji estrogenske aktivnosti

Tablica 2 pokazuju fitoestrogensku aktivnost flavonoida. S obzirom da su životinje obrađene s alendronatom u dozi od 40 mg kg⁻¹ gubile na težini iskazali smo % razlike estrogenske aktivnosti kroz relativnu težinu maternice. Postotak estrogenske aktivnosti u odnosu na 13cRA naveden je kako slijedi: ikarin povećava relativnu težinu maternice za 43,42%, relativna težina maternice u obradi s alendronatom u dozi od 40 i 2 mg kg⁻¹ je veća za 17,43% i 40,96%. Zdrave životinje imaju % težine maternice veći za 19,49% u odnosu na model osteoporoze (13cRA). Statistički značajnu razliku relativne težine maternice u odnosu na model osteoporoze (13cRA) pokazuje ikarin ($P < 0,01$).

Tablica 2. Pokazatelji estrogenske aktivnosti ikarina ili alendronata na relativnu težinu maternice u RMO štakora

Skupine ^a	Pokazatelji estrogenske aktivnosti mjerenjem relativne težine maternice (X±SD)			
	Rel. težina maternice (g g ⁻¹)	% povećanja / RMO	Minimalna vrijednost	Maksimalna vrijednost
Zdr. Kontr.	0,239±0,029	19,49	0,205	0,263
13cRA	0,200±0,011	-	0,182	0,216
Ikarin	0,287±0,035**	43,42	0,237	0,336
Alendronat 40	0,235±0,018	17,43	0,223	0,250
Alendronat 2	0,282±0,059	40,96	0,213	0,358

^aŠtakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg⁻¹) ili alendronatom (2 i 40 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n = 7). Rezultati su prikazani kao SV±SP.

* Statistički značajno različito u odnosu na 13cRA (** $P < 0,01$).

Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška; SD-standardna devijacija

3.6. Antioksidativni učinak ikarina

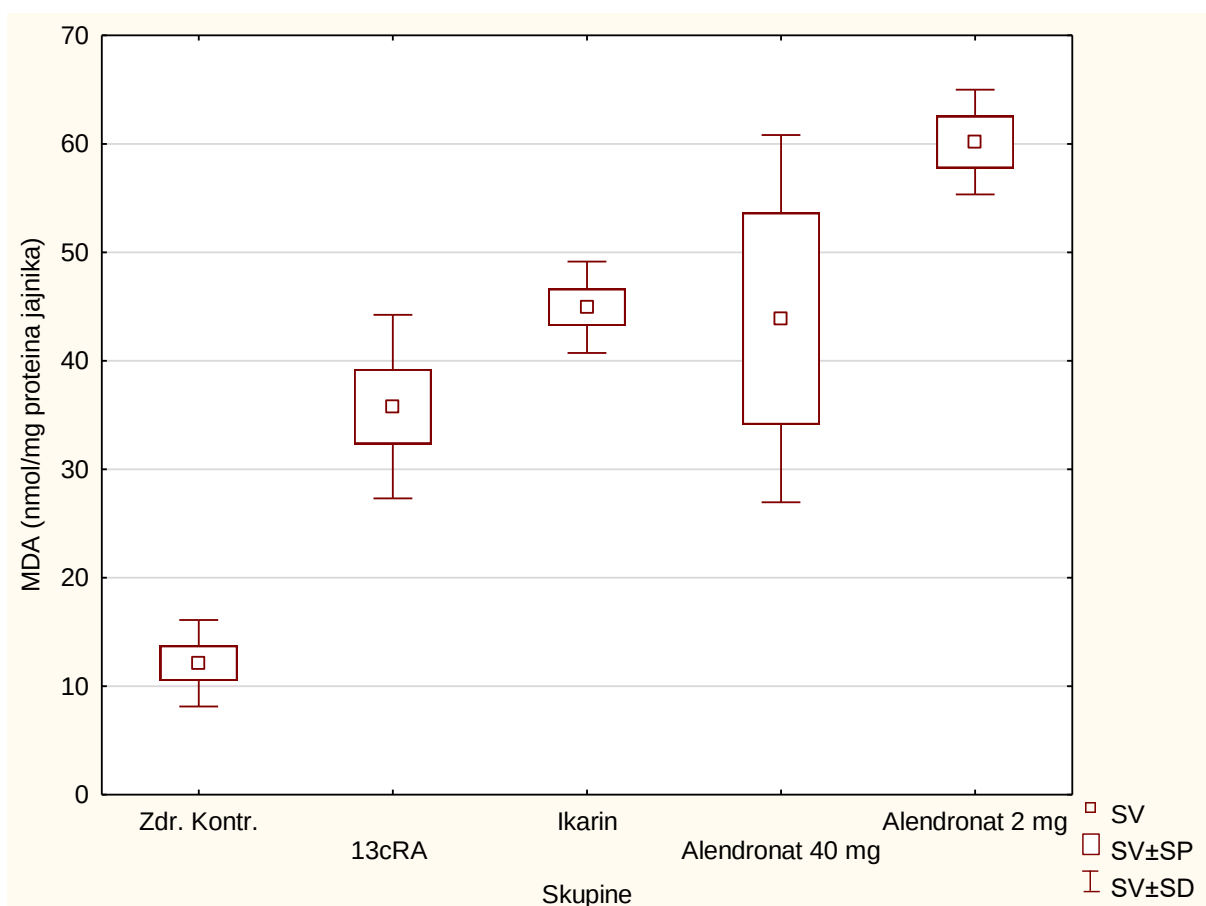
Analiza antioksidativne učinkovitosti ikarina napravljena je na stanice jajnika mjerenjem razine MDA i GSH te aktivnosti enzima SOD i CAT.

Analizom podataka zapažena je povišena koncentracija malondialdehida (MDA) u jajniku (Slika 19) kod skupine obrađene ikarinom u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg⁻¹) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,001$).

Rezultati analize GSH u stanicam jajnika vidljivi su na Slici 20. Analizom podataka koncentracije glutationa (GSH) u jajnicima obrađenih životinja (Slika 20) vidljiva je statistički značajno snižena vrijednost GSH kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,01$). Ikarin i alendronat imaju nižu vrijednost GSH u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti (Slika 20).

Aktivnost CAT pokazuje Slika 21. Analizom podataka uzoraka jajnika (Slika 21) utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti katalaze (CAT) kod skupina obrađenih ikarinom ($P < 0,05$) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu.

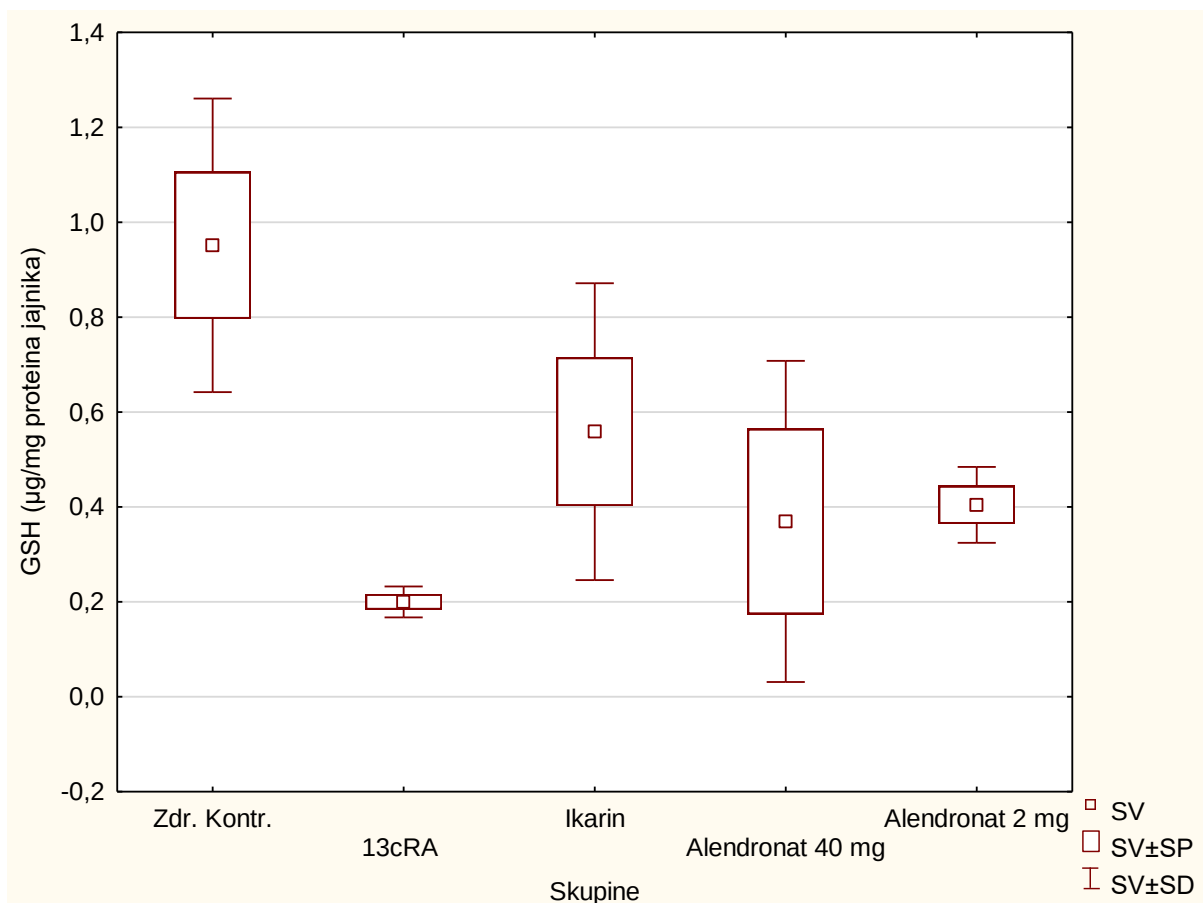
Analizom podataka uzoraka jajnika (Slika 22) utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) kod zdrave kontrolne skupine u odnosu na skupine obrađene alendronatom 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$) i alendronatom 2 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$). Također je vidljiv statistički značajan porast enzimske aktivnosti kod skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupine obrađene alendronatom 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$) i alendronatom 2 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$).



