Antioksidativno i antiupalno djelovanje krizina na osteoporozu izazvanu retinoičnom kiselinom u štakora

Majcen, Patrik

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:217:217111

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Patrik Majcen

ANTIOKSIDATIVNO I ANTIUPALNO DJELOVANJE KRIZINA NA OSTEOPOROZU IZAZVANU RETINOIČNOM KISELINOM U ŠTAKORA

Diplomski rad

Zagreb, 2015.

Ovaj rad, izrađen je na Animalnom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu,radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Od srca zahvaljujem mentorici, prof. dr. sc. Nadi Oršolić, na stručnom vodstvu, izuzetno korisnim savjetima,na predanosti i timskom duhu koju je uložila za vrijeme trajanja mog diplomskog rada.
Hvala Vam.

Zahvaljujem, nadalje, mojoj obitelji čija me moralna potpora dovela do završetka ovog studija. Zahvala ide i mojim prijateljima Dyani Odeh, Vedranu Balti, Antoniu Mucku koji su mi bili podrška kada god je bilo potrebno.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

ANTIOKSIDATIVNO I ANTIUPALNO DJELOVANJE KRIZINA NA OSTEOPOROZU IZAZVANU RETINOIČNOM KISELINOM U ŠTAKORA

Patrik Majcen
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Oksidacijski stres je poremećaj u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u organizmu, pri čemu je pomak ravnoteže usmjeren prema oksidaciji. Ovaj poremećaj ima za posljedicu prekomjerno stvaranje slobodnih radikala kisika, i nedostatnu aktivnost antioksidativnog sustava. Uloga radikala utvrđena je u patogenezi brojnih bolesti, uključujući i osteoporozu. U radu je istražen učinak krizina u liječenju osteoporoze izazvane intragastričnom primjenom retinoične kiseline (13cRA) u štakora u dozi od 80 mg kg^{-1} tijekom 14 dana. Krizin (100 mg kg^{-1}) ili alendronat (40 mg kg^{-1}) kao pozitivna kontrola je primijenjen slijedeći 14 dana u nizu. Učinkovitost krizina u liječenju osteoporoze pratili smo kroz promjenu mase pokusnih životinja, mase, duljine i promjera bedrene kosti, sadržaja kalcija i fosfora, te mineralne gustoće kostiju kao i biokemijskih i hematoloških odrednica. Antioksidativnu sposobnost krizina procjenili smo mjerenjem razine lipidne peroksidacije, glutationa te aktivnosti enzima katalaze i superodsid-dizmutaze u tkivu jetre, bubrega, i slezene a genotoksični učinak analizom krvi mikronukleus i komet testom. Dobiveni rezultati ukazuju da krizin ima značajnu antioksidativnu, antiupalnu i antiosteoporotsku aktivnost, te da bi njegova primjena mogla poslužiti u sprječavanju osteoporoze. Laka dostupnost, ekonomska isplativost i nedostatak toksičnosti ukazuju da krizin ima prednost u odnosu na alendronat.

(52 stranice, 24 slike, 6 tablica, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: oksidativni stres, osteoporoza, krizin, retinoična kiselina,alendronat
Voditelj: Dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor
Ocjenitelji: Dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology Graduation Thesis

THE ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF CHRYSIN ON OSTEOPOROSIS INDUCED BY RETINOIC ACID IN RATS

Patrik Majcen
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Oxidative stress is a disturbance in the balance of oxidation-reduction processes in an organism, where the shift of equilibrium is directed to oxidation. This disorder results in excessive production of free radicals of oxygen and insufficient activity of the antioxidant system. The role of the radicals is defined in the pathogenesis of numerous diseases, including osteoporosis. This paper explores the effect of chrysin in the treatment of osteoporosis induced by intragastric application of retinoic acid (13cRA) in rats at a dose of 80 mg kg^{-1} for 14 days. Chrysin (100 mg kg^{-1}) or alendronate (40 mg kg^{-1}) as a positive control was applied for 14 days.The effectiveness of chrysin in the treatment of osteoporosis wasmonitored bythe change in mass of experimental animals, weight, length and diameter of the femur, the content of calcium and phosphorus, and bone mineral density as well as biochemical and hematological determinants. The antioxidant capacity of chrysin we estimated by measuring the levels of lipid peroxidation, glutathione and catalase enzyme activity and superodsid dismutase in the liver tissue, kidney, and spleen, as the genotoxic effects analysis of blood micronucleus and comet assay. The results indicate that chrysin has significant antioxidant, antiimmflamatory and antiosteoporotic activity, and that its application could be used to prevent osteoporosis. Easy accessibility, cost-effectiveness and lack of toxicity indicate that chrysin has an advantage over alendronate.

(51 pages, 24 figures, 6 tables, original in: Croatian)
Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: oxidative stress, osteoporosis, chrysin, retinoic acid,alendonrate
Supervisor: Dr. sc. Nada Oršolić, Professor
Reviewers: Dr. sc. Nada Oršolić, Professor
Thesis accepted: 2015.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Osteoporoza 1

1.1.1 Fiziološki i okolišni čimbenici 2

1.1.2 Prehrana 3

1.1.2.1. Fitoestrogeni 3

1.2. Oksidacijski stres 4

1.2.1. Reakcija organizma na oksidacijski stres 5

1.3. Flavonoidi 7

1.3.1. Zaštitna uloga flavonoida u biološkim sustavima 8

1.3.2.Krizin 9

1.4. Cilj istraživanja 10

2. MATERIJALI I METODE 11

2.1 Materijali 11

2.1.1.Pokusne životinje 11

2.1.2. Pripravci korišteni u istraživanju 11

2.2 Metode 12

2.2.1.Protokol istraživanja 12

2.2.2 Praćenje promjene mase životinja 12

2.2.3. Određivanje hematoloških i biokemijskih parametara u krvi iserumu 13

2.2.4. Fizikalna mjerenja kosti i određivanje ukupnog kalcija (Ca) i fosfora (P) 13

2.2.5.Metoda određivanja fosfora i kalcija 14

2.2.5a Određivanje kalcija 14

2.2.5.b Određivanje fosfora 14

2.2.6. Mjerenje mineralne gustoće kostiju (BMD) 15

2.3 Kvantitativna analiza aktivnosti antioksidacijskih enzima 15

2.3.1. Određivanje količine proteina po Lowryju 15

2.3.2. Mjerenje količine lipidne peroksidacije 16

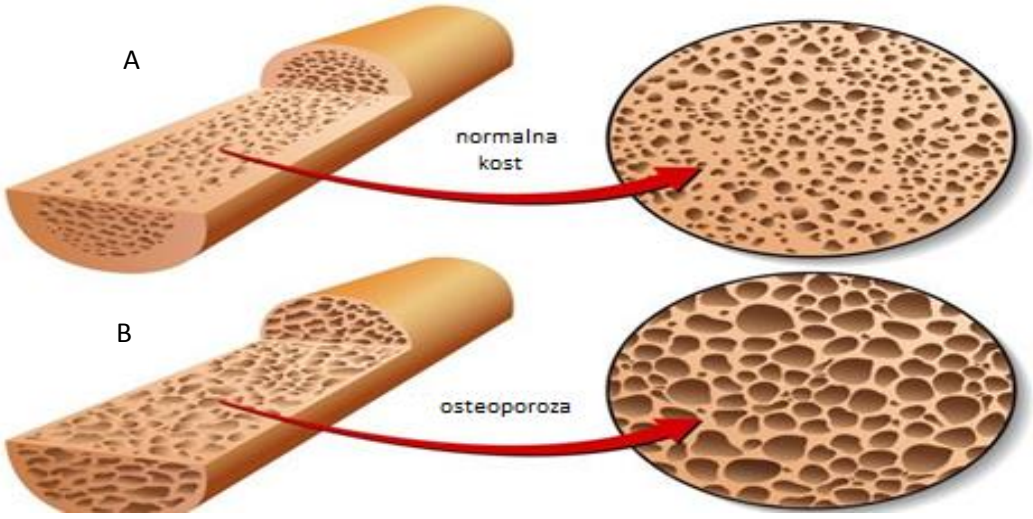
2.3.3. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa (GSH) 17

2.3.4. Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) 17
2.3.5. Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze 17
2.4. Genotoksična analiza 18
2.4.1. Mikronukleus test 18
2.4.2. Komet test 18
2.6. Statistička obrada podataka 20
3.REZULTATI 21
3.1 Vrijednosti promjene tjelesne težine 21
3.2 Rezultati određivanja hematoloških i biokemijskih parametara u krvi i serumu 22
3.3. Učinak krizina na fizikalne značajke kostiju štakora s RBM 26
3.4.Učinak krizina na vrijednost Ca i P 28
3.5. Vrijednosti BMD kod primjene krizina u RBM 29
3.6. Vrijednosti lipidne peroksidacije (MDA) 31
3.7. Vrijednosti koncentracije ukupnog glutationa (GSH) 34
3.8. Vrijednosti enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) 37
3.9. Vrijednosti enzimske aktivnosti katalaze (CAT) 40
3.10. Rezultati mikronukleus testa 43
3.11. Rezultati komet testa 44
3.12. Rezultati razine citokina u serumu 44
4. RASPRAVA 46
5. ZAKLJUČAK 49
6. LITERATURA 50

1. UVOD

1.1. Osteoporoza

Osteoporoza, čiji naziv potječe od latinske riječi za porozne kosti je zdravstveno stanje tj.progresivan poremećaj prilikom kojeg smanjena koštana masa i promijenjena mikroarhitektura kosti (Slika 1) dovode do povećanog rizika od prijeloma. Dijeli se na primarnu i sekundarnu osteoporozu. Primarna osteoporoza se odnosi na stanja koja s drugim kroničnim bolestima nisu povezana i najčešće se pripisuje starenju i smanjenom funkcioniranju spolnih stanica (primjerice, smanjena razina estrogena). Sekundarna osteoporoza je s druge strane uvjetovana drugim zdravstvenim problemima. Primjerice, kosti zahvaćene osteoporozom toliko su krhke da se prijelomi događaju uslijed minimalne traume, ponekad i prilikom svakodnevnih aktivnosti. 1948. godine predložena je ideja (Albright i Reifenstein) po kojoj se primarna osteoporoza može odjeliti na dva slučaja:jedan povezan s padom razine estrogena u menopauzi, a drugi sa starenjem. Ideju su razradili Riggs i sur. (1982) koji su predložili termin "osteoporoza tipa 1" za gubitak trabekularne kosti poslije menopauze te "osteoporoza tipa 2" za gubitak kortikalne i trabekularne kosti kod muškaraca i žena kao posljedica starenja. Temeljem navedenog, tip 1 je izravna posljedica gubitka endogenog estrogena, dok je tip 2 posljedica dugotrajne neučinkovitosti procesa remodeliranja kosti u starosti, nedostatka kalcija i vitamina D u prehrani, poremećaja u apsorpciji minerala, te lučenja paratiroidnog hormona (Marcus i sur. 2009).



Slika 1. Prikaz normalne kosti (A) i kosti zahvaćene osteoporozom (B) (preuzeto i prilagođeno izhttp://vitafonbih.webs.com).

Osteoporotičke frakture su puno češće kod žena u menopauzi nego kod starijih muškaraca, no osteoporoza kod muškaraca je jedan od najvećih i najzanemarivanijih zdravstvenih problema (Szulc i sur. 2012). Sposobnost kosti da se odupire prijelomima ovisi o količini kosti (tj. masi), prostornoj raspodjeli (tj. obliku i mikroarhitekturi) i intrinzičnim osobinama materijala od kojih je izgrađena. Remodeliranje kosti, odnosno ravnoteža između formiranja nove kosti i resorpcije stare, složen je biološki proces i upravlja promjenama koje, u konačnici, imaju utjecaja na jačinu kostiju. Prema tome, bolesti i lijekovi koji utječu na remodeliranje kosti također će utjecati i na sposobnost kosti da se odupre prijelomima. Zbog kombinacije promjena osobina u strukturi i materijalima kosti, ukupna snaga kosti značajno opada s godinama (Marcus i sur. 2009).

Prijelomi kuka i kralježnice do kojih je došlo uslijed osteoporoze nose sa sobom povećanu smrtnost (do 20%), jer zahtijevaju hospitalizaciju, što povećava rizik od razvoja drugih zdravstvenih poteškoća kod starije populacije, poput upale pluća (Rachner i sur. 2011). U Hrvatskoj se godišnje troši oko 80 milijuna kuna za lijekove u bolesnika s osteoporozom, s tendencijom porasta 20 do 30% svake godine (Šimić i sur. 2007).