Slika 19. Učinak ikarina ili alendronata na koncentraciju malondialdehida (MDA) jajnika u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg⁻¹) ili alendronatom (2 i 40 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n = 5). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Zdr. Kontr. vs Ikarin ($P < 0,05$); Zdr. Kontr. vs Alendronat 2 mg kg⁻¹ ($P < 0,001$)

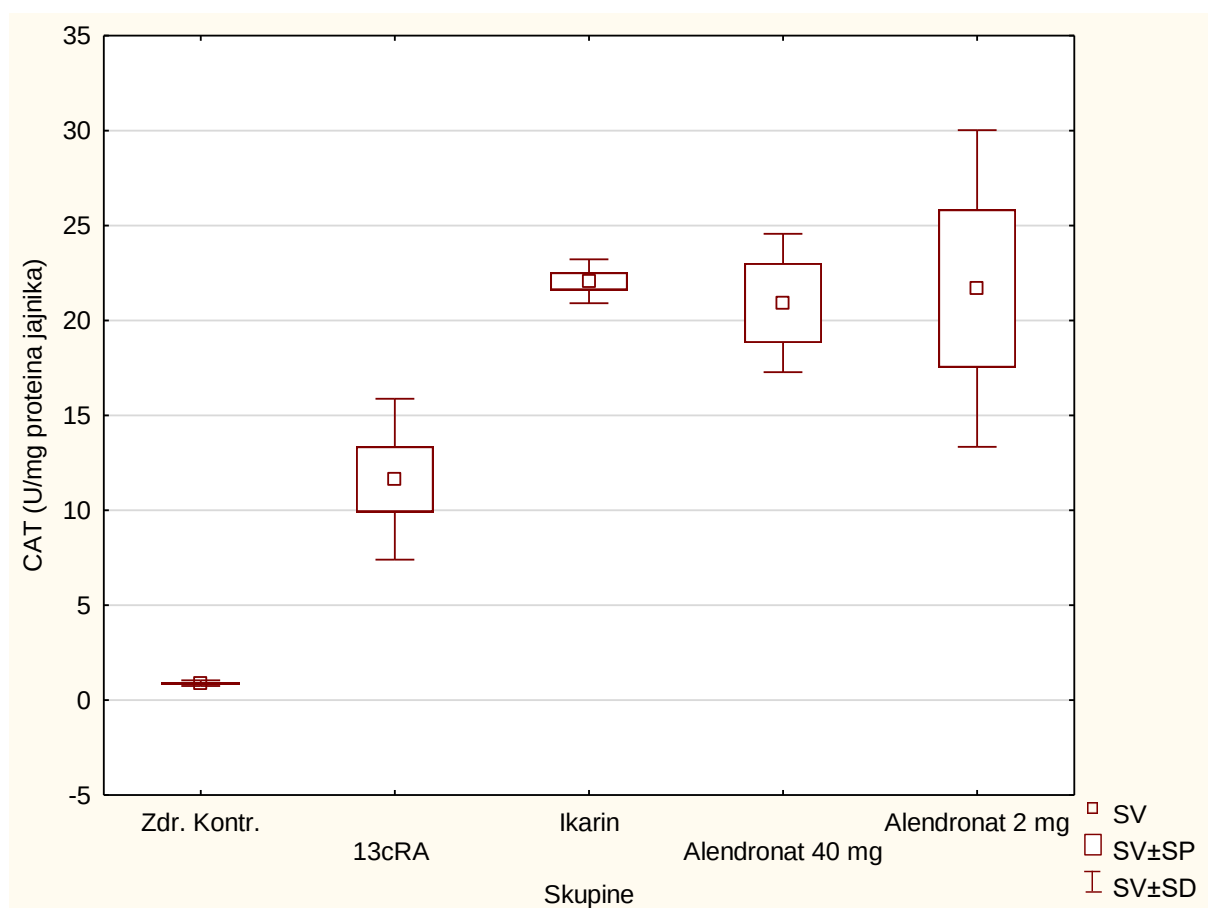
Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška; SD-standardna devijacija



Slika 20. Učinak ikarina ili alendronata na koncentraciju glutationa (GSH) jajnika u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini ($n = 5$). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SP$.

Zdr. Kontr. vs 13cRA ($P < 0,01$)

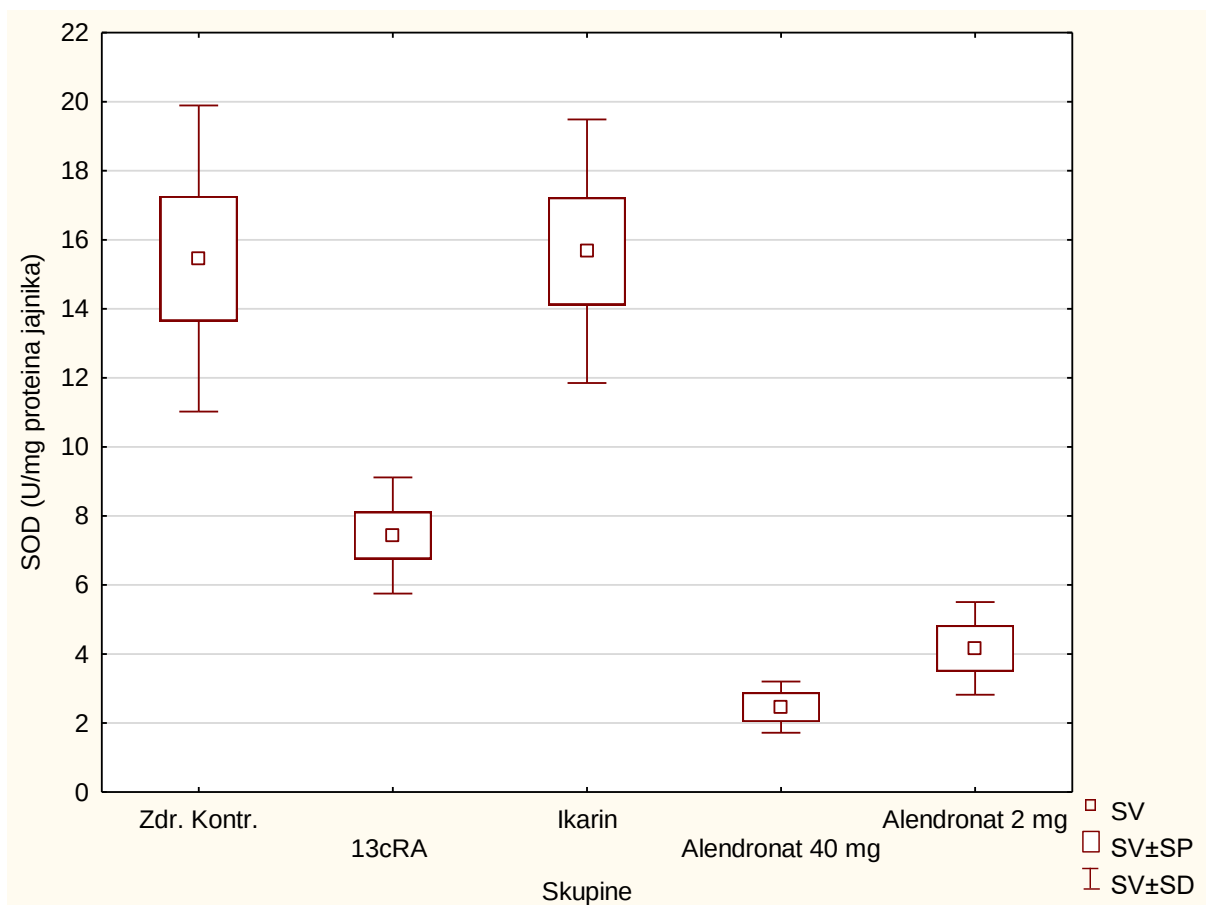
Zdr.Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška; SD-standardna devijacija



Slika 21. Učinak ikarina ili alendronata na razinu enzimske aktivnosti katalaze (CAT) jajnika u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg⁻¹) ili alendronatom (2 i 40 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n = 5). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Zdr.Kontr. vs Ikarin ($P < 0,05$)

Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška; SD-standardna devijacija



Slika 22. Učinak ikarina ili alendronata na razinu enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) jajnika u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg⁻¹) ili alendronatom (2 i 40 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n = 5). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

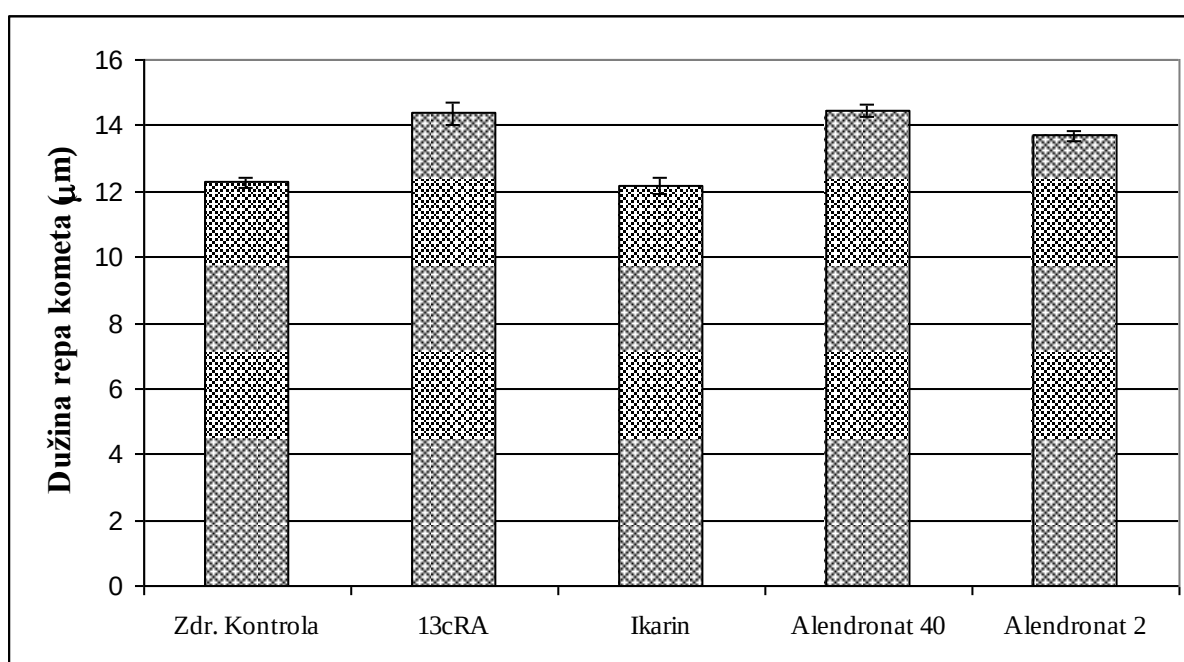
Zdr. Kontr. vs Alendronat 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$); Zdr. Kontr. vs Alendronat 2 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$); Ikarin vs Alendronat 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$); Ikarin vs Alendronat 2 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$)

Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška; SD-standardna devijacija

3.7. Komet test

Dužina repa

Dužina repa predstavlja količinu oštećene DNA; izolirana iz periferne krvi RMO štakora. Statistički značajna razlika je uočena između 13cRA i zdrave kontrole ($P < 0,001$); između 13cRA i alendronata u dozi od 2 mg kg⁻¹ ($P < 0,001$) i u dozi od 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,001$) i 13cRA i ikarina ($P < 0,001$). Ikarin ne pokazuju statistički značajnu promjenu u dužini repa u odnosu na zdravu kontrolu (Slika 23).



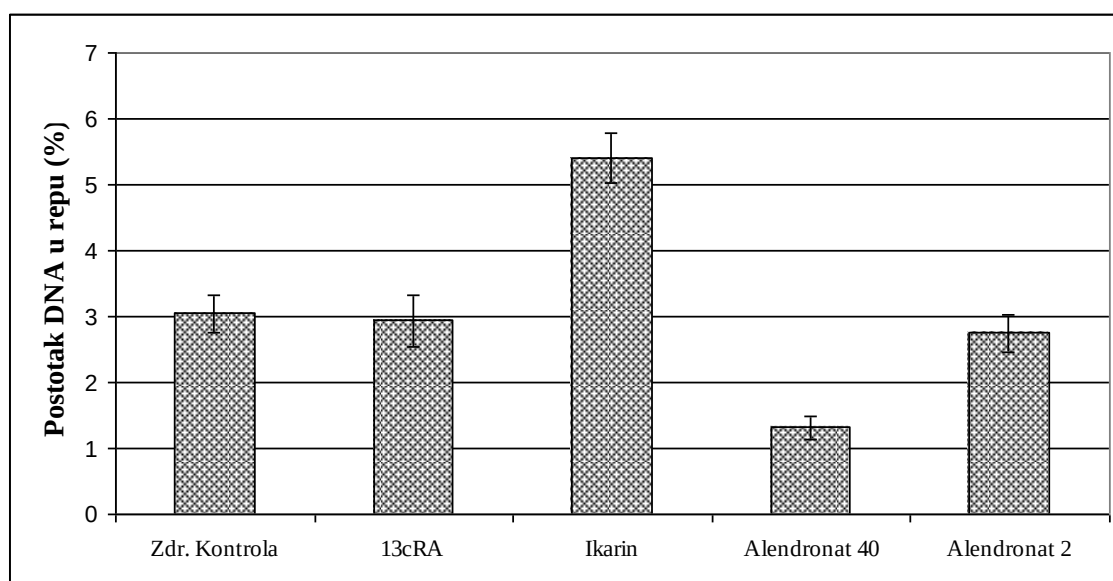
Slika 23. Učinak ikarina ili alendronata na dužinu repa kometa leukocita periferne krvi u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg⁻¹) ili alendronatom (2 i 40 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini ($n = 4$). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SP.

Zdr. Kontr. vs 13cRA $P < 0,001$); Zdr. Kontr. vs Alendronat 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,001$); 13cRA vs Ikarin ($P < 0,001$); Ikarin vs Alendronat 2 mg kg⁻¹ ($P < 0,001$); Ikarin vs Alendronat 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,001$)

Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška

Intenzitet repa

Statistički značajna razlika u intenzitetu repa (Slika 24) uočena je između zdrave kontrole i ikarina ($P < 0,01$), zdrave kontrole i alendronata u dozi od 40 mg kg^{-1} ($P < 0,001$) te 13cRA i alendronata u količini od 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$). Ikarin je pokazao statistički značajno veću ($P < 0,001$) vrijednost inteziteta repa u odnosu na alendronate u obje primjenjene doze (2 i 40 mg kg^{-1}).



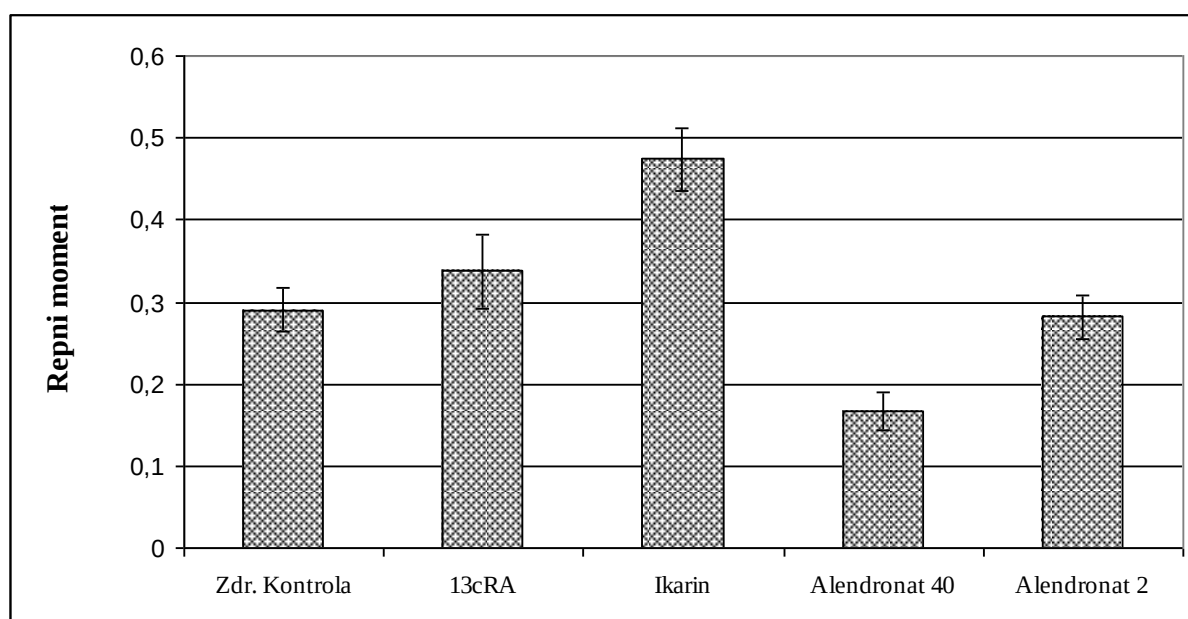
Slika 24. Učinak ikarina ili alendronata na % DNA u repu leukocita periferne krvi u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini ($n = 4$). Rezultati su prikazani kao $SV \pm SP$.