1.1.1 Fiziološki i okolišni čimbenici

Metabolizam kosti reguliran je mnogobrojnim okolišnim signalima (kemijski, mehanički, električni i ostali). Kost odgovara na navedene signale iz okoliša remodeliranjem, odnosno promjenom ravnoteže između formiranja nove kosti, te resorpcije stare kosti. Homeostaza kosti se povezuje sa tri tipa stanica: osteoblasti, osteoklasti i osteociti (Marcus i sur. 2009).

Osteoklasti su višejezgrene stanice odgovorne za resorpciju kosti. Karakteristične su po postojanju nabranog ruba i prisutnosti H^+-ATP-aze koja je zadužena za zakiseljavanje aktivnog područja resorpcije na dijelu gdje je membrana naborana, a luče i katepsin K, odgovoran za razgradnju proteina matriksa (Katagiri i Takahashi 2002). Dio citoplazme oko nabranog ruba naziva se svijetla zona, bogata aktinskim filamentima i mjesto je adhezije osteoklasta za koštani matriks. Zajedno s nabranim rubom stvara mikrookoliš za razgradnju kosti (Junqueira i Carneiro 2005). Remodeliranje kosti i aktivnost osteoklasta izravno utječe na održavanje homeostaze kalcija u tijelu (Marcus i sur. 2009).

Osteoblasti proizvode proteine koštanog matriksa, osteokalcin, osteopontin, osteonektin, te sudjeluju u mineralizaciji tkiva (Katagiri i Takahashi 2002; Pietschmann 2012).Proizvedeni koštani matriks (osteoid) služi kao podloga za mineralizaciju i proizvodnju zrele kosti.

Nadalje, osteoblasti sudjeluju i u inicijaciji resorpcije tako što luče čimbenike (M-CSF; engl. *macrophage colony-stimulating factor*, čimbenik stimulacije kolonije makrofaga) koji privlače prekursore osteoklasta te potiču njihovu diferencijaciju (Marcus i sur. 2009). Izravan fizički doticaj osteoblasta i prekursora osteoklasta nužan je za osteoklastogenezu (Takahashi i sur. 1999). Nakon potpunog sazrijevanja i izlučivanja mineraliziranog matriksa, osteoblasti se diferenciraju u osteocite (Pietschmann 2012), smještene u lakunama matriksa, od kojih svaka lakuna sadrži samo jedan osteocit, koji svojim metabolizmom održavaju koštani matriks (Junqueira i Carneiro 2005).

1.1.2 Prehrana

Na razne mehanizme, uključujući promjenu strukture kosti, stopu metabolizma kosti, endokrini sustav te homeostazu kalcija i drugih elemenata, utječu nutrijenti koji se unose prehranom (Cashman 2007). Vitamin D odgovoran je za učinkovitu apsorpciju kalcija u crijevima. Ukoliko postoji nedostatak vitamina D u organizmu, crijeva mogu apsorbirati oko 10 do 15% kalcija unesenog prehranom. U slučajevima kada vitamina D ima dostatno, tanko crijevo apsorbira i do 30% kalcija iz hrane. Najveća fiziološka uloga vitamina D je održavanje koncentracije kalcija u serumu unutar fiziološki normalnih granica. Ukoliko nema dovoljno kalcija da zadovolji potrebe tijela, vitamin D posreduje u otpuštanju kalcija iz zaliha koje su spremljene u kostima (Burckhardt i sur. 2004). Kalcij je važan za normalan razvoj i rast kostura. Dostatan unos kalcija kritičan je za postizanje optimalne koštane mase, te mora biti prisutan u topivom i ioniziranom obliku prije nego se može apsorbirati (Cashman 2007).

1.1.2.1. Fitoestrogeni

Fitoestrogeni su biljni spojevi, i predstavljaju heterogenu grupu biljnih spojeva. Trenutno ih je poznato preko 100. Neki od spojeva (primjerice stilben reservatrol) djeluju kao prirodni antioksidansi i učinak na organizam (posebno kardiovaskularni sustav) je temeljito opisan (Pilšáková i sur.2010). Nedostatak estrogena je važan čimbenik u razvoju osteoporoze kod žena te je u posljednje vrijeme naglasak na istraživanju fitoestrogena u hrani, kao sigurne alternative standardnoj hormonskoj nadomjesnoj terapiji.

Upotreba fitoestrogena,posebice u visokim koncentracijama te kod mlađih osoba, može imati nepovoljne posljedice po zdravlje, primjerice adenokarcinom endometrija, a fitoestrogenski kontaminanti u hrani mogu u ograničenoj mjeri izazvati pojavljivanje određenih karakteristika ženskog spola i u muškoj populaciji (Al-Anazi i sur. 2011), stoga pri primjeni treba biti oprezan.

1.2. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je stanje promijenjene ravnoteže u prooksidativno-antioksidacijskom sustavu organizma u korist oksidacijskog stanja, što dovodi do potencijalnog oštećenja tkiva i organa (Sies 1991). Svi aerobni organizmi za život nužno trebaju kisik, koji zbog svog visokog elektrokemijskog potencijala omogućava stvaranje energije u procesima staničnog disanja. Redukcija kisika pojedinačnim prijenosom elektrona dovodi do stvaranja slobodnih radikala, što kisik čini toksičnim (Rumora i sur. 2003).

Toksičnost kisika određena je štetnim učincima citotoksičnih reaktivnih molekula kisika, slobodnih radikala kisika, reaktivnih intermedijera kisika i oksiradikala (Oršolić i Bašić 2008). Slobodni radikali su molekule koje imaju nespareni elektron u vanjskoj ljusci i stoga su izuzetno reaktivni (nestabilni su, lako reagiraju s drugim tvarima u okolini). Slobodni radikali najvećim dijelom uključuju reaktivne spojeve kisika (engl. *reactive oxygen species* ROS), zatim reaktivne dušikove spojeve (engl.*reactive nitrogen species* – RNS) u koje ubrajamo slobodne radikale dušika (dušikov(II)-oksid, dušikov(IV)-oksid), te druge spojeve i molekule.

Mitohondriji su glavno mjesto stvaranja slobodnih radikala u stanici. Najveći dio slobodnih radikala u fiziološkim uvjetima nastaje transportom elektrona na unutrašnjoj membrani mitohondrija.Također,stanice i organizmi izloženi su različitim utjecajima iz okoliša (zračenje, toksini) koji mogu izazvati pojačano stvaranje ROS (Rumora i sur. 2003).

U stanicama se oksidativni stres pojavljuje kao rezultat jednog od tri čimbenika:

1. povećanog nastajanja ROS
2. smanjenjaantioksidativnezaštite(nemogućnostneutraliziranjautjecaja ROS ili njihovog uklanjanja)
3. nemogućnosti popravka oksidativnog oštećenja (Zhou i sur. 2009).

Porast koncentracije slobodnih radikala u organizmima gotovo uvijek ima štetnu, a može imati i pogubnu posljedicu ukoliko se takvi porasti ponavljaju ili je visoka koncentracija ROS-a kronična.

1.2.1. Reakcija organizma na oksidacijski stres

Stanice i tkiva poput kože da bi neutralizirale toksične učinke ROS-a, razvili su dobar sustav antioksidativne obrane koji se može podjeliti u dvije skupine.

Jedan sustav čine antioksidativne enzimi kao što su: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSH-Px), glutation S-transferaza (GST) i glutation reduktaza koji uklanjaju reaktivne spojeve kisika. Drugu skupine čine brojni niskomolekularni antioksidansi kao što je, β-karoten (vitamin A), askorbinska kiselina (vitamin C), α-tokoferol (vitamin E) koji također sudjeluju u procesu uklanjanja oksiradikala (Bickers i Athar 2006).

Superoksid dismutaze (SOD) su metaloenzimi koji kataliziraju dismutaciju superoksidnog aniona (O_2^-) u kisik i vodikov peroksid.

H_2O_2 se nakon toga detoksificira pomoću CAT i GPX. Smatra se da SOD imaju središnju antioksidativnu ulogu, a njihova važnost je određena i prisustvom u svim istraživanim aerobnim organizmima. Pored toga, brzina kojom SOD kataliziraju dismutaciju O_2^- bliska je difuzijskim limitima, što ih čini jednim od najaktivnijih enzima. Većina tehnika za mjerenje aktivnosti SOD su indirektne metode koje upućuju na natjecanje "hvatača" (engl. *scaveners*) s endogenim SOD za O_2^- (Kohen i Nyska 2002).

Katalaza (CAT) je enzim koji sadržava hematin prisutan u peroksisomima gotovo svih aerobnih stanica (najviše u eritrocitima i hepatocitima, manje u mišićnim, moždanim i srčanim stanicama) i služi za zaštitu stanica od toksičnih učinaka vodikova peroksida, katalizirajući njegovu razgradnju u molekularni kisik i vodu bez nastajanja slobodnih radikala. Peroksisomi su u životinjskim stanicama uključeni u oksidaciju masnih kiselina, kao i u proces sinteze kolesterola i žučne kiseline. Vodikov peroksid je nusprodukt koji nastaje oksidacijom masnih kiselina. Bijele krvne stanice proizvode vodikov peroksid koji koriste za uništavanje bakterija. U oba slučaja katalaza spriječava da vodikov peroksid nanese oštećenja samoj stanici. Molekula katalaze je tetramer sastavljena od četiri polipeptidna lanca. Svaki lanac se sastoji od više od 500 aminokiselina. Unutar ovog tetramera nalaze se i četiri porfirinske hem skupine koje su vrlo slične hemoglobinima i citokromima. Hem skupina odgovorna je za enzimatsku aktivnost katalaze.

Glutation peroksidaza je enzim koji sadržava selen (Se) u citosolu i mitohondrijima mišićnih stanica, koji katalizira redukciju vodika iz lipidnih peroksida (LOOH) s reduciranim glutationom: $2GSH + H_2O_2 \rightarrow H_2O + GSSG$. GSSG se reducira do GSH pomoću glutation reduktaze uz utrošak NADPH: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$.

GPX je vrlo rasprostranjena i ključni je antioksidativni enzim unutar većine stanica.

Ovaj enzim koristi glutation za redukciju vodikova peroksida u vodu i lipidne perokside do pojedinih alkohola, a također djeluje i kao peroksinitrit reduktaza (Oršolić i Bašić 2008).

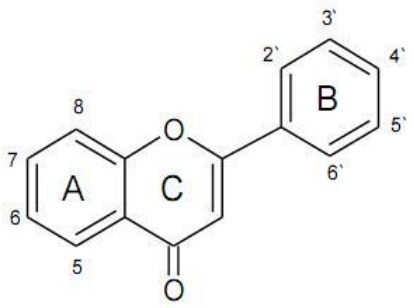
Lipidna peroksidacija ili oksidacija nezasićenih masnih kiselina najčešći je ispitivani biljeg neenzimskog pokazatelja oksidativnog stresa. Toksičnost ROS-a nije samo primarnog karaktera (substanična, stanična i histološka oštećenja), već se ona očituje i u snažnom međudjelovanju s drugim tvarima, te njihovoj mogućnosti "napada" na nukleinske kiseline tj. na genetički materijal. Kada dođe do nakupljanja slobodnih radikala u velikim količinama, oni mogu "napasti" nezasićene masne kiseline u staničnim membranama dovodeći do lanca kemijskih reakcija koje se zajedničkim imenom nazivaju lipidna peroksidacija. Kako dolazi do oštećenja masnih kiselina, tako dolazi i do nastajanja aldehida. Najčešća metoda koja se koristi za procjenu i utvrđivanje promjena u količini MDA je tzv. TBARS (tiobarbiturna kiselina) metoda. Aldehidi, posebno malondialdehid (MDA) najčešći su korišteni biljezi u praćenju oksidativnog stresa. Malondialdehid (MDA) nastaje razgradnjom kao početni produkt nakon napada slobodnih radikala. Reakcija MDA s 2-tiobarbiturnom kiselinom (TBA) najčešće se koristi u istraživanjima oksidativnog stresa. Krajnji produkt ove reakcije je reaktivni spoj 2-tiobarbiturne kiseline (TBARS). Mjerenje koncentracije reaktivnih tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS) je najčešće korištena metoda i pouzdan parametar za procjenu lipidne peroksidacije u biološkim sustavima, koji izravno govori o statusu organizma u smislu koncentracije ROS-a. Intenzivna lipidna peroksidacija u biološkim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrijednosti membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti prema H^+ i drugim ionima, te do moguće rupture stanice i otpuštanja njena sadržaja (Štefan i sur. 2007).

1.3. Flavonoidi

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću (Kazazić 2004). S obzirom da flavonoidi imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalsku aktivnost, pripisuju im se mnoga terapijska djelovanja. npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno djelovanje, a znatno utječu na boju i okus hrane (Kazazić 2004). U samim biljkama flavonoidi djeluju antioksidacijski, antimikrobno, kao fotoreceptori te kao agensi za privlačenje pozornosti, odbijanje od prehrane i zaštitu od UV zračenja. To su spojevi koji imaju važnu ulogu u održavanju i zaštiti životnih funkciji biljaka, a došavši u njih putem hrane, imaju sličnu ulogu i za druga živa bića.