Zdr. Kontr. vs ikarin ($P < 0,01$); Zdr. Kontr. vs Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,001$); 13cRA vs Ikarin ($P < 0,001$); 13cRA vs Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); Ikarin vs Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,001$); Ikarin vs Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,001$)

Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška

Repni moment

Repni moment se obično definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu. Rezultati učinka ikarina i alendronata na repni moment uzoraka krvi pokazani su na Slici 25. Ikarin pokazuje statistički najznačajniju razliku u repnom momentu u odnosu na zdravu kontrolu ($P < 0,05$) i 13cRA ($P < 0,05$) te u odnosu na alendronate u dozi od 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,001$) i u dozi od 2 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$). Druge statistički značajne razlike nisu uočene.



Slika 25. Učinak ikarina ili alendronata na repni moment leukocita periferne krvi u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s ikarinom (100 mg kg⁻¹) ili alendronatom (2 i 40 mg kg⁻¹) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n = 4). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Zdr. Kontr. vs ikarin ($P < 0,05$); 13cRA vs Ikarin ($P < 0,05$); Ikarin vs Alendronat 2 mg kg⁻¹ ($P < 0,05$); Ikarin vs Alendronat 40 mg kg⁻¹ ($P < 0,001$)

Zdr. Kontr.-zdrava kontrola; 13cRA-(RMO-retinoični model osteoporoze); Proantoci.-proantocijanidin; SV-srednja vrijednost; SP-standardna pogreška

4. RASPRAVA

Glavni terapijski cilj u današnjoj klinici je razvoj pametnih lijekova koji će ciljano djelovati na uzrok oboljenja s minimalnim nuspojavama. Ovaj rad je imao za cilj istražiti potencijal flavonoida ikarina u liječenju osteoporoze.

Kao glavni mehanizam indukcije osteoporoze korišten je retinoični model osteoporoze (RMO). Kao induktor korištena je retinoična kiselina u dozi od 80 mg kg⁻¹ u vremenskom razdoblju od 15 dana. Retinoična kiselina je derivat vitamina A koja se veže za retinol derivirane receptore na površini stanice. Prijenos u stanice je moguć zahvaljujući NADP⁺ posrednoj dehidrogenazi i retinal dehidrogenazi koje potiču diferencijaciju osteoklasta. Liao i sur. (2009) su također pokazali da retinoična kiselina igra značajnu ulogu kod razvoja osteoporoze. Za razvoj bolesti korištena je manja doza retinoične kiseline (70 mg kg⁻¹) u istom vremenskom periodu gdje je potvrđen utjecaj retinoične kiseline na razvoj osteoporoze. Sam učinak retinoične kiseline nije do kraja poznat, međutim poznato je da višak vitamina A kod RAR α i RAR γ KO miševa (nema ekspresije RAR proteina) dovodi do brojnih abnormalnosti kostiju (Ahmadih i sur. 2011). U ovom je istraživanju došlo do narušavanja arhitekture kosti odnosno smanjenja težine i BMD bedrene kosti.

Naši rezultati ukazuju da je nakon obrade ikarinom zabilježen porast mase kao i porast mineralne gustoće kostiju (Slike 13-18), ali je značajniji učinak postignut obradom životinja s alendronatom u dozi od 40 mg. Osim RMO u nekim je radovima korištena ovarijektomija (OVX) kao metoda indukcije osteoporoze. Kod OVX modela su promjene mase drastičnije nego kod RMO. Naime kod RMO značajnije smanjenje mase uočeno je tek na kraju pokusa dok su kod OVX modela neki štakori patili od pretilosti. OVX bolje stimulira patofiziološke promjene karakteristične za postmenopauzalne posljedice kod žene (Liao i sur. 2009).

Herba Epimedii, još poznata kao biskupska kapica ili krespin, ljekovita je biljka koja se već stoljećima koristi u kineskoj narodnoj medicini za liječenje osteoporoze, seksualne disfunkcije, hipertenzije i kronične upale pluća (Wang i sur. 2016). Ikarin je glavna aktivna komponenta te biljke koji posjeduje protu-upalna, antioksidativna i neuroprotektivna svojstva, a također se pokazalo da posjeduje snažna protu-osteoporotska svojstva (Xie i sur. 2015). Thang i sur. (2012) su koristili drugu biljnu vrstu da bi istražili njeno djelovanje na postmenopauzalne posljedice žene. Puerarin, fitoestrogen izoliran iz korijena biljke *Pueraria lobata*, pokazuje pozitivan učinak na OVX štakore djelujući kao antioksidans koji povećava ekspresiju PI3K/Akt puta koji djeluje kao zaštita od oksidativnog stresa. Pokazalo se da mu je

djelovanje potentnije od estradiola te može poslužiti kao mjera prevencije razvoja osteoporoze kod postmenopauzalnih žena. Mok i sur. (2010) ukazuju da ikarin aktivira estrogen receptor-ovisnu funkciju osteoblasta u staničnoj liniji osteosarkoma štakora UMR-106 te ima anabolički učinak na kosti u ovarijektomiranih miševa C57BL/6. Ikarin ima fitoestrogeni učinak i može poslužiti kao preventivna mjera u zaštiti od osteoporoze. Provjera učinkovitosti ikarina provedena je na nekoliko razina: promjena mase životinja, BMD bedrene kosti i promjena težine bedrene kosti, antioksidativni učinak te fitoestrogeni učinak.

Naši su rezultati u potpunosti u skladu s rezultatima Mok i sur. (2010) gdje je potvrđen snažni fitoestrogenski i antioksidativni učinak ikarina na RMO modelu (Tablica 2; Slike 19-22). Ikarin pokazuje jače fitoestrogensko djelovanje u odnosu na alendronat, potiče izgradnju kostiju i suprimira aktivnost osteoklasta. Ovaj pozitivan utjecaj na koštanu izgradnju vidi se iz rezultata BMD, indeksa tjelesne mase te relativne težine kostiju (Slike 13-18). Također ikarin pokazuje antioksidativno djelovanje uglavnom bolje u odnosu na alendronat u obje ispitivane doze, što se vidi iz rezultata povišene razine GSH, SOD i CAT (Slike 19-22). Prema rezultatima ovoga istraživanja ikarin nije pokazao pad u tjelesnoj masi RMO štakora, već naprotiv prirast težine od 6,73% - 15,86% što je ujedno i najveći prirast u odnosu na ostale skupine (Slike 11 i 12). Prema tom parametru ikarin ne pokazuje toksičnost na razini cjelokupnog organizma. Nadalje, fitoestrogensko djelovanje ikarina u odnosu na RMO model je veće za 43,42% (Tablica 2).

Nedavna su istraživanja pokazala da fitoestrogeni mogu spriječiti gubitak mase kostiju vežući se za estrogenske receptore. Estrogen se veže za estrogenski receptor te na taj način aktivira transkripcijske faktore koji se potom vežu na DNA koja ovisno o signalu sintetizira određene produkte. U slučaju kada nema dovoljno estrogena fitoestrogeni se vežu za specifične estrogenske receptore te na taj način sprječavaju razgradnju kostiju. Pretpostavlja se da ikarin ima slično djelovanje kao i fitoestrogeni jer pomaže u sintezi novih osteoblasta (Sao-Keng i sur. 2010). Ukoliko uzmemo u obzir dobivene vrijednosti vidljivo je da ikarin značajno utječe na promjenu težine maternice, čija je težina direktno proporcionalna s količinom estrogena. Smanjena estrogenska aktivnost znači manju masu maternice. U pokusu su korištene obje bedrene kosti te je zabilježen porast u njihovoj masi. Kod OVX modela korišten je fitoestrogen genistein koji pokazuje slične učinke kao i ikarin. Naime i on dovodi do povećanja mase bedrenih kostiju te potiče sintezu osteoblasta (Qi i sur. 2016).