Flavonoidi su velika skupina niskomolekularnih sekundarnih biljnih polifenola s istom osnovnom strukturom koju čini difenilpropanski kostur C_{15} (C_6-C_3-C_6, odnosno dva benzenska prstena (A i B) povezana s piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik (Slika 2).

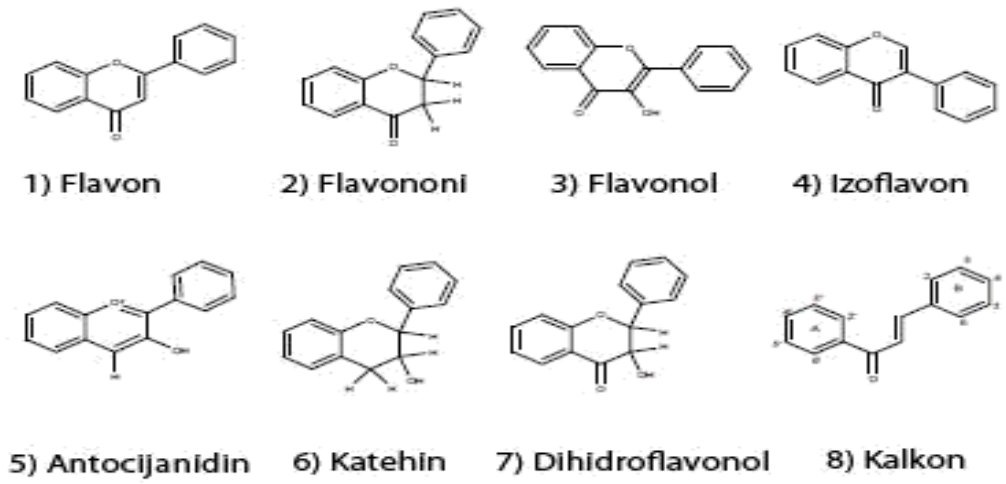
Do danas je poznato više od 6400 flavonoida (Kazazić 2004).



Slika 2. Osnovna struktura flavonoida

Flavonoidi (bioflavonoidi) se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog prstena, izuzev kalkona kod kojih je piranski prsten otvoren. Mogu biti hidroksilirani, metoksirani, glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često su esterificirani organskim kiselinama.

Nastajanje flavonoida u biljkama uvjetovano je brojnim faktorima kao što su svijetlost, uvjeti okoliša, genetika biljke, stupanj zrelosti i vrsta biljke.Prema molekularnoj strukturi, dijele se u osam klasa: flavone, flavonole, izoflavone, antocijanidine, katehine, dihidroflavonole i kalkone (Sandhar i sur. 2011) kao što je prikazano na (Slici 3).



Slika 3. Kemijske strukture različitih tipova flavonoida (preuzeto od Sandhar i sur. 2011).

1.3.1. Zaštitna uloga flavonoida u biološkim sustavima

Zaštitna uloga flavonoida u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja ("hvatanja") elektrona slobodnog radikala, kelatnog vezanja iona prijelaznih kovina (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} i Mg^{2+}), aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza. To mnogostruko djelovanje vjerojatno je odgovorno za ukupnu učinkovitost tih spojeva.
Pretpostavlja se da polifenolni antioksidansi, kao što su flavonoidi u crnom vinu, zajedno s antioksidansima iz maslinova ulja i svježega voća i povrća, kojim je bogata mediteranska kuhinja, mogu osigurati zaštitu protiv koronarnih bolesti srca (Kazazić 2004).
Flavonoidi mogu djelovati kao antioksidansi na nekoliko mogućih načina. Najvažniji je kada djeluju kao hvatači slobodnih radikala i tako prekidaju lančanu reakciju slobodnog radikala. Flavonoid kao antioksidans mora zadovoljiti dva uvjeta:

- kada je prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji, mora usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije

- iz njega nastali radikal mora biti stabilan da ne bi poticao lančanu reakciju (Kazazić 2004).

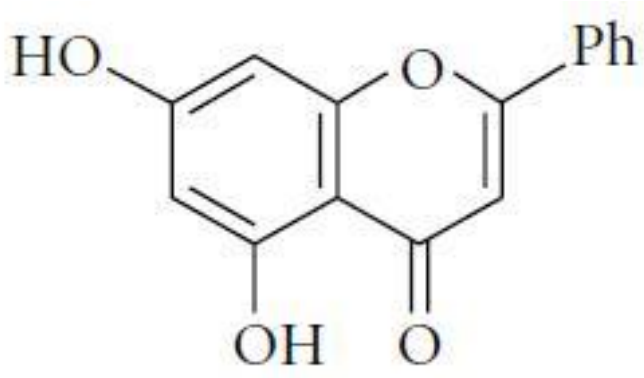
Radikali se obično stabiliziraju delokalizacijom elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom. Još jedan način antioksidativnog djelovanja je međureakcija flavonoida s drugim fiziološkim antioksidansima, npr. vitaminom C ili vitaminom E. Flavonoidi (Fl) djeluju kao antioksidansi mehanizmom hvatanja slobodnih radikala zbog čega nastaje manje reaktivni flavonoidni fenoksidni radikal (reakcije 1 i 2) (Kazazić 2004).

$$ROO\bullet + Fl\text{-}RO \rightarrow OH + Fl\text{-}O\bullet \quad (1)$$

$$HO\bullet + Fl\text{-}OH \rightarrow H2O + Fl\text{-}O\bullet \quad (2)$$

1.3.2.Krizin

Krizin (5,7-dihidroksiflavon) je sekundarni metabolit, flavonoid iz klase flavona (Slika 4) i predstavlja najveću frakciju flavonoida prisutnih u medu akacije (bagrem). Nalazi se i u cvijeću *Passiflora caerulea* i *Passiflora Incarnata*, pronađen je i u kamilici, te gljivi *Pleurotus ostreatus*. Flavoni su prisutni u voću, povrću, pićima, žitaricama i drugim proizvodima. Poput mnogih drugih flavonoida, krizin također pokazuje brojne pozitivne utjecaje na zdravlje te ima protuupalnu aktivnost.



Slika 4. Strukturna formula krizina

1.4. Cilj istraživanja

Osteoporoza,koja po Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji poprima epidemijske razmjere (Šimić i sur. 2007), zahvaća od 8 do 10% populacije, nije samo zdravstveni problem nego i društveno-ekonomski. Cilj ovog diplomskog rada je na animalnom modelu štakora istražiti protuupalnu i antioksidativnu učinkovitost prirodnog antioksidansa krizina.

Temeljni cilj jest istražiti učinkovitost flavonoida krizina u liječenju stečene osteoporoze prouzročene s 13cRA na modelu štakora kroz protuoksidativnu, protuupalnu, fitoestrogensku i regenerativnu djelotvornost krizina na osteoblaste i inhibiciju osteoklasta te naći poveznicu između biljega OS, biokemijskih odrednica, razine kalcija i fosfora, mineralne gustoće kosti (BMD) i proupalnih citokina. Rezultate ćemo usporediti s alendronatom, lijekom koji se rabi u liječenju osteoporoze (pozitivna kontrola).

2. MATERIJALI I METODE

2.1 Materijali

2.1.1. Pokusne životinje

Istraživanje smo napravili na štakorima starosti oko 20 tjedana, ženkama iz originalnog legla Spraque Dawley, Hsd, Harlan Laboratories, mase 150-200 g uzgoja ‘’Jedinice za životinje’’, Medicinskog fakulteta Osijek.
Istraživanje je provedeno prema etičkim načelima važećim u Republici Hrvatskoj (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. Pripravci korišteni u istraživanju

1.Fiziološka otopina (F.O.) (Natrii chloridi infundibile, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
2.Isotretinoin (13cRA; 13-cis-retionična kiselina)(Accutane©,Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) primijenjen u dozi od 80 mg kg^{-1}. Kapsule isotretinoina (40 mg) otopljene su u ulju da bi se dobila suspenzija isotretinoina.
3.Alendronat (Alendor©70, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska), primijenjen u dozi od 40 mg kg^{-1}
4.Krizin (5,7-dihydroxyflavone, Aldrich Ch. Co. Inc. Milwaukee WI, USA), otopljen u vodi i etanolu (0,5% v/v) primijenjen u dozi od 100 mg kg^{-1}

2.2 Metode

2.2.1.Protokol istraživanja

Istraživanje smo proveli na štakorskom modelu osteoporoze, prouzročene unosom retinoične kiseline (13cRA) tijekom 14 dana intragastričkim putem (*ig*) u dozi 80 mg/kg (Fahmy i sur. 2009; Oršolić i sur. 2014). Nakon izazivanja osteoporoze (RBM, engl. *Retinoc acid bone loss model*)životinje smo podijelili u 4 skupine; svaka skupna je sadržavala 7-10 životinja:

1. Kontrolna skupina zdravih životinja
2. Kontrolna skupina za osteoporozu (13cRA)
3. Skupina obrađena krizinom
4. Skupina obrađena alendronatom (pozitivna kontrola)

Životinjama nakon izazivanja osteoporoze smo slijedeći 14 dana u nizu davali *ig* krizin u dozi od 100 mg kg^{-1} ili alendronat u dozi od 40 mg kg^{-1}. Nakon 24 h od zadnje primjene pripravaka životinje smo žrtvovali radi uzimanja krvi i organa od ciljnog interesa (jetra, slezena, bubrezi), te natkoljenične kosti.
Odredili smo hematološke i biokemijske parametre, te procjenili genotoksični učinak pripravaka komet i mikronukleus testom. Uz navedeno, mjerili smo mineralnu gustoću kostiju, težinu, dužinu i promjer kosti, te razinu kalcija i fosfora u kostima. Antioksidativnu učinkovitost (reducirani glutation, lipidna peroksidacija, SOD, katalaza) krizina analizirali smo u stanicama jetre, bubrega i slezene. Podatke smo obradili i statistički analizirali ANOVA testom.

2.2.2 Praćenje promjene mase životinja

Procjenu toksičnosti istraživanih pripravaka (retinoična kiselina, alendronat, krizin, na razini cjelokupnog organizma pratili smo vaganjem životinja tijekom pokusa te praćenjem promjene mase. Životinje smo vagali na digitalnoj vagi: i) početkom pokusa; ii) nakon primjene retinoične kiseline i izazivanja osteoporoze; iii) na kraju pokusa nakon liječenja osteoporoze, obrade životinja krizinom,odnosno alendronatom kao pozitivnom kontrolom.

Pratili smo gubitak ili prirast mase životinja. Gubljenje na težini je pokazatelj toksičnosti; pokazatelj toksičnosti za svaku individualnu životinju je preračunat uporabom formule:
Postotak promjene u masi životinja = Završna masa - Početna masa x 100 / Završna masa

2.2.3. Određivanje hematoloških i biokemijskih parametara u krvi iserumu

Uzorke krvi za analizu hematoloških i biokemijskih parametara uzeli smo iz aksilarnog spleta krvnih žila pokusnih životinja, te stavili u heparinizirane vacuutainere. Krv smo analizirali standardnim laboratorijskim metodama. Od hematoloških odrednica odredili smo ukupni broj leukocita, eritrocita i trombocita. Nadalje, odredili smo vrijednosti hematokrita, prosječni stanični volumen eritrocita, koncentraciju hemoglobina, prosječni stanični hemoglobin, prosječnu staničnu koncentraciju hemoglobina. Hematološke pretrage određivane su na automatskom hematološkom analizatoru SysmexKX 4500 (Sysmex, Japan).

Od biokemijskih parametara odredili smo: aspartataminotranferazu, alaninaminotransferazu, alkalnu fosfatazu, laktat dehidrogenazu, bilirubin, ureu, kreatinin, kolesterol, trigliceride, ukupne proteine i razinu glukoze u krvi.

Biokemijske pretrage radili smo na analizatoru Olympus AU 400 (BeckmanCoulter) izvornim reagensima proizvođača. AST smo odredili UV metodom:supstrat L-aspartat uz piridoksal-fosfat, 37°C, (BeckmanCoulter, SAD); ALT smo odredili UV metodom (IFCC): L-alanin uz piridoksal fosfat na 37 ^{o}C; alkalnu fosfatazu smo odredili kontinuiranom fotometrijskom metodom (p-nitrofenil fosfat, AMP pufer, 37 ^{o}C).

Ureu smo odredili enzimatskom metodom sa ureazom i glutamatdehidrogenazom. Kreatinin smo odredili kontinuiranom fotometrijskom metodom sa alkalnim pikratom. C reaktivni protein(CRP) odredili smo imunoturbidimetrijskom metodom. Ukupne proteine odredili smo fotometrijskom metodom s biuret reagensom bez slijepe probe (BeckmanCoulter).

2.2.4. Fizikalna mjerenja kosti i određivanje ukupnog kalcija (Ca) i fosfora (P)

Odmah nakon vađenja femura i njihova čišćenja odredili smo težinu obiju bedrenih kostiju, njihove dužine i promjere, a desnoj bedrenoj kosti određivali smo i indeks težine kosti. Desne femure iz pokusa pripremili smo za analizu kalcija (Ca) i fosfora (P). Nakon ispiranja s deioniziranom vodom kosti smo ocjedili na filter papiru te posušili u sušioniku

(ST01/02, Instrumentarija, Zagreb) na 105 ºC, tijekom 24h u porculanskim lončićima. Nakon hlađenja i vaganja, uzorke smo grijali 24h u mufolnoj peći (Gallenkamp, Engleska) uz postepeno dizanje temperature do 450 ºC. Nakon hlađenja zaostali pepeo smo izvagali, otopili u koncentriranoj dušičnoj kiselini (HNO_3 65%, p.a. čistoće) na grijaćoj ploči te otopinu nadopunili deioniziranom vodom na određeni volumen (Blanuša i Breški, 1981). Za provjeru točnosti metoda korišten je standardni referenti materijal "Animal bone H5" (IAEA).

2.2.5. Metoda određivanja fosfora i kalcija

Uzorke smo izvagali u kvarcnim epruvetama, dodali 2 mL koncentrirane dušične kiseline i 3 mL deionizirane vode, a zatim smo ih razorili u visokotlačnom mikrovalnom uređaju UltraCLAVE IV (Milestone, Italija) i nadopunili deioniziranom vodom na određeni volumen.

2.2.5a Određivanje kalcija

Kalcij smo mjerili plamenom tehnikom atomske apsorpcijske spektrometrije uz lantan (Cl_3La) kao modifikator matrice u plamenu mješavine zraka i acetilena na instrumentu SpectrAA-300 (Varian, Australija). Sadržaj kalcija u uzorcima izrazili smo u mg kalcijapo g uzorka.

2.2.5b Određivanje fosfora

Fosfor smo mjerili spektrofotometrijski, modificiranom metodom Goldenberg i Fernandez (1966). Metoda se temelji na razvijanju modre boje fosfo-molibdata, koja nastaje reakcijom fosfata iz uzorka s molibdatom. Uzorcima smo najprije dodali reducirajući reagens (Mohrova sol s trikloroctenom kiselinom, stabilizirana tioureom), a zatim molibdatni reagens (otopina amonijevog molibdata i sumporne kiseline). Nakon razvijanja plave boje (20 min) mjerili smo apsorbanciju zračenja pri 660 nm (spektrofotometar Cary 50; Varian, Australija). Sadržaj fosfora u uzorcima izražen je u mg fosfora po g uzorka.

2.2.6. Mjerenje mineralne gustoće kostiju (BMD)

Lijeve bedrene kosti žrtvovanih životinja smo nakon vađenja spremili smo u epruvete s10%-tnim puferiranim formalinom, sve do određivanja mineralne gustoće kostiju (BMD).
Proksimalne i distalne dijelovi vrata lijeve bedrene kosti (metafize) podvgrnuli smo mjerenju za dobivanje vrijednosti koštanog područja (area – cm^2) i koštanog mineralnog sadržaja (BMC – g). Podatke za mineralnu gustoću kostiju (BMD) smo izračunali, iz odnosa navedenih parametara (g/cm^2).
Za mjerenje gore navedenih parametara, koristili smo denzitometrijsku metodu dvoenergetske rendgenske apsorpciometrije na uređaju Hologic QDR® 4000 (HologicInc., Zaventem, Belgium) s odgovarajućim softverom za male životinje 1.0 visoke razlučivosti. Za vrijeme analize navedenih parametara, slijedili smo upute proizvođača kako bi procijenili dugoročnu obnovljivost izmjerenih vrijednosti. Koeficijent varijacije (QC; engl. Coefficientvariation) za BMD bedrenih kostiju iznosio je 1,15% odnosno 1,1% (0,61%).

2.3 Kvantitativna analiza aktivnosti antioksidacijskih enzima

U uzorcima jetre,bubrega i slezene analizirali smo antioksidativnu učinkovitost krizina praćenjem razine lipidne peroksidacije (MDA) i reduciranog glutationa te aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i katalaze(CAT).

2.3.1. Određivanje količine proteina po Lowryju

U određivanju količine proteina koristili smo protokol koji su predložili Lowry i sur. (1951).
Ova metoda bazira se na reakciji Cu^{2+} iona i Folinova reagensa (komercijalni reagens razrijeđen vodom, Mt: 260,2), koji sadrži fosfovolframsku i fosfomolibdensku kiselinu, sa proteinima. Ioni Cu^{2+} vežu se u lužnatom mediju na peptidne veze i reduciraju u Cu^{+} te nastaje kompleks Cu^{+}-protein. Nakon dodatka Folinova reagensa dolazi do reakcije Cu^{+}-protein kompleksa sa Folinovim reagensom pri čemu se razvija konačno plavo obojenje otopine. Homogenate jetre,bubrega i slezene centrifugirali smo 10 minuta na 5000 okr/min te izdvojili nadtalog.

Neposredno prije upotrebe redom smo pripremili otopine:

A) 2% Na_2CO_3 u 1M NaOH, odnosno otapanjem 10 g Na_2CO_3 na 500 mL 1M NaOH;

B) 1% natrij kalij tartarat u destiliranoj vodi i

C) 0,5 % $CuSO_4$ x $5H_2O$ u destiliranoj vodi.

Tako pripremljene otopine koristili smo da bi se dobili reagens D. Reagens D smo dobili miješanjem 480 mL otopine A, 10 mL otopine B i 10 mL otopine C. Zatim smo Folinov reagens razrijedili s destiliranom vodom u omjeru 1:1. U svaku epruvetu stavili smo 100 μL nad taloga i 2 mL otopine D te inkubirali 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga smo dodali 0,2 mL otopine Folinova reagensa, a uzorke vorteksirali i ponovo inkubirali na sobnoj temperaturi 30 minuta. Aposorbanciju smo mjerili na spektrofotometru na valnoj duljini od 600 nm

Vrijednosti proteina dobili smo korištenjem baždarnog pravca s otopinama poznatih koncentracija goveđeg serum albumina (BSA) i izrazili kao miligram proteina po mililitru.

2.3.2. Mjerenje količine lipidne peroksidacije

Malondialdehid (MDA) krajnji je produkt lipidne peroksidacije kojeg smo odredili spektrofotometrijski prema Lavanya i sur. (2012). Homogenati jetre, bubrega i slezene smo naprijed razrjedili sa fosfatnim puferom (PBS) u omjeru 1:10. Nakon toga smo smjesa centrifugirali 10 minuta na 5000 okr/min. Talog smo odvojili i bacili, a nadtalog dalje koristili za mjerenje malondialdehida. Nadtalog (1mL) smo pomiješali sa prethodno 3 pripremljena reagensa, koji su sadržavali 100 μL SDS (8,1%-tni Na-dodecil sulfat), 750 μL HCl (20%-tni; pH= 3,5) i 750 μL TBA (0,8%-tna tiobarbiturna kiselina). Prilikom otapanja TBA u vodi, dodali smo malo DMSO (dimetil sulfoksid) kako bi se TBA otopila. Tako pripremljenu smjesu smo kasnije izvorteksirali i kuhali u kupelji na 95 °C jedan sat.

Nakon hlađenja, uzorke smo centrifugirali 15 minuta na 5000 okr/min. Apsorbancija smo mjerili spektrofotometrijski na 532 nm, te smo vrijednosti malondialdehida izračunali pomoću ekstincijskog koeficijenta za MDA ($\varepsilon = 1{,}56 \times 10^5\ M^{-1}$) i iskazali u nanomolima MDA po miligramu proteina (nmol/mg proteina).

2.3.3. Određivanje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)

Aktivnost reduciranog glutationa odredili smo nad talogu jetre, bubrega i slezene štakora neenzimskom kolorimetrijskom metodom s Ellmanovim reagensom. U staklenu kivetu volumena 3 mL dodali smo 100 µL nadtaloga, 5 µL HCl, 700 µL Na-pufera i 50 µL Ellmanova reagensa, tako da je ukupni volumen reakcijske smjese iznosio 855 µL. Koncentraciju GSH odredili smo spektrofotometrijskim praćenjem na 412 nm. Otopinu Na pufera priredili smo mješanjem otopine koja je sadržavala 0,3 M NaH_2PO_4 x 2 H_2O i otopine koja je sadržavala 0,3 M Na_2HPO_4 x 12 H_2O (pH=7,4). GSH vrijednosti izrazili smo u nanomolima utrošenog GSH po miligramu proteina.

2.3.4. Mjerenje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD odredili smo prema metodi po Flohe i Otting (1971). Metoda je posredna i temelji se na inhibiciji redukcije citokroma c u sustavu ksantin/ksantin oksidaza. U ovoj metodi koristili smo dvije slijepe probe. Prva slijepa proba sastojala se samo od otopine A (190 mL 0,05 mM citokroma c (29 mg citokroma c u 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA u 190 mL) i 19 mL 1 mM ksantina (3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH, teško se otapa, lagano zagrijavati), te smo apsorbanciju mjerili u spektrofotometruna 550 nm tijekom 3 min na 550 nm. Druga slijepa proba služila je za namještavanje aktivnosti ksantin oksidaze. U eppendorf-epruvetu smo stavili 1,45 mL otopine A 25 µL dH_20 i 30 µL XOD (0,8 U/mL). Odmah nakon dodavanja enzima i brzog miješanja reakcijsku smjesu prelili smo u kivetu i mjerili promjene apsorbancije, odnosno aktivnost enima ksantin oksidaze tijekom 3 min na 550 nm. Aktivnost XOD mora biti oko 0,025 U/min. Nakon što smo postigli optimalnu aktivnost SOD, analizirali smo uzorke. U svaku reakcijsku smjesu umjesto dH20 dodali smo 25 µL uzorka te odgovarajući volumen XOD i odmah nakon toga mjerili apsorbanciju u spektrofotometru. Enzimsku aktivnost mjerili smo kao postotak inhibicije aktivnosti XOD te izrazili kao $\%_{inhibicije} = 100 - (\Delta A_{uzorka}/\Delta A_{slijepaproba})x100$.

2.3.5.Mjerenje enzimske aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze odredili smo spektrofotometrijskom metodom po Aebiju (1984). U toj metodi aktivnost katalaze određuje se kao količina potrošenog H_2O_2. U reakcijsku smjesu u kivetu ukupnog volumena dodali smo 980 µL 10 mM H_2O_2, a za stanice 995 µL 10 mM

H_2O_2. Ostatak do ukupnog volumena od 1 mL bio je ne razrjeđeni uzorak. Nakon toga smo na spektrofotometru mjerili smanjenje količine H_2O_2 pri 240 nm tijekom jedne minute. Aktivnost katalaze izrazili smo preko ekstincijskog koeficjenta H_2O_2 **(**ε= 39,3 $mM^{-1}cm^{-1}$) kao U/mg proteina što odgovara μmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina.

2.4. Genotoksična analiza

2.4.1. Mikronukleus test

Pokusnim životinjama smo 24 h nakon obrade istraživanim tvarima uzeli uzorke krvi iz repne vene štakora i priredili razmaze na predmetnim stakalcima. Preparate smo obojili s fluorescencijskom bojom akridin-oranž koja se specifično veže na DNA, a broj mikronukelusa utvrdili smo brojanjem pod epifluorescencijskim mikroskopom s ekscitacijskim filterom 502-525 nm. U svakom pojedinačnom uzorku analizirali smo 2000 retikulocita u kojima smo ustanovili broj i raspodjelu mikronukelusa po svakom uzorku. Mikronukleusi fluoresciraju žuto, a citoplazma ima crveni sjaj.