Oksidativni stres dovodi do oštećenja mitohondrija te je dokazano da igra značajnu ulogu i u osteoporozi. Može oštetiti sve stanične komponente te čak dovesti do smrti stanica. Upravo je iz tog razloga jetra razvila učinkoviti sustav obrane koji se sastoji od

antioksidativnih enzima kao što su MDA, GSH, CAT, SOD itd. (Kaplowitz i sur. 1996). Ukoliko dođe do promjena u homeostazi stanica kosti povećati će se razina tih antioksidativnih enzima. Jedna od glavnih karakteristika flavonoida jest njihova antioksidativna aktivnost koja se očituje u hvatanju slobodnih radikala. Zabilježen je značajan antioksidativni učinak ikarina na SOD i CAT (Slika 21 i 22). Učinak ikarina na SOD aktivnost jajnika je znatno veća od alendronata koji dovodi do pada SOD aktivnosti. Antioksidativni učinak ikarina na MDA i GSH je također zabilježen. Rađena su slična istraživanja s kvercetinom gdje su dobiveni slični rezultati (Messer i sur. 2015).

Komet test je korišten kao još jedna metoda za potvrdu oštećenja DNA nastalom uslijed oksidativnog stresa kojem su životinje bile izložene. Koncept ovog testa je da neoštećena DNA ostaje visoko kondenzirana u jezgri skupa s proteinima dok oštećena DNA u obliku ulomaka izlazi iz jezgre i putuje na agarози ovisno o veličini ulomaka. Količina oslobođene DNA je proporcionalna količini oštećene DNA (jednolančani i dvolančani lomovi). Na temelju fluorescencije uočavamo tzv. “rep” oslobođene DNA, a cijela struktura podsjeća na komet. Što je duži rep to je veće oštećenje. Ikarin pokazuje statistički značajno djelovanje na repni moment što ukazuje na postojanje jednostrukih lomova koji su brzo popravljivi za razliku od alendronata gdje je dužina repa bila visoka, a repni moment mali što ukazuje na nastanak velikog broja malih ulomaka koji očitio vode stanicu u apoptozu (Slike 23-25). Smanjenja količina oštećene DNA zabilježena je i kod drugih fitoestrogena kao što su genistein i daidzein (Niwa i sur. 2013).

5. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata izveli smo zaključke kako slijedi:

1. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je moguće izazvati osteoporozu kod štakora visokim dozama retinoične kiseline.
2. Ikarin je pokazao iznimno dobar učinak u liječenju osteoporoze, a jedna od prednosti je činjenica da je prirodni pripravak, lako dostupan i ekonomski isplativ. Na njegov terapijski učinak ukazuje povećanje indeksa težine bedrenih kostiju, relativne težine kostiju i maternice te BMD.
3. Ikarin je imao slabiji osteogenetski potencijal od komercijalnog lijeka alendronata. Alendronat u većim dozama jako reducira negativne učinke osteoporoze (ciljano djelovanje na stanice kostiju).
4. Ikarin pokazuje bolji antioksidativni i fitoestrogenski učinak na stanice jajnika i maternice od alendronata (zahvaljujući mogućnosti vezanja za estrogene receptore).
5. Ikarin sprječava razgradnju kostiju, inhibira osteoklaste i potiče sintezu osteoblasta te pozitivno utječe na cijeli koštani sustav osteoporotičnih i zdravih štakora (moguće kroz aktivaciju estrogenih receptora te sintezu estrogena važnog čimbenika za održavanje homeostaze kostiju).
6. Ikarin pokazuje manji genotoksični učinak od alendronata (vidljivo iz komet testa gdje alendronat pokazuje značajan genotoksični učinak na osjetljive stanice leukocita) čime je pokazano da su prirodni pripravci prihvatljiviji za uporabu (kod određenog tipa stanica) od sintetski dobivenih spojeva poput alendronata.

6. LITERATURA

- Adlercreutz H., Mazur W. (1997): Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann. Med.* **29**: 95–120.
- Ahmadiéh H., Arabi A. (2011): Vitamins and bone health: Beyond calcium and vitamin D. *Nutr. Rev.* **69**: 584–598.
- Aebi H. (1984): Catalase, Packer L. *Methods in enzymology*. Academic press, Orlando, str. 121-126.
- Baek K. H. i sur. (2010): Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. *Calcif. Tissue. Int.* **87**(3): 226-235.
- Baranowski A., Klein A., Ritz U., Ackermann A., Anthonissen J., Kaufmann K. B. i sur. (2016): Surface functionalization of orthopedic titanium implants with bone sialoprotein. *PLoS ONE* **11**(4), e0153978.
- Berkhout J., Stone J. A., Verhamme K. M., Danhof M., Post T. M. (2016): *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* **5**(12): 656-664.
- Blair H. C., Kahn A. J., Crouch E. C., Jeffrey J. J., Teitelbaum S. 1. (1986): Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic component of bone. *J Cell Biol.* **102**: 1164-1172.
- Blair H. C., Teitelbaum S. L., Ghiselli R., Gluck S. (1989): Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* **245**: 855-857.

- Booth N. L., Piersen C. E. , Banuvar S., Geller S. E., Shulman L. P., Farnsworth N. R. (2006): Clinical studies of red clover (*Trifolium pratense*) dietary supplements in menopause: a literature review. *Menopause* **13**(2): 251-264.
- Boyce B. F., Xing L. (2006): Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**(2): 139–146.
- Canalis E., McCarthy T. L., Centrella M. (1991): Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Annu. Rev. Med.* **42**: 17.
- Cauley J. A., Cummings S. R., Seeley D. G. i sur. (1993): Effects of thiazide diuretic therapy on bone mass, fractures, and falls. *Ann. Intern. Med.* **118**: 666.
- Chin K. Y., Gengatharan D., Mohd Nasru F. S., Khairussam R. A., Ern S. L., Aminuddin S. A., Ima-Nirwana S. (2016): The effects of annatto tocotrienol on bone biomechanical strength and bone calcium content in an animal model of osteoporosis due to testosterone deficiency. *Nutrients* **8**(12): 808.
- Chen J., Shapiro H. S., Wrana J. L., Reimers S., Heersche J., Sodek J. (1991): Localization of bone sialoprotein (BSP) expression to sites of mineral tissue formation in fetal rat tissue by *in situ* hybridization. *Matrix* **11**: 133-143.
- Chen X. W., Garner S. C., Anderson J. J. (2002): Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen receptordependent pathway. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **295**: 417–422.
- Chen J. R. i sur. (2008): Protective effects of estradiol on ethanol-induced bone loss involve inhibition of reactive oxygen species generation in osteoblasts and downstream activation of the extracellular signal-regulated kinase/signal transducer and activator of transcription 3/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand signaling cascade. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324**(1): 50-59.

- Clowes J. A., Hannon R. A., Yap T. S., Hoyle N. R., Blumsohn A., Eastell R. (2002): Effect of feeding on bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements. *Bone* **30**: 886-890.
- Cooper G. S., Umbach D. M. (1996): Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J. Bone Miner. Res.* **11**: 1841–1849.
- Cotter A. A., Cashman K. D. (2005): The effect of two dietary and a synthetic phytoestrogen on transepithelial calcium transport in human intestinal-like Caco-2 cells. *Eur. J. Nutr.* **44**: 72–78.
- Cundy T., Reid I. R., Grey A. (2008): Clinical Biochemistry-metabolic bone disease, metabolic and clinical aspects. U: Marshall J. W. (ur.), Bangert S. 2nd ed. London, New York, Oxford: Churchill Livingstone, Elsevier Edinburgh, str. 629-659.
- Čepelak I., Čvorišćec D. (2009): Biokemijski biljezi pregradnje kostiju-pregled. *Biochem. Med.* **19**: 17-35.
- Dang Z., Lowik C. W. (2004): The balance between concurrent activation of ERs and PPARs determines daidzeininduced osteogenesis and adipogenesis. *J. Bone. Miner. Res.* **19**: 853–861.
- Das S., Crockett J. C. (2013): Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des. Devel. Ther.* **7**: 435-448.
- Dehghan M., Pourahmad-Jaktaji R., Farzaneh Z. (2016): Calcitonin receptor AluI (rs1801197) and Taq1 calcitonin genes polymorphism in 45-and over 45-year-old women and their association with bone density. *Acta. Inform. Med.* **24**(4): 239-243.
- Diarra D., Stolina M., Polzer K., Zwerina J., Ominsky M. S., Dwyer D. i sur. (2007): Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat. Med.* **13**: 156-163.