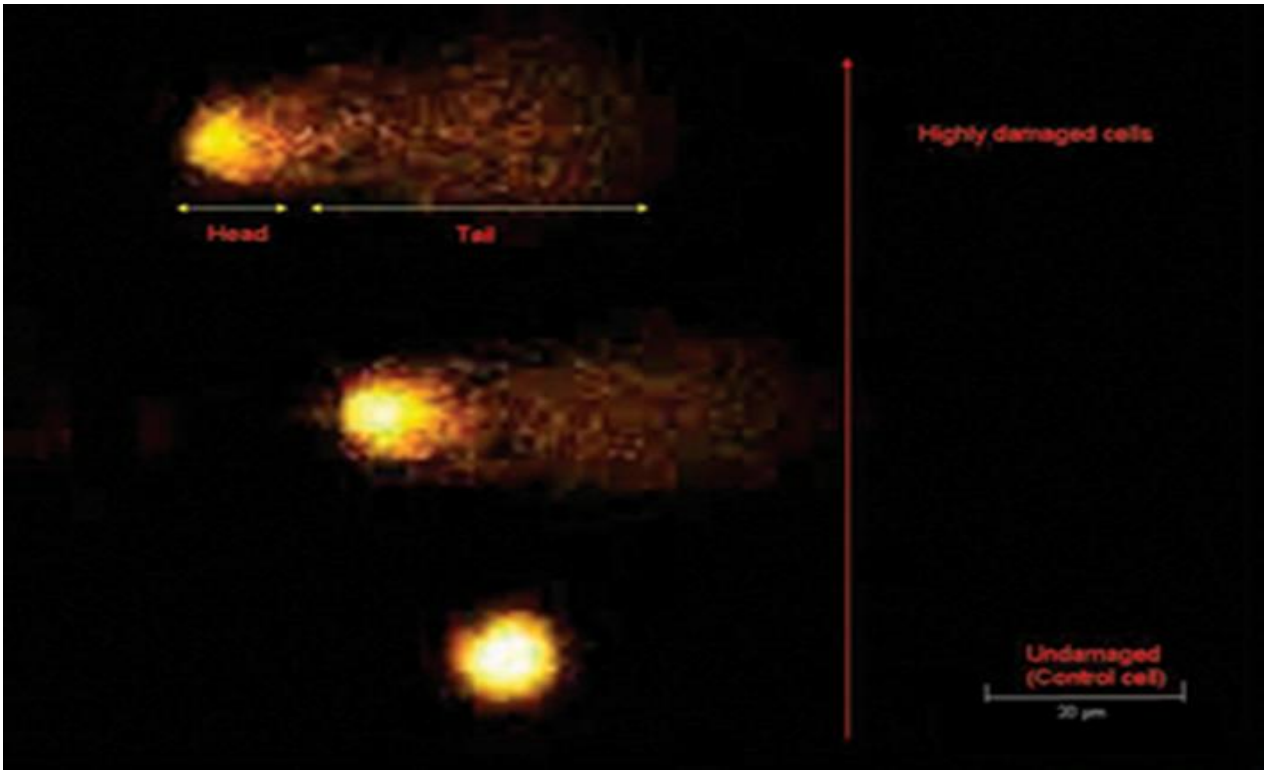
2.4.2. Komet test

U istraživanju smo primjenili standardnu izvedba komet testa koju su predložili Singh i sur. (1988).

Na brušeno predmetno stakalce Pasteurovom pipetom nakapali smo svježe priređenu otopinu 1% agaroze normalnoga tališta (NMP) koju smo pokrili pokrovnicom. Zatim smo sa stakla uklonili pokrovnicu i sloj gela nakon polimerizacije agaroze na sobnoj temperaturi.

Na osušeno staklo pomoću mikropipete nakapali smo 300 μL 0,6% NMP agaroze i pokrili pokrovnicom, te je stakalce držali 10 minuta na ledu. Na stakalca s priređenim slojem NMP agaroze nanjeli smo slijedeći sloj koji se sastojao od 100 μL 0,5% agaroze niskoga tališta (LMP) pomiješan sa 5 μL uzorka krvi uzetih iz repne vene štakora, te smo ponovno pokrili pokrovnicom. Nakon 10 minuta stajanja na ledu, taj sloj gela smo prekrili samo sa 100 μL 0,5% agaroze niskog tališta (LMP) i preparat smo ponovno držali na ledu 10 minuta. Priređenim preparatima skinuli smo pokrovnice i uroniliu pufer za lizu (NaCl, Na-laurilsarkozinat, Tris-HCl, DMSO (dimetil sulfoksid), Triton X-100), pH=10 u kojemu su stajali jedan sat na 4°C. Preparate smo iz pufera za lizu prebacili u pufer za denaturaciju (NaOH, Na2EDTA), pH=13. Denaturaciju smo provelina sobnoj temperaturi u trajanju od 20

minuta, te smo nakon toga preparate premjestili u aparat za elektroforezu. Elektroforezu smo proveli u istom puferu kao i denaturaciju, pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V, tijekom 20 minuta. Preparate smo zatim ispirali tri puta po 5 minuta u neutralizacijskom Tris-HCl puferu, pH=7,5. Nakon zadnjeg ispiranja, preparate smo bojali sa 100 µL etidij-bromida (20 µg mL^{-1}) u trajanju od 10 minuta, te smo tako obojene gelove kratko isprali u Tris-HCl puferu, pH=7,5 i pokrili pokrovnicom. Radi stabilizacije boje, preparate smo prije početka analize držali u mraku12 minuta. Preparati su analizirani pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filtrom od 515 – 560 nm. Mjerenja dužine repa,repnog intenziteta i repnog momenta provedeno je pomoću programa za analizu slike Comet Assay II, proizvođača Perceptive Instruments Ltd, te je za svaki uzorak izmjereno po 50 kometa.



Slika 5.Razina oštećenja DNA istražene komet testom.

(preuzeto http://www.libyanjournalofmedicine.net)

2.5. Određivanje citokina u serumu

Odredili smo razinu citokina IL-1β, IL-4, IL-6 i TNF-α.Uporabili smo imunološke standarde i protutijela tvrtke R&D. Analizu smo napravili klasičnom sandwich ELISA imunokemijskom metodom uz pomoć aparata EnVision Xcite Multilabel Reader (Perkin Elmer 2104-0020), JANUS automatic pipetting workstation (Perkin Elmer AJI8001) i Multidrop (Thermo 5840300).

2.6. Statistička obrada podataka

Prikupljene podatke opisali smo aritmetičkim sredinama (SV) i standarnim devijacijama (SD).

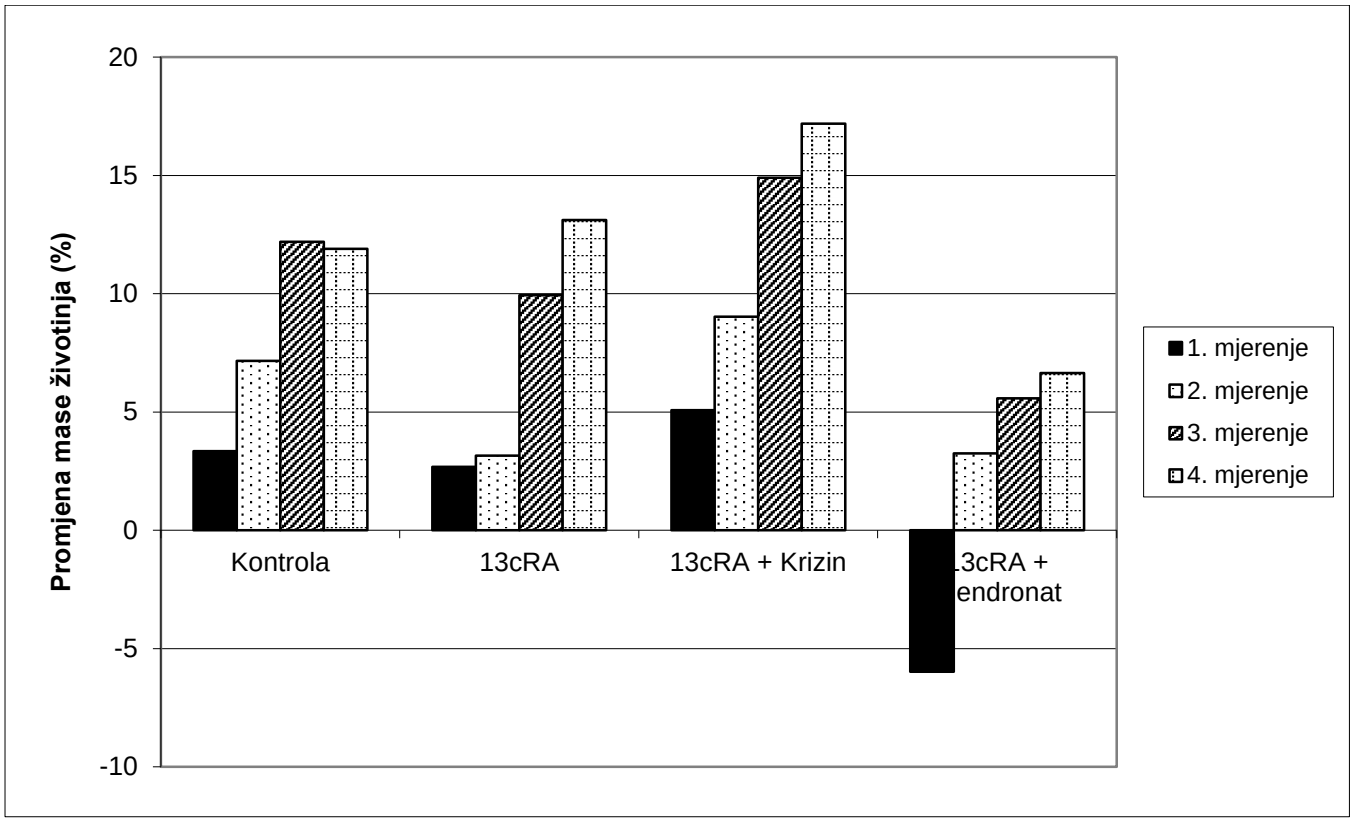
Rezultati su prikazani tablično i grafički pomoću *box-plot* prikaza.

Za pripremu podataka korišten je računalni program Microsoft Excel 2003, dok je za statističku analizu podataka korišten statistički program STATISTICA 7.0 (StatSoft, Tulsa, SAD), primjenom analize varijancije (ANOVA), te Studentovog *t*-testa. Statistička točnost određena je sa $P < 0,05$.

3. REZULTATI

3.1 Vrijednosti promjene tjelesne težine

Analiza nije pokazala statistički značajne razlike u tjelesnim težinama na početku i kraju pokusa. Postotak promjene tjelesne težine i procjena toksičnosti istraživanih pripravaka prikazana je na (Slici 6) gdje je vidljiv porast mase životinja tijekom pokusa u svim skupinama dok se alendronat pokazao kao izrazito toksičan i zapažen je sporiji prirast težine u odnosu na druge skupine. Krizin je pokazao najveći prirast težine od 17,19% (Slika 6).



Slika 6. Učinak krizinana gubitak/prirast mase u štakora s osteoporozom izazvanom retinoičnom kiselinom. Štakori su obrađeni s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze (RBM) štakori su obrađeni s krizinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana.
Broj životinja po skupini: 7-10.

3.2 Rezultati određivanja hematoloških i biokemijskih parametara u krvi i serumu

Statistička analiza rezultata određivanja hematoloških parametara krvi pokusnih životinja prikazana je na Tablici 1.Rezultati pojedinih parametara prikazani su kao srednja vrijednost po pojedinim skupinama. Rezultati ukazuju da 13cRA povećava(P<0,001)razinu ALP u odnosu na kontrolu dok obrada s krizinom ili alendronatom značajno smanjuje razinu ALP (P<0,01; P< 0,01) u odnosu na kontrolu i u odnosu na 13cRA (P< 0,001; P< 0,001). Razina LDH također je značajno smanjena u obradi osteoporotičnih štakora krizinom ili alendronatom(P< 0,01; P<0,01) u odnosu na kontrolnu skupinu i RBM (P< 0,01; P< 0,05).

Tablica 1. Biokemijski parametri u krvi i serumu

Obrada[a]	**Biokemijski pokazatelji (X±SP)**						
	ALP(U L^{-1})	**AST(U L^{-1})**	**ALT(U L^{-1})**	**LDH(U L^{-1})**	**TP(g L^{-1})**	**GLU(mmol L^{-1})**	**UREA(mmol L^{-1})**
Kontrola	168,25±3,91***	89,00±8,15	46,4±4,76	611,00±21,17	53,06±0,67*	6,46±0,13	6,26±0,41
13cRA	206,3±7,97$^{♦♦♦}$	89,66±5,54	43,16±1,90	571,83±11,31	56,00±0,57$^{♦}$	7,29±0,37	5,65±0,32
13cRA +Krizin	117,25±4,49$^{***♦♦}$	83,00±1,63	41,75±1,71	325,16±49,72$^{**♦♦}$	53,70±0,66	7,24±0,12	5,65±0,18
13cRA+Alendronat	102,66± 14,14$^{***♦♦}$	87,66±4,33	42,00 ±1,52	402,00±70,86$^{*♦♦}$	51,66±2,33	6,23±0,54	6,76±0,21

[a]Štakori su obrađeni *ig s* 13cRA(80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze (RBM) štakori su obrađeni *ig* s krizinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom14 dana.
Broj životinja po skupini: 7-10.