- Dong T. T., Zhao K. J., Gao Q. T., Ji Z. N., Zhu T. T., Li J., Duan R., Cheung A. W., Tsim K. W. (2006): Chemical and biological assessment of a chinese herbal decoction containing Radix Astragali and Radix Angelicae Sinensis: Determination of drug ratio in having optimized properties. J. Agric. Food Chem. **54**(7): 2767-2774.
- Ducy P., Desbois C., Boycem B. (1996): Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. Nature **382**: 448-452.
- Duester G. (2008): Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. Cell **134** (6): 921–931.
- Felix R., Cecchini M. G., Fleisch H. (1990). Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the *op/op* mouse. Endocrinol. **127**: 2592-2594.
- Franke A. A., Halm B. M., Kakazu K., Li X., Custer L. J. (2009): Phytoestrogenic isoflavonoids in epidemiologic and clinical research. Drug Test. Anal. **1**(1): 14-21.
- Foth D., Cline J. M., Römer T. (2000): Effect of isoflavones on mammary gland and endometrium of postmenopausal macaques (*Macaca fascicularis*). Zentralbl. Gynakol. **122**(2): 96-102.
- Flohé L., Otting F. (1984): Superoxide dismutase assays. Methods Enzymol. **105**: 93-104.
- Ganry O. (2005): Phytoestrogens and prostate cancer risk. Review. Prev Med **41**(1): 1-6.

Garnero P. (2008): New biochemical markers of bone turnover. *IBMS Bonekey* **5**: 84-102.

Gašparević-Ivanek V. (2003): Fitoestrogeni. *Medix* **9**: 90-94.

Glazier M. G., Bowman M. A. (2001): A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for traditional estrogen replacement therapy. Review. *Arch. Intern. Med.* **161**(9): 1161-1172.

Goldenberg H., Fernandez A. (1966): Simplified method for the estimation of inorganic phosphorus in body fluids. *Clin. Chem.* **12**(12): 871-882.

Golub E. E. (2009): Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochim. Biophys. Acta.* **1790**: 1592-1598.

Gordon M. K., Hahn R. A. (2010): Collagens. *Cell Tissue Res.* **339**: 247-257.

Goto T., Yamaza T., Tanaka T. (2003): Cathepsins in the osteoclast. *J. Electron. Microsc.* (Tokyo) **52**(6): 551-558.

Goyal M., Kapoor S., Ikegawa S., Nishimura G. (2016): Stickler Syndrome Type 1 with Short Stature and Atypical Ocular Manifestations. *Case Rep. Pediatr.* Volume **2016**, 3198597. doi: 10.1155/2016/3198597.

Granchi D., Caudarella R., Ripamonti C., Spinnato P., Bazzocchi A., Torreggiani E., Massa A., Baldini N. (2016): Association between markers of bone loss and urinary lithogenic risk factors in osteopenic postmenopausal women. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **30**(4 Suppl 1): 145-151.

- Gravallese E. M., Galson D. L., Goldring S. R., Auron P. E. (2001): The role of TNF-receptor family members and other TRAF-dependent receptors in bone resorption. Review. *Arthritis. Res.* **3**(1): 6-12.
- Grigoriadis A. E., Wang Z., Cecchini M. G., Hofstetter W., Felix R., Fleisch H. A., Wagner E. F. (1994): c-Fos: A key regulator of osteoclastmacrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* **266**: 443-448.
- Grippo A. A., Capps K., Rougeau B., Gurley B. J. (2007): Analysis of flavonoid phytoestrogens in botanical and ephedra-containing dietary supplements. *Ann. Pharmacother.* **41**(9): 1375-1382.
- Gutendorf B., Westendorf J. (2001): Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* **166**(1-2): 79-89.
- Hadji P., Jacob L., Kostev K. (2016). Gender- and age-related treatment compliance in patients with osteoporosis in Germany. *Patient Prefer Adherence* **10**: 2379-2385.
- Hahn T. J., Halstead L. R., Teitelbau S. L. i sur. (1979): Altered mineral metabolism in glucocorticoidinduced osteopenia: effect of 25-hydroxyvitamin D administration. *J Clin. Invest.* **64**: 655.
- Hahn M. H., Won Y. Y. (2016): Bone mineral density and fatty degeneration of thigh muscles measured by computed tomography in hip fracture patients. *J. Bone. Metab.* **23**(4): 215-221.

- Halleen J. M., Alatalo S. L., Suominen H., Cheng S., Janckila A. J., Vaananen H. K. (2000): Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* **15**: 1337-1345.
- Halliwell B. (1994): Free radicals, antioxidants, and human disease: Curiosity, cause, or consequence? *Lancet* **344**: 721–724.
- Hardcastle A. C., Aucott L., Reid D. M., Macdonald H. M. (2011): Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a Scottish population. The first study looking at associations between flavonoids and bone health in humans. *J. Bone Miner. Res.* **26**(5): 941-947.
- Harris H. (1990): The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta.* **186**: 133-150.
- Hock J. M., Fonseca J. (1990): Anabolic effect of human synthetic parathyroid hormone-(1-34) depends on growth hormone. *Endocrinology* **127**(4): 1804-1810.
- Horcajada M. N., Offord E. (2012): Naturally plant-derived compounds: role in bone anabolism. A comprehensive review of the role of plant-derived compounds on mechanisms relating to bone health. *Curr. Molec. Pharmacol.* **5**(2): 205–218.
- Huang J., Yuan L., Wang X., Zhang T. L., Wang K. (2007): Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic, but suppress osteoclastic, differentiation and activity in vitro. *Life Sci* **81**(10): 832-840.
- Hunter G. K., Goldberg H. A. (1994): Modulation of crystal formation by bone phospho proteins: Role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J* **302**: 175-179.
- Hurwitz M. C. (1993): Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* **260**: 623.

- Jia T. L., Wang H. Z., Xie L. P., Wang X. Y., Zhang R. Q. (2003): Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. *Biochem. Pharmacol.* **65**(5): 709-715.
- Johnell O., Gullberg B., Kanis J. A., Allander E., Elffors L., Dequeker J. i sur. (1995): Risk factors for hip fracture in European women: the MEDOS Study. Mediterranean Osteoporosis Study. *J. Bone Miner. Res.* **10**(11): 1802–1815.
- Johnell O., Kanis J. A. (2006): An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* **17**(12): 1726-1733.
- Johnson E. B., Muto M. G., Yanushpolsky E. H., Mutter G. L. (2001): Phytoestrogen supplementation and endometrial cancer. *Obstet. Gynecol.* **98**(5 Pt 2): 947-950.
- Joo S. S., Won T. J., Kang H. C., Lee D. I. (2004): Isoflavones extracted from *Sophorae fructus* upregulate IGF-I and TGF-beta and inhibit osteoclastogenesis in rat bone marrow cells. *Arch. Pharm. Res.* **27**(1): 99-105.
- Khaw K. T., Reeve J., Luben R., Bingham S., Welch A., Wareham N. i sur. (2004): Prediction of total and hip fracture risk in men and women by quantitative ultrasound of the calcaneus: EPIC-Norfolk prospective population study. *Lancet* **363**(9404): 197–202.
- Kaplowitz N., Tsukamoto H. (1996): Oxidative stress and liver disease. *Prog. Liver Dis.* **14**: 131-159.
- Kastirr I., Radmer S., Andresen R., Schober H. C. (2016): Osseous Consolidation of an Aseptic Delayed Union of a Lower Leg Fracture after Parathyroid Hormone Therapy - A Case Report. *J. Clin. Diagn. Res.* **10**(7): RD 03-5.

- Katz S., Weinerman S. (2010): Osteoporosis and Gastrointestinal Disease. *Gastroenterology & Hepatology* **6**(8): 506-517.
- Khosla S., Melton L. J. 3rd, Riggs B. L. (2011): The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? *J. Bone Miner. Res.* **26**(3): 441-451.
- Kilic N., Yavuz Taslipinar M., Guney Y., Tekin E., Onuk E. (2014): An investigation into the serum thioredoxin, superoxide dismutase, malondialdehyde, and advanced oxidation protein products in patients with breast cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **21**(13): 4139-4143.
- Kim J. O., Han S. H., Lee Y. H., Ahn T. K., Lim J. J., Chung Y. S., Shin D. E., Lee W. S., Han I. B., Kim N. K. (2016): Association of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene polymorphisms with osteoporotic vertebral compression fractures (OVCFs) in postmenopausal women. *Int. J. Mol. Sci.* **17**(12). pii: E2062.
- King T. J., Shandala T., Lee A. M., Foster B. K., Chen K. M., Howe P. R., Xian C. J. (2015): Potential effects of phytoestrogen genistein in modulating acute methotrexate chemotherapy-induced osteoclastogenesis and bone damage in rats. *Int. J. Mol. Sci.* **16**(8): 18293-18311.
- Kodama H., Yamasaki A., Nose M., Niida S., Ohgama Y., Abe M., Kumegawa M., Suds T. (1991): Congenital osteoclast deficiency in osteopetrotic (op/op) mice is cured by injections of macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **173**: 269-272.
- Krishnan V., Bryant H. U., MacDougald O. A. (2006): Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J. Clin. Invest.* **116**: 1202-1209.