Legenda: ALP - alkalna fosfataza; AST - aspartat aminotransferaza; ALT - alanin aminotransferaza;LDH - laktat dehidrogenaza; TP- total protein

*Statistički značajno različito u odnosu na 13cRA($^{*}P$<0,05; $^{**}P$<0,01; $^{***}P$<0,001).

♦Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu(♦P<0,05; ♦♦P<0,01; ♦♦♦ P<0,001).

Tablica 2. Hematološki pokazatelji u krvi i serumu

Obrada[a]	**Hematološki pokazatelji (X±SP)**							
	L (10^9 L^{-1})	**E (10^{12} L^{-1})**	**Hgb (g L^{-1})**	**Hct**	**MCV (fL)**	**MCH (pg)**	**MCHC (g L^{-1})**	**Plt (10^9 L^{-1})**
Kontrola	2,7±0,59*****	7,29±0,23	145,4±6,49	0,44±0,01	60,1±0,78	19,96±0,45	332,5±4,65	729,25±38,55
13cRA	3,88±0,46♦	6,88±0,12	132,33±2,07	0,40±0,005	56,75±1,41	19,23±0,12	329,16±2,30	722,00±22,61
13cRA+Krizin	4,51±0,54♦	6,72±0,08	133,66±1,49	0,40±0,005	60,15±0,37	19,9±0,13	330±1,34	707,16±22,05
13cRA +Alendronate	4,7±0,43♦	6,57±0,20	127,8±3,78	0,38±0,007	58,86±0,71	19,26±0,13	328,±3,46	749,33±16,29

[a]Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA(80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze (RBM) štakori su obrađeni *ig* s krizinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana.

Broj životinja po skupini: 7-10.

Legenda: L- leukociti; E - eritrociti; Hgb – hemoglobin; Hct – hematokrit; MCV- prosječni volumen eritrocita; MCH - prosječna količina hemoglobina u eritrocitu; MCHC - prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima; Plt - trombociti

* Statistički značajno različito u odnosu na 13cRA (*****P<0,05).

♦Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (♦P<0,05).

3.3. Učinak krizina na fizikalne značajke kostiju štakora s RBM

Rezultati fizičkih značajki kostiju prikazani su u (Tablici 3) gdje je vidljivo da 13cRA značajno smanjuje masu femura (P<0,05) u odnosu na kontrolu. Analizom podataka ustanovljeno je da nema statistički značajne razlike težine bedrenih kostiju kod skupine koja je primala krizin u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je alendronat pokazao smanjenu masu (P<0,05).

Tablica 3.Fizikalne značajke kostiju

	Fizikalni pokazatelji kosti					
Obrada[a]	**$m_{štakora}$ (g)**	**$m_{femura-1}$ (mg)**	**$m_{femura-2}$ (mg)**	**Dužina femura (cm)**	**$R_{lat/med}$ (mm)**	**$R_{post/ant}$ (mm)**
Kontrola	185,50±6,28	732,80±43,16*	792,70±61,93*	3,18±0,03	3,50±0,10	3,00±0,00
13cRA	180,20±9,34	647,36±23,53♦	642,23±23,87♦	3,00±0,01	3,46±0,15	3,22±0,18
13cRA +Krizin	192,40±5,16	746,26±31,59	758,58±34,03	3,37±0,04	3,70±0,09	2,86±0,06
13cRA+Alendronat	177,17±14,01	711,5±24,06*	681,85±17,78*	3,28±0,08	3,45±0,18	3,27±0,27

[a]Štakori su obrađeni s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze (RBM) štakori su obrađeni s krizinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana.
Broj životinja po skupini: 7-10.

* Statistički značajno različito u odnosu na 13cRA(*P<0,05).

♦Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu(♦P<0,05).

3.4.Učinak krizina na vrijednost Ca i P

Rezultati razine Ca i P u femuru prikazani su u Tablici 4. Statističkom obradom podataka ustanovljeno je da su vrijednosti kalcija (Ca) kod skupine obrađene s krizinom više u odnosu na kontrolnu skupinu za osteoporozu (P<0,05), te bez statističke značajnosti u odnosu na zdravu kontrolu,te pozitivnu kontrolu (alendronat). Vrijednosti fosfora (P) su u skupini obrađenoj krizinom statistički značajno više (P<0,05) od RBM modela (Tablica 4).

Tablica 4.Vrijednosti koštanog Ca i P

Obrada[a]	**Masa suhog uzorka (pepela) kosti (g)**	**mg Ca /g**	**mg P/g**
Kontrola	0,7±0,09	134,50±3,59[*]	57,25±1,25[*]
13cRA	0,64±0,06	121,00±3,25[♦]	49,29±2,15[♦]
13cRA +Krizin	0,69±0,06	138,80±2,63[*]	57,00±1,25[*]
13cRA+ Alendronat	0,65±0,05	136,00±5,17[*]	61,00±2,30[*]

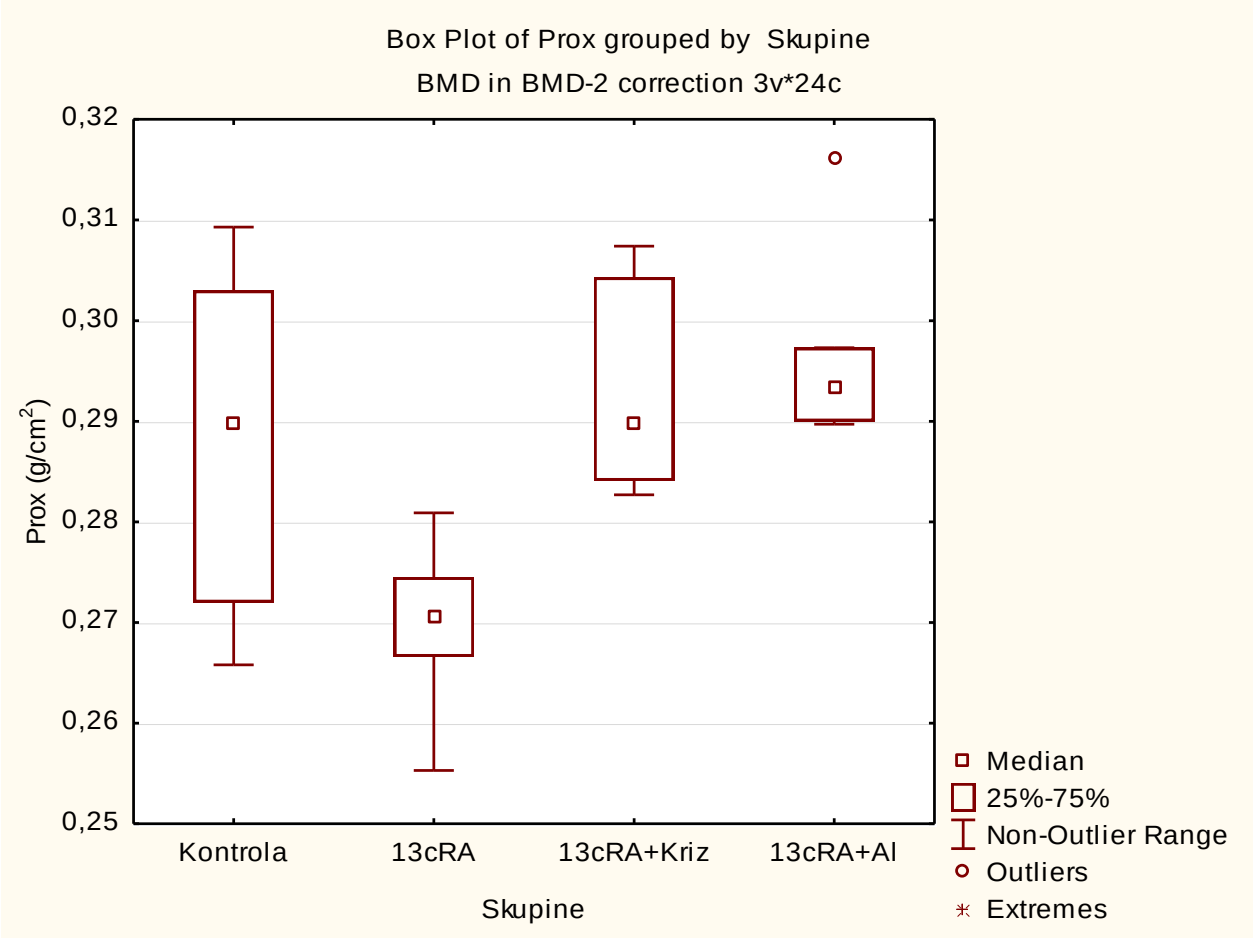
[a]Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze (RBM) štakori su obrađeni *ig* s krizinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana.
Broj životinja po skupini: 7-10.

* Statistički značajno različito u odnosu na13cRA([*]P<0,05)

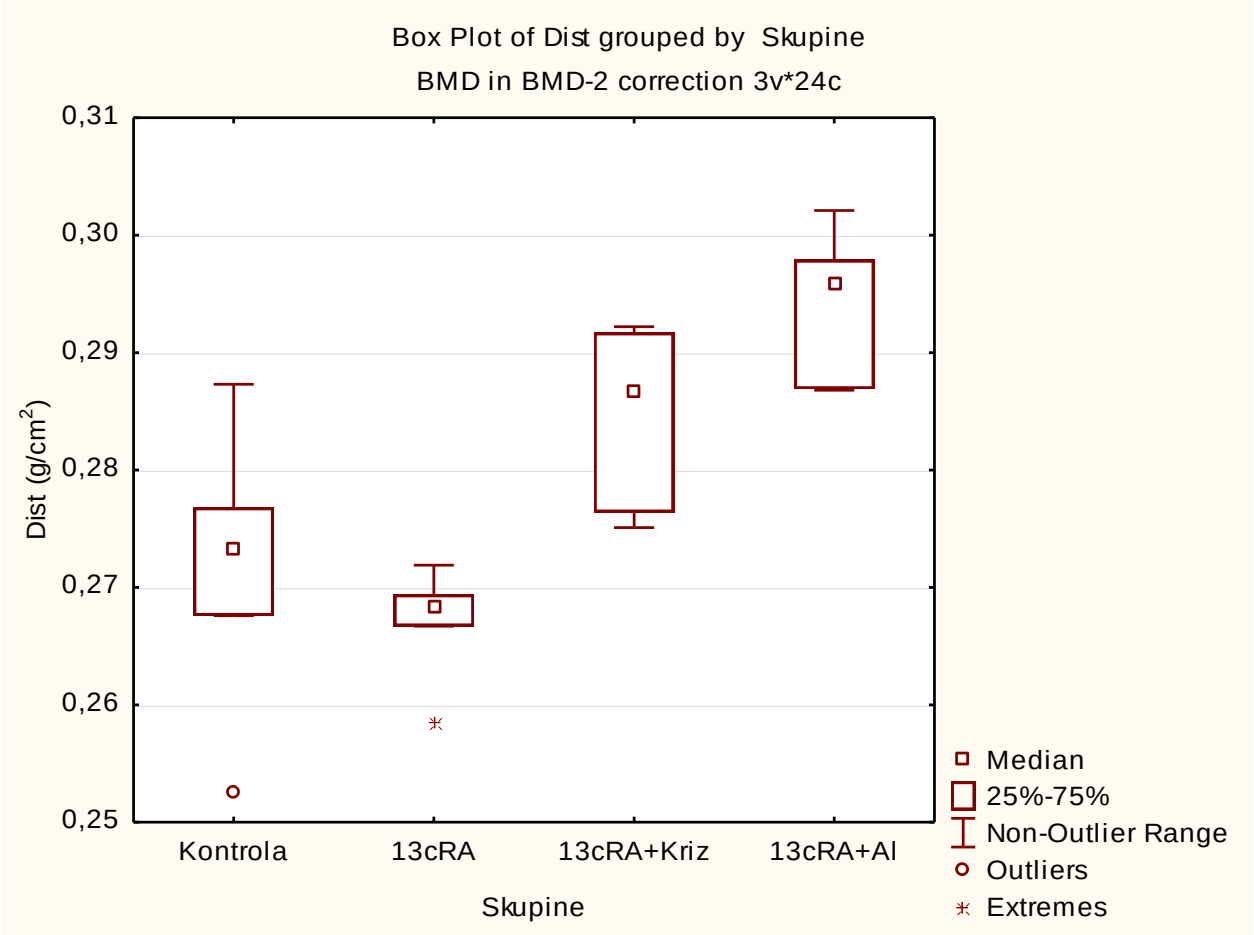
[♦]Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu ([♦]P<0,05)

3.5. Vrijednosti BMD kod primjene krizina u RBM

Statističkom obradom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u vrijednosti BMD u proksimalnom djelu bedrene kosti između RBM skupina obrađenih alendronatom i krizinom (P<0,05) (Slika 7) dok u distalnom dijelu metafize lijeve bedrene kosti postoji statistički značajna razlika između RBM skupine obrađenih alendronatom i zdrave kontrolne skupine (P<0,05) te između RBM skupina obrađenih krizinom i alendronatom (P<0,01) (Slika 8).