- Kuiper G. G., Lemmen J. G., Carlsson B., Corton J. C., Safe S. H., van der Saag P. T., van der Burg B., Gustafsson J. A. (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with oestrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**: 4252–4263.
- Kwon H. Y., Ha Y. C., Yoo J. I. (2016): Health-related quality of life in accordance with fracture history and comorbidities in korean patients with osteoporosis. *J. Bone Metab.* **23**(4): 199-206.
- Laan R. F. J. M., van Riel P. L. C. M., van de Putte L. V. B. A. i sur. (1993): Low dose prednisone induces rapid reversible axial bone loss in patients with rheumatoid arthritis. A randomized, controlled study. *Ann. Intern. Med.* **119**: 963–968.
- Lacey D. L., Timms E., Tan H. L. i sur. (1998): Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**: 165-176.
- Liao E. Y., Luo X. H., Wang W. B., Wu X. P., Zhou H. D., Dai R. C., Liao H. J., Yang C. (2003): Effects of different nylestriol/levonorgestrel dosages on bone metabolism in female sprague–dawley rats with retinoic acid induced osteoporosis, *Endocrine Research* **29**(1): 23-42.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**(1): 265-275.
- Lowry M., Hall D., Brosnan J. (1985): Hydroxyproline metabolism by the rat kidney: distribution of renal enzymes of hydroxyproline catabolism and renal conversion of hydroxyproline to glycine and serine. *Metabolism* **34**: 955-961.
- Lee A. J., Hodges S., Eastell R. (2000): Measurement of osteocalcin. *Ann. Clin. Biochem.* **37**: 432-446.

- Li X. F., Xu H., Zhao Y. J., Tang D. Z., Xu G. H., Holz J., Wang J., Cheng S. D., Shi Q., Wang Y. J. (2013): Icariin augments bone formation and reverses the phenotypes of osteoprotegerin-deficient mice through the activation of Wnt/ β -Catenin-BMP Signaling. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* **2013**: 652317.
- Limer J. L., Speirs V. (2004): Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention. *Review. Breast Cancer Res.* **6**(3): 119-127.
- Liu M., Zhong C., He R., Chen L. (2012): Icariin associated with exercise therapy is an effective treatment for postmenopausal osteoporosis. *Chin. Med. J.* **125**(10): 1784-1789.
- Mackie E. J. (2003): Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Review. Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**(9): 1301-1305.
- Malysheva K., de Rooij K., Lowik C. W. G. M., Baeten D. L., Rose-John S., Stoika R., Korchynsky O. (2016): Interleukin 6/Wnt interactions in rheumatoid arthritis: interleukin 6 inhibits Wnt signaling in synovial fibroblasts and osteoblasts. *Croat. Med. J.* **57**: 89-98.
- Manolagas S.C. (2000): Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* **21**: 115–137.
- Matsumoto N., Daido S., Sun-Wada G. H., Wada Y., Futai M., Nakanishi-Matsui M. (2014): Diversity of proton pumps in osteoclasts: V-ATPase with a3 and d2 isoforms is a major form in osteoclasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**(6): 744-749.

- Matsuno H. (2016): Assessment of distal radius bone mineral density in osteoporosis patients receiving denosumab, including those with rheumatoid arthritis and those receiving oral glucocorticoids. *Drugs RD* **16**(4): 347-353.
- McLachlan J. A., Simpson E., Martin M. (2006): Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **20**(1): 63-75.
- Melton L. J., Wahner H. W., Richelson L. S. i sur. (1986): Osteoporosis and the risk of hip fracture. *Am. J. Epidemiol.* **124**: 154.
- Messer J. G., Hopkins R. G., Kipp D. E. (2015): Quercetin metabolites up-regulate the antioxidant response in osteoblasts isolated from fetal rat calvaria. *J. Cell Biochem.* **116**(9): 1857-1866.
- Moggs J. G., Orphanides G. (2004): The role of chromatin in molecular mechanisms of toxicity. *Toxicol. Sci.* **80**: 218–224.
- Nian H., Ma M. H., Nian S. S., Xu L. L. (2009): Antiosteoporotic activity of icariin in ovariectomized rats. *Phytomedicine* **16**(4): 320-326.
- Nieves J. W. (2013): Skeletal effects of nutrients and nutraceuticals, beyond calcium and vitamin D. A comprehensive review of nutrients and bioactive compounds. *Osteoporos Int.* **24**(3): 771–786.
- Nishimura R., Hata K., Matsubara T., Wakabayashi M., Yoneda T. (2012): Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *J. Biochem.* **151**(3): 247–254.
- Niwa A. M., Oliveira R. J., Mantovani M. S. (2013): Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of soy phytoestrogens using micronucleus and comet assays of the peripheral blood of mice. *Genet. Mol. Res.* **12**(1): 519-527.

- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**(2): 351-358.
- Oostra D. R., Lustberg M. B., Reinbolt R. E., Pan X., Wesolowski R., Shapiro C. L. (2015): Association of osteoprotegerin and bone loss after adjuvant chemotherapy in early-stage breast cancer. *Mol. Cell Endocrinol.* **402**: 51-56.
- Parfitt A. M. (1982): The coupling of bone formation: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* **4**: 1.
- Parfitt A. M., Mathews C. H. E., Villanueva A. R. i sur. (1983): Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis: implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. *J. Clin. Invest.* **72**: 1396.
- Parfitt A. M., Shih M. S., Rao D. S. i sur. (1992): Relationship between bone formation rate and osteoblast surface in aging and osteoporosis: evidence for impaired osteoblast recruitment in pathogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **7**(1): 116.
- Parfitt A. M., Villanueva A. R., Foldes J., Rao D. S. (1995): Relations between histologic indices of bone formation: Implications for the pathogenesis of spinal osteoporosis. *J. Bone Miner. Res.* **10**: 466–473.
- Peluso I., Raguzzini A., Serafini M. (2013): Effect of flavonoids on circulating levels of TNF- α and IL-6 in humans: a systematic review and meta-analysis. *Molec. Nutr. Food Res.* **57**(5): 784–801.
- Pie J. E., Park J. H., Park Y. H., Ryu Y. M., Kim K. N., Suh S.W., Becker K. G., Cho-Chung Y. S., Kim M. K. (2006): Effect of genistein on the expression of bone metabolism

- genes in ovariectomized mice using a cDNA microarray. *J. Nutr. Biochem.* **17**: 157–164.
- Prockop D. J., Kivirikko K. I., Tuderman L., Guzman N. A. (1979): The biosynthesis of collagen and its disorders. *New Engl. J. Med.* **301**: 13-23.
- Qi S., Zheng H. (2016): Combined Effects of Phytoestrogen Genistein and Silicon on Ovariectomy-Induced Bone Loss in Rat. *Biol. Trace. Elem. Res.* pp 1-7. doi:10.1007/s12011-016-0882-1.
- Rachner T. D., Khosla S., Hofbauer L. C. (2011): Osteoporosis: now and the future. *Lancet* **377**(9773): 1276-1287.
- Ramachandran K., Mani S. K., Gopal G. K., Rangasami S. (2016): Prevalence of bone mineral density abnormalities and factors affecting bone density in patients with chronic obstructive pulmonary disease in a tertiary care hospital in southern india. *J. Clin. Diagn. Res.* **10**(9): OC32-OC34.
- Reinwald S., Weaver C.M. (2006). Soy isoflavones and bone health: a double-edged sword? Review. *J Nat Prod* **69**(3): 450-459.
- Ricard-Blum S., Ruggiero F. (2005): The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol. (Paris)* **53**: 430-42.
- Rickard D. J., Monroe D. G., Ruesink T. J., Khosla S., Riggs B. L., Spelsberg T. C. (2003): Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through oestrogen receptors alpha and beta. *J. Cell Biochem.* **89**: 633–646.
- Riggs B. L., Melton L. J. (1986): Involutional osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **314**: 1676.