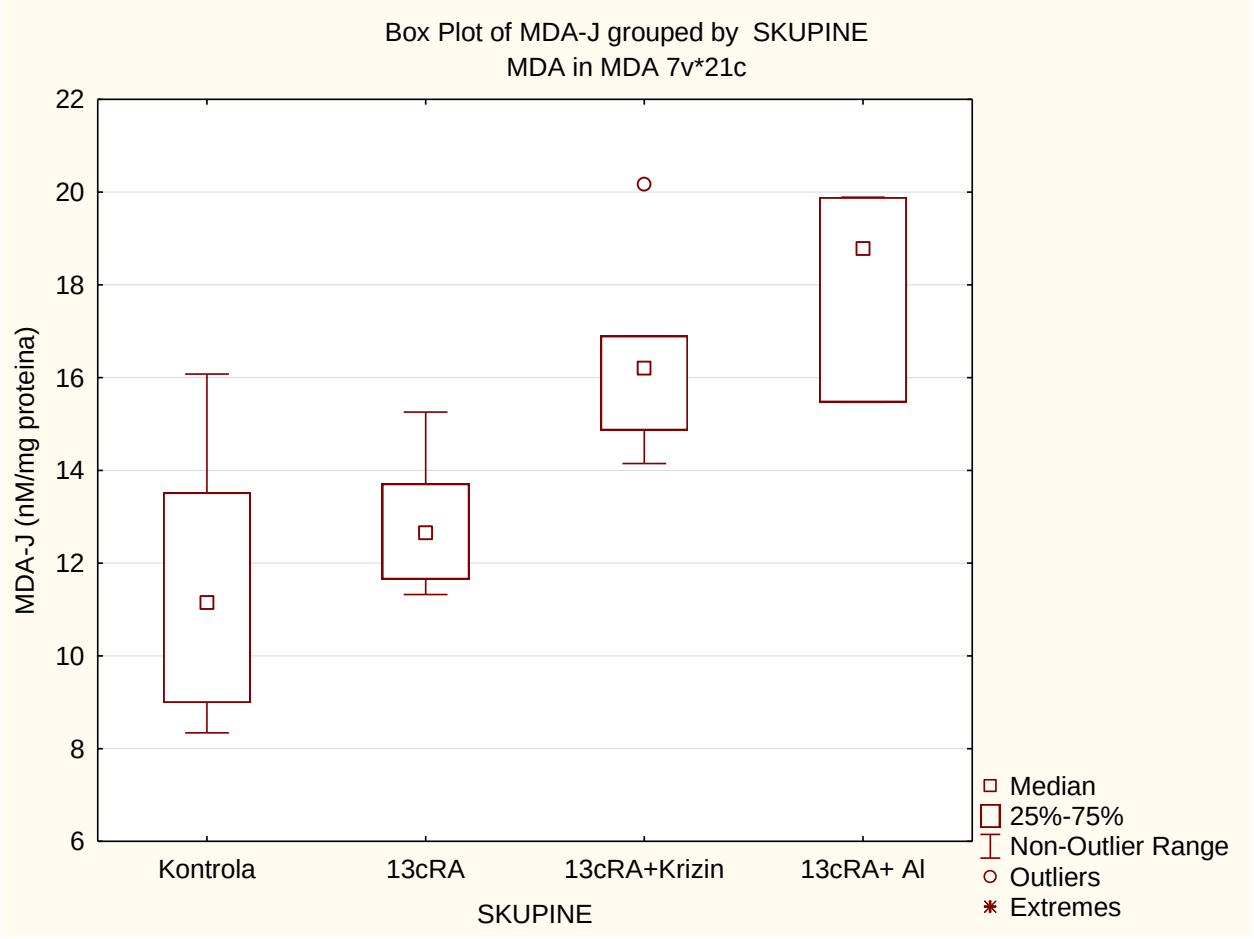
Slika 7.Vrijednosti BMD u proksimalnom dijelu metafize bedrene kosti kod zdrave kontrolne skupine, osteoporotski model RBM (13cRA), pozitivna kontrola (alendronat), te skupine obrađene krizinom.13cRA+Krizin *vs* 13cRA+Al(P<0,05).



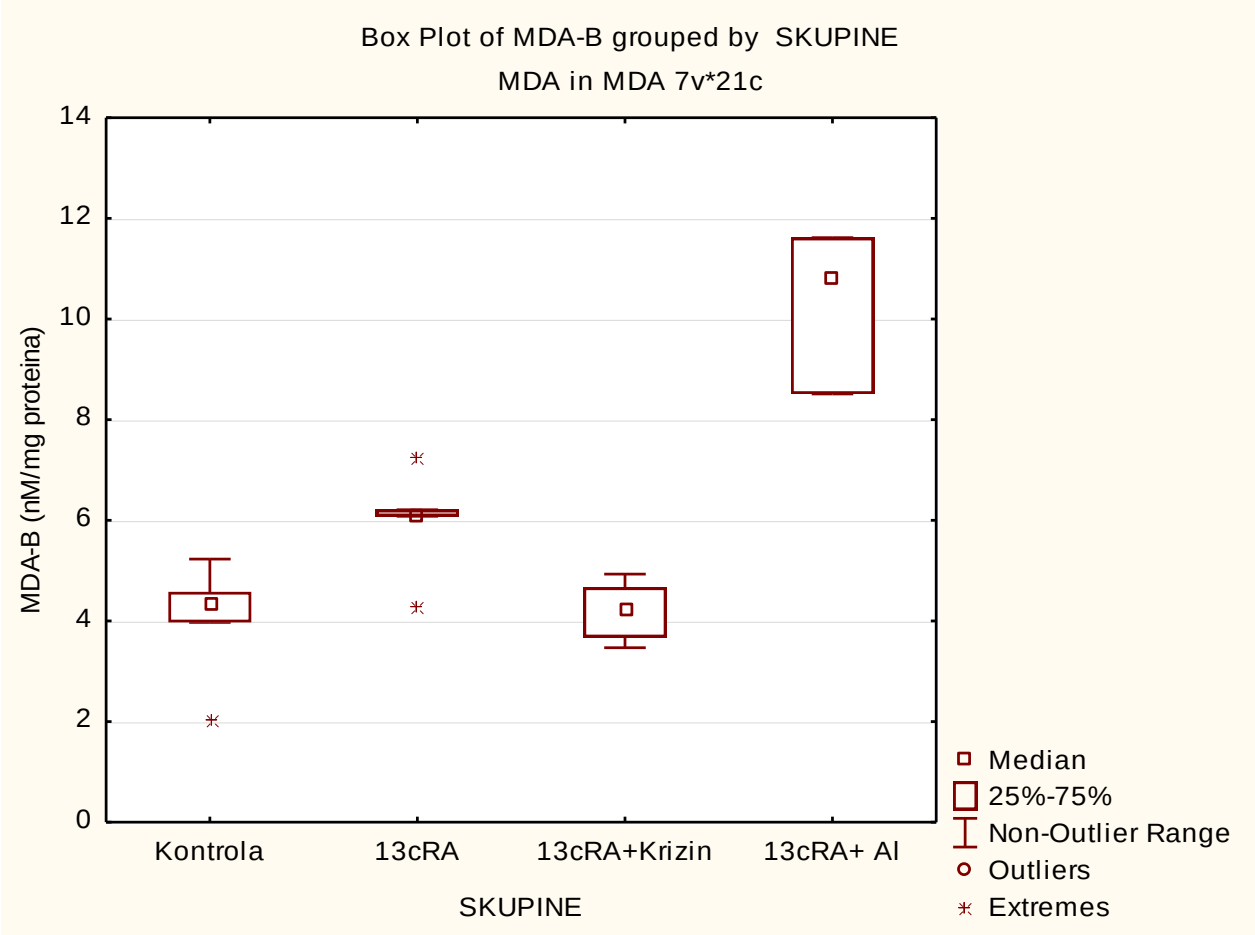
Slika 8.Vrijednosti BMD u distalnom dijelu metafize bedrene kosti kod zdrave kontrolne skupine,osteoporotski model (RBM), pozitivna kontrola (alendronat) te skupine obrađene krizinom.Kontrola *vs* 13cRA+Al (P<0,05); 13cRA+Krizin *vs* 13cRA+Al(P<0,01).

3.6. Vrijednosti lipidne peroksidacije (MDA)

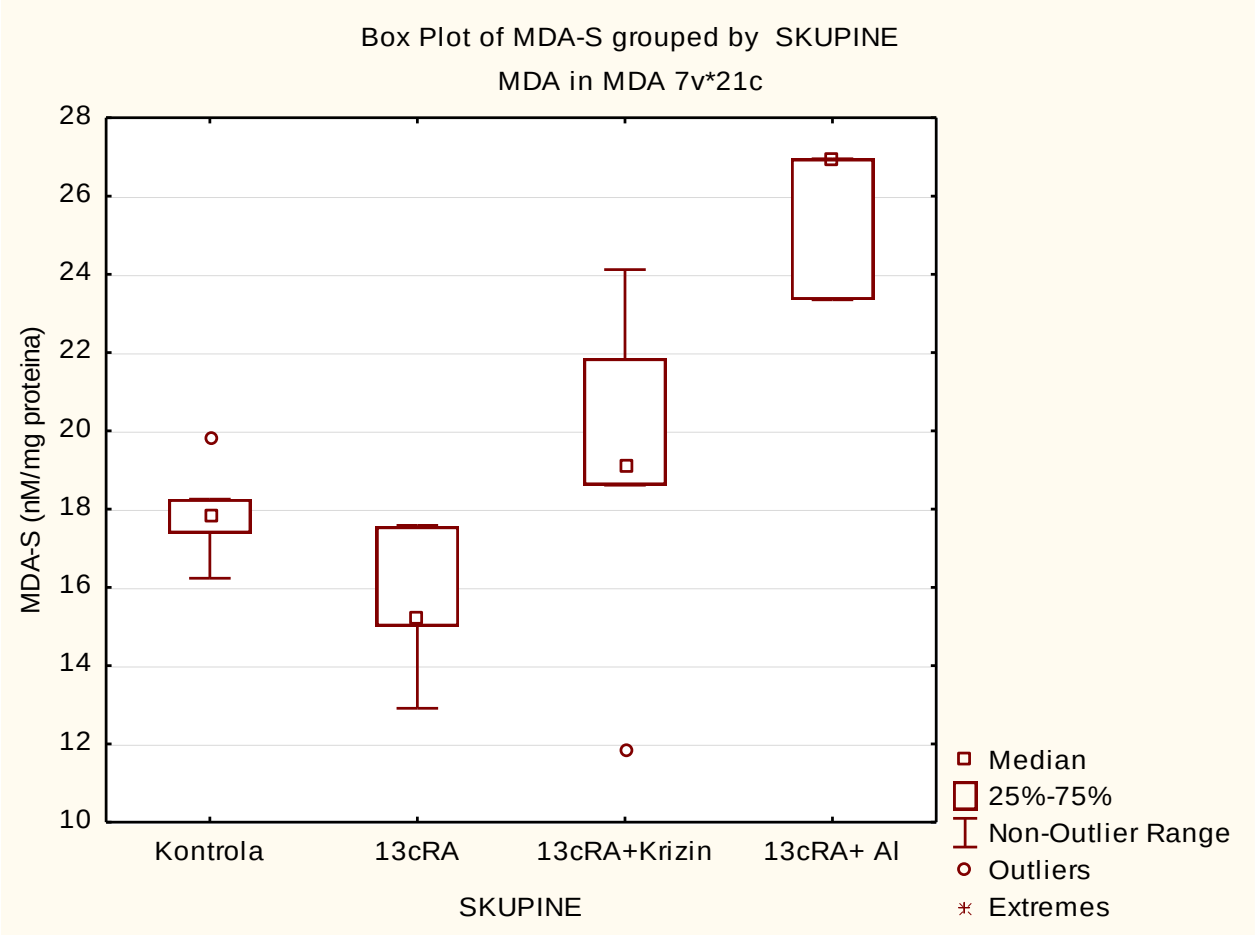
Analizom prikupljenih podataka, ustanovljeno je statistički značajna razlika u koncentraciji MDA u stanicama jetre RBM štakora obrađenih krizinom ili alendronatom (P<0,05; P<0,05)u odnosu na zdravu kontrolu (Slika 12). Na (Slici 13) je prikazana razina MDA bubrega gdje je vidljivo da postoji statistički značajna razlika između zdrave kontrolne skupine i skupine RBM obrađene s alendronatom(P<0,05) te između RBM skupina obrađenih krizinom i alendronatom (P<0,05). Analizom razine MDA u stanicama slezene vidljiva je statistički značajna razlika između 13cRA (RBM) i 13cRA+Al (P<0,01) (Slika 14).