- Robins S. P., Woitge H., Hesley R., Ju J., Seyedin S., Seibel M. J. (1994): Direct, enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* **9**: 1643–1649.
- Rodan G. A. (1992): Introduction to bone biology. *Bone* **13**: S3.
- Rubin C. D. (2005): Emerging concepts in osteoporosis and bone strength. *Current Medical Research and Opinion* **21**(7): 1049–1056.
- Sao-Keng M., Wen-Fang C., Wan-Ping L., Ping-Chung L., Xin-Luan W., Xin-Sheng Y., Man-Sau W. (2010): Icaritin protects against bone loss induced by oestrogen deficiency and activates oestrogen receptor-dependent osteoblastic functions in UMR 106 cells. *British Journal of Pharmacology* **159**(4): 939-949.
- Seibel M. J. (2005): Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin. Biochem. Rev.* **26**(4): 97-122.
- Shen C. L., Yeh J. K., Cao J. J., Chyu M. C., Wang J. S. (2011): Green tea and bone health: evidence from laboratory studies. *Pharmacol. Res.* **64**(2): 155–161.
- Shen C. L., von Bergen V., Chyu M. C., Jenkins M. R., Mo H., Chen C. H. i sur. (2012): Fruits and dietary phytochemicals in bone protection. *Nutr. Res.* **32**(12): 897–910.
- Shetty S., Kapoor N., Bondu J. D., Thomas N., Paul T. V. (2016): Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **20**(6): 846-852.
- Shinkai I., Ohta Y. (1996): New drugs--reports of new drugs recently approved by the FDA. Alendronate. *Bioorg. Med. Chem.* **4**(1): 3-4.
- Simon L. S. (2007): Osteoporosis. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.* **33**: 149–176.

- Simonet W. S., Lacey D. L., Dunstan C. R., Kelley M., Chang M. S., Lüthy R., Nguyen H. Q., Wooden S., Bennett L., Boone T., Shimamoto G., DeRose M., Elliott R., Colombero A., Tan H. L., Trail G., Sullivan J., Davy E., Bucay N., Renshaw-Gegg L., Hughes T. M., Hill D., Pattison W., Campbell P., Sander S., Van G., Tarpley J., Derby P., Lee R., Boyle W. J. (1997): Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**(2): 309-319.
- Simonsen C. S., Celius E. G., Brunborg C., Tallaksen C., Eriksen E. F., Holmøy T., Moen S. M. (2016): Bone mineral density in patients with multiple sclerosis, hereditary ataxia or hereditary spastic paraplegia after at least 10 years of disease - a case control study. *BMC Neurol.* **16**(1): 252.
- Smith R. (1980): Collagen and disorders of bone. *Clin. Sci.* **59**: 215-223.
- Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* **175**: 184–191.
- Tang X. L., Liu X. J., Tian Q., Zhang W. (2012): Dynamic oxidative stress and DNA damage induced by oestrogen deficiency and protective effects of puerarin and 17 β -oestradiol in ovariectomized rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **111**(2): 87-91.
- Tat S. T., Pelletier J. P., Velasco C. R., Padrines M., Pelletier J. M. (2009): New perspective in osteoarthritis: the OPG and RANKL system as a potential therapeutic target? *Keio. J. Med.* **58**: 29-40.
- Teitelbaum S. L., Tondravi M. M., Ross F. P. (1997): Osteoclasts, macrophages, and the molecular mechanisms of bone resorption. *Review. J. Leukoc. Biol.* **61**(4): 381-388.

- Teti A., Blair H. C., Teitelbaum S. L., Kahn, A. J., Koziol C. M., Konsek J., Zamboni-Zallone A., Schlesinger P. (1989): Cytoplasmic pH regulation and chloride/bicarbonate exchange in avian osteoclasts. *J. Clin. Invest.* **83**: 227-233.
- Tondravi M. M., McKercher S., Anderson K., Erdmann J. M., Quiroz M., Maki R., Teitelbaum S. L. (1996): Targeted deletion of PU.1 induces osteopetrosis rescuable by bone marrow transplantation. *Nature*, in press.
- USDA database for the flavonoid content of selected foods [Internet]. (2013) Available at: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/flav>.
- Venkatesh K., Srikanth L., Vengamma B., Chandrasekhar C., Sanjeevkumar A., Mouleshwara Prasad B. C., Sarma P. V. (2013): In vitro differentiation of cultured human CD34+ cells into astrocytes. *Neurol. India* **61**: 383-388.
- Vega D., Maalouf N. M., Sakhaee K. (2007): CLINICAL Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *Review. J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**(12): 4514-4521.
- Veldurthy V., Wei R., Oz L., Dhawan P., Jeon Y. H., Christakos S. (2016): Vitamin D, calcium homeostasis and aging. *Bone Res.* **4**: 16041.
- Wang L., Li Y., Guo Y., Ma R., Fu M., Niu J., Gao S., Zhang D. (2016): Herba Epimedii: an ancient chinese herbal medicine in the prevention and treatment of osteoporosis. *Curr. Pharm. Des.* **22**: 328–349.
- Wei R. J., Li T. Y., Yang X. C., Jia N., Yang X. L., Song H. B. (2016): Serum levels of PSA, ALP, ICTP, and BSP in prostate cancer patients and the significance of ROC curve in the diagnosis of prostate cancer bone metastases. *Genet. Mol. Res.* **15**(2).

- Weihua Z., Saji S., Mäkinen S., Cheng G., Jensen E. V., Warner M., Gustafsson J. A. (2000): Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(11): 5936-5941.
- Weinstein R. S., Manolagas S. C. (2000): Apoptosis and osteoporosis. *Am. J. Med.* **108**: 153-164.
- Whyte M. P., Mumm S. (2004): Heritable disorders of the RANKL/OPG/RANK signaling pathway. *J. Musculoskel. Neuronal Interact.* **4**: 254-267.
- Williams J. P., Jordan S. E., Barnes S., Blair H. C. (1998): Tyrosine kinase inhibitor effects on avian osteoclastic acid transport. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**: 1369–1374.
- Witko-Sarsat V., Friedlander M., Capeillere-Blandin C. i sur. (1996): Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* **49**: 1304–1313.
- Wu Q., Zhong Z. M., Pan Y., Zeng J. H., Zheng S., Zhu S. Y., Chen J. T. (2015): Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in postmenopausal osteoporosis. *Med. Sci. Monit.* **21**: 2428-2432.
- Xie X., Pei F., Wang H., Tan Z., Yang Z., Kang P. (2015): Icariin: A promising osteoinductive compound for repairing bone defect and osteonecrosis. *J. Biomater. Appl.* **30**: 290–299.
- Xie Z., He Y., Sun Y., Lin Z., Yang M., Liu Q., Liu S. (2016): Association between pulmonary fibrosis and osteoporosis in the elderly people: A case-control study. *Medicine (Baltimore)* **95**(44): 5239.

- Xu J. H., Yao M., Ye J., Wang G.D., Wang J., Cui X. J., Mo W. (2016): Bone mass improved effect of icariin for postmenopausal osteoporosis in ovariectomy-induced rats: a meta-analysis and systematic review. *Menopause* **23**(10): 1152-1157.
- Yavropoulou M. P., Yovos J. G. (2016): The molecular basis of bone mechanotransduction. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **16**(3): 221-236.
- Yildiz F. (2006): *Phytoestrogens in functional foods*. Taylor and Francis Group CRC Press, Boca Raton.
- Zeng J. H., Zhong Z. M., Li X. D. i sur. (2014): Advanced oxidation protein products accelerate bone deterioration in aged rats. *Exp. Gerontol.* **50**: 64–71.
- Zhang Z. B., Yang Q. T. (2006): The testosterone mimetic properties of icariin. *Asian J. Androl.* **8**(5): 601-605.
- Zhang G., Qin L., Shi Y. (2007): Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial. *J. Bone Miner. Res.* **22**(7): 1072-1079.
- Zhang Y. B., Zhong Z. M., Hou G. i sur. (2011): Involvement of oxidative stress in agerelated bone loss. *J. Surg. Res.* **169**: 37–42.
- Zhang X. Y., He J. W., Fu W. Z., Liu Y. J., Zhang Z. L. (2016): Associations of serum osteocalcin and polymorphisms of the osteocalcin gene with bone mineral density in postmenopausal and elderly chinese women. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* **9**(5-6): 231-242.

Zhao J., Ohba S., Shinkai M., Chung U. I., Nagamune T. (2008): Icariin induces osteogenic differentiation in vitro in a BMP- and Runx2-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**(2): 444-448.

Zhong Z. M., Bai L., Chen J. T. (2009): Advanced oxidation protein products inhibit proliferation and differentiation of rat osteoblast-like cells via NF-kappaB pathway. *Cell Physiol. Biochem.* **24**: 105–114.

7. ŽIVOTOPIS

Matea Tarabene, rođena sam 28.07.1992. godine u Splitu.

Osnovnu školu završila sam u Kaštel Lukšiću, a srednjoškolsko obrazovanje stekla sam u općoj gimnaziji „Ivan Lucić“ u Trogiru.

Preddiplomski studij biologije i ekologije mora na sveučilišnom odjelu za studije mora sveučilišta u Splitu upisala sam 2011. godine. Titulu „Sveučilišna prvostupnica biologije i ekologije mora“ stekla sam 2014. godine. Možda da dodate naslov prvostupničkog seminarskog rada i pod čijim vodstvom je izrađen.

2014. godine upisala sam diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

Tijekom studija radila sam kao laboratorijski tehničar na Zavodu za animalnu fiziologiju pod vodstvom dr.sc. Nada Oršolić, red. prof.