Slika 12.Prikaz vrijednosti MDA u jetri kod primjene krizina i alendronatau RBM. Kontrola *vs* 13cRA +Krizin (P<0,05); Kontrola *vs* 13cRA+Al (P<0,05).



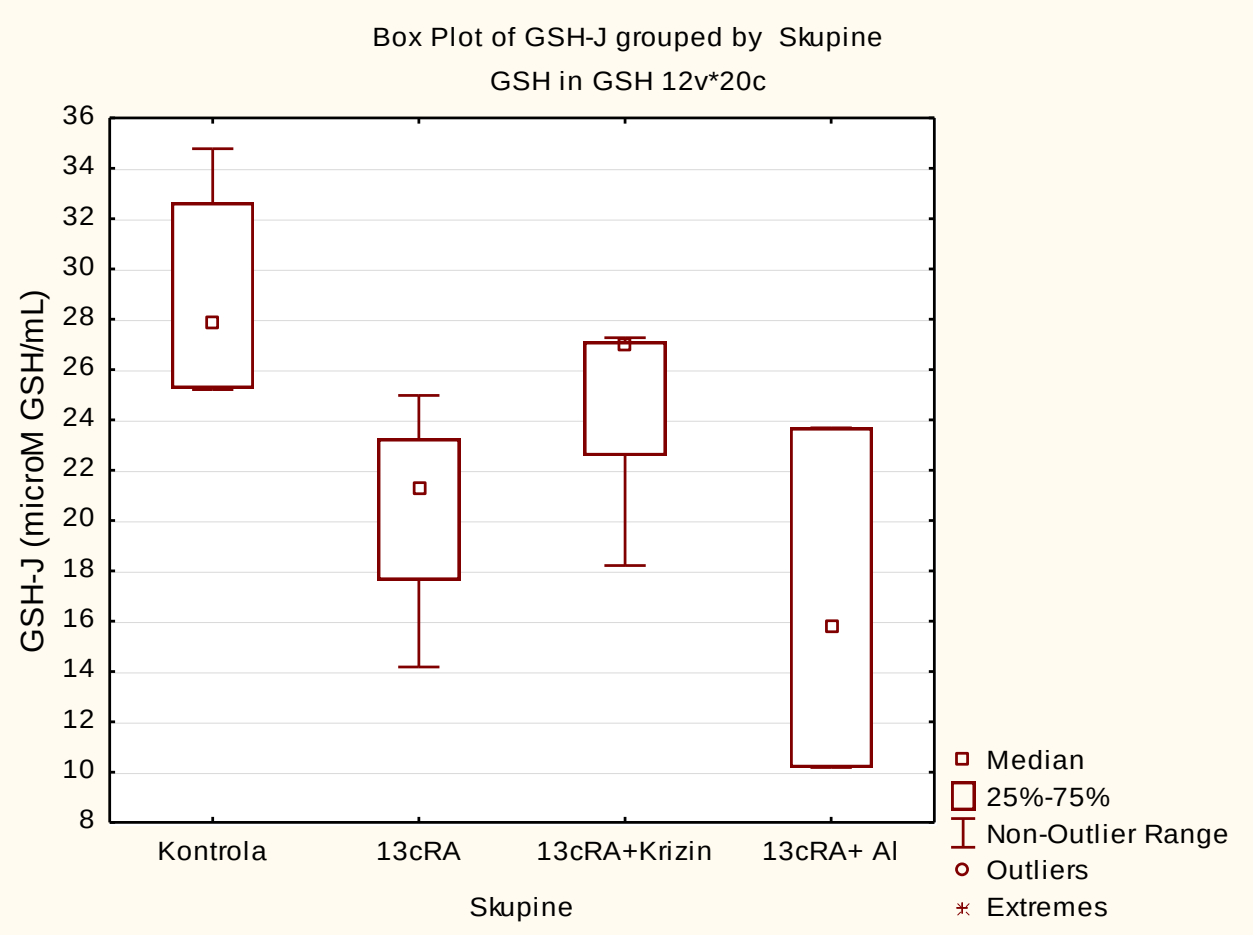
Slika 13**.** Prikaz vrijednosti MDA u bubregu kod primjene krizina i alendronata u RBM. Kontrola *vs* 13cRA+Al (P<0,05); 13cRA+Krizin *vs* 13cRA+Al(P<0,05).



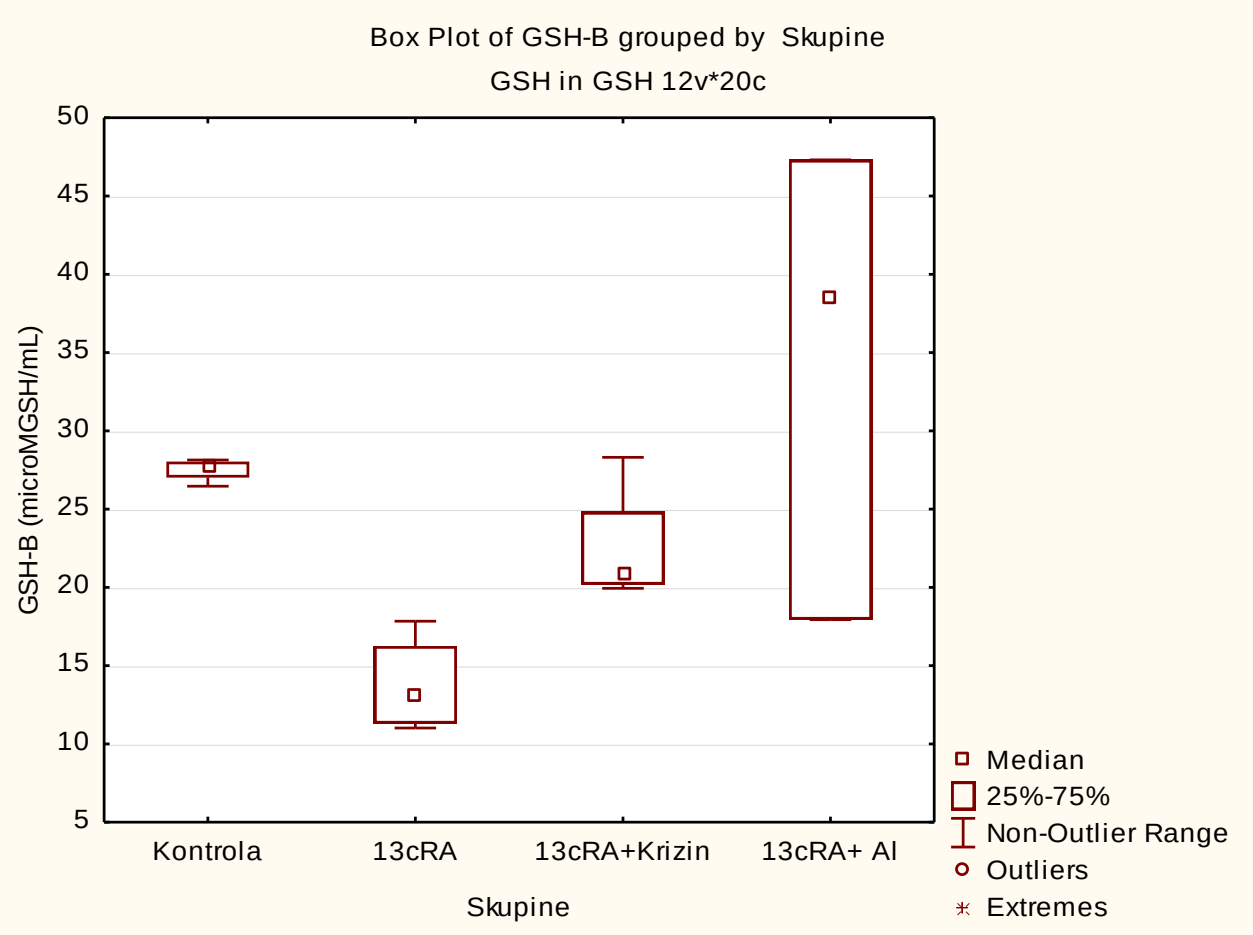
Slika 14.Prikaz vrijednosti MDA u slezeni kod primjene krizina i alendronata u RBM.13cRA *vs* 13cRA+Al (P<0,01)

3.7. Vrijednosti koncentracije ukupnog glutationa (GSH)

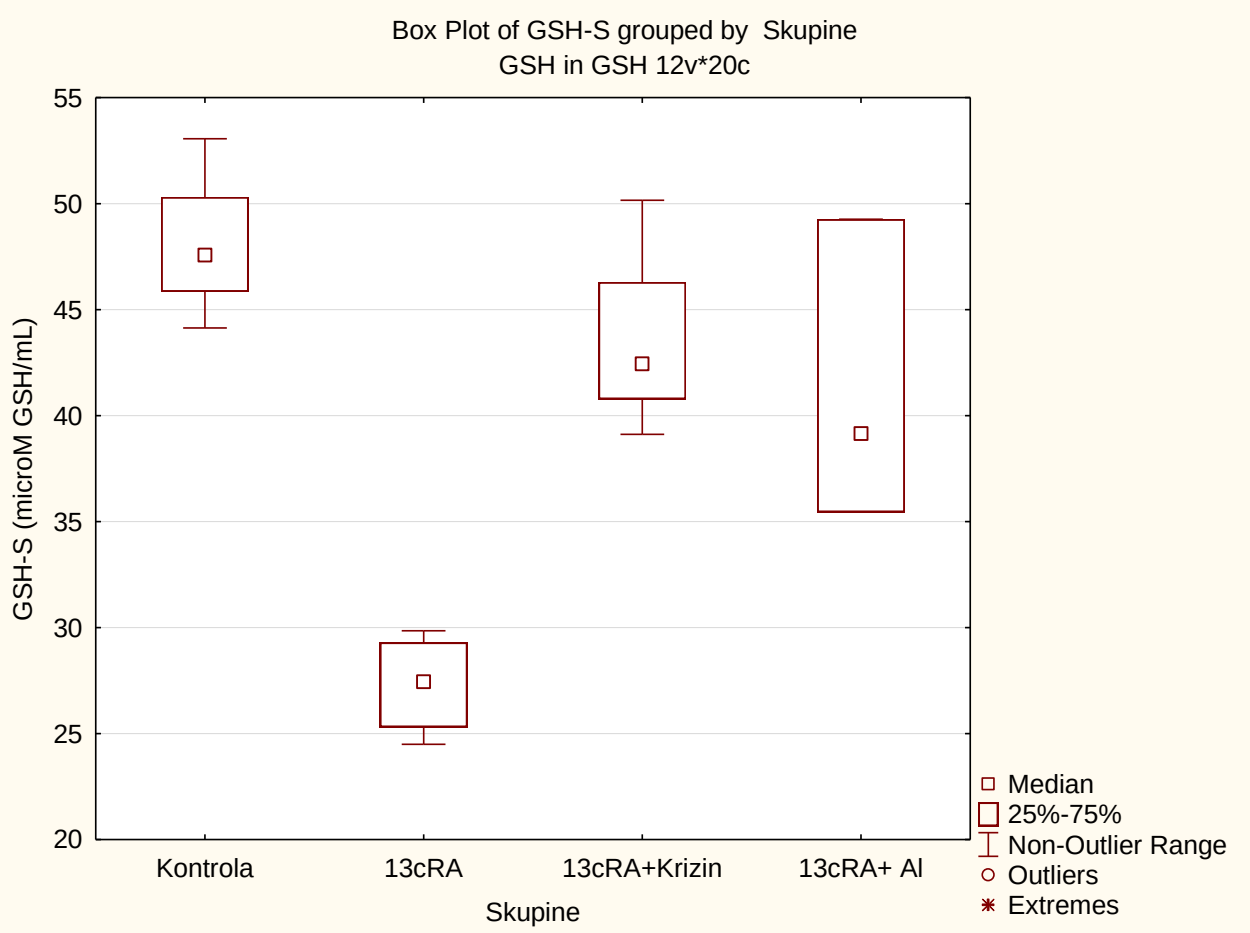
Analizom razine GSH u stanicama jetre nije bilo statistički značajne razlike između analiziranih skupina (Slika 15). U bubregu je zapažena velika razlika razine GSH između skupine 13cRA i 13cRA+Al ali nije bila statistički značajna (P=0,058) (Slika16) dok je u slezeni(Slika 17) vidljiva statistički značajna razlika između kontrolne skupine i 13cRA (RBM) skupine (P<0,05).



Slika 15**.** Prikaz vrijednosti GSH u jetri kod primjene krizina i alendronata u RBM.



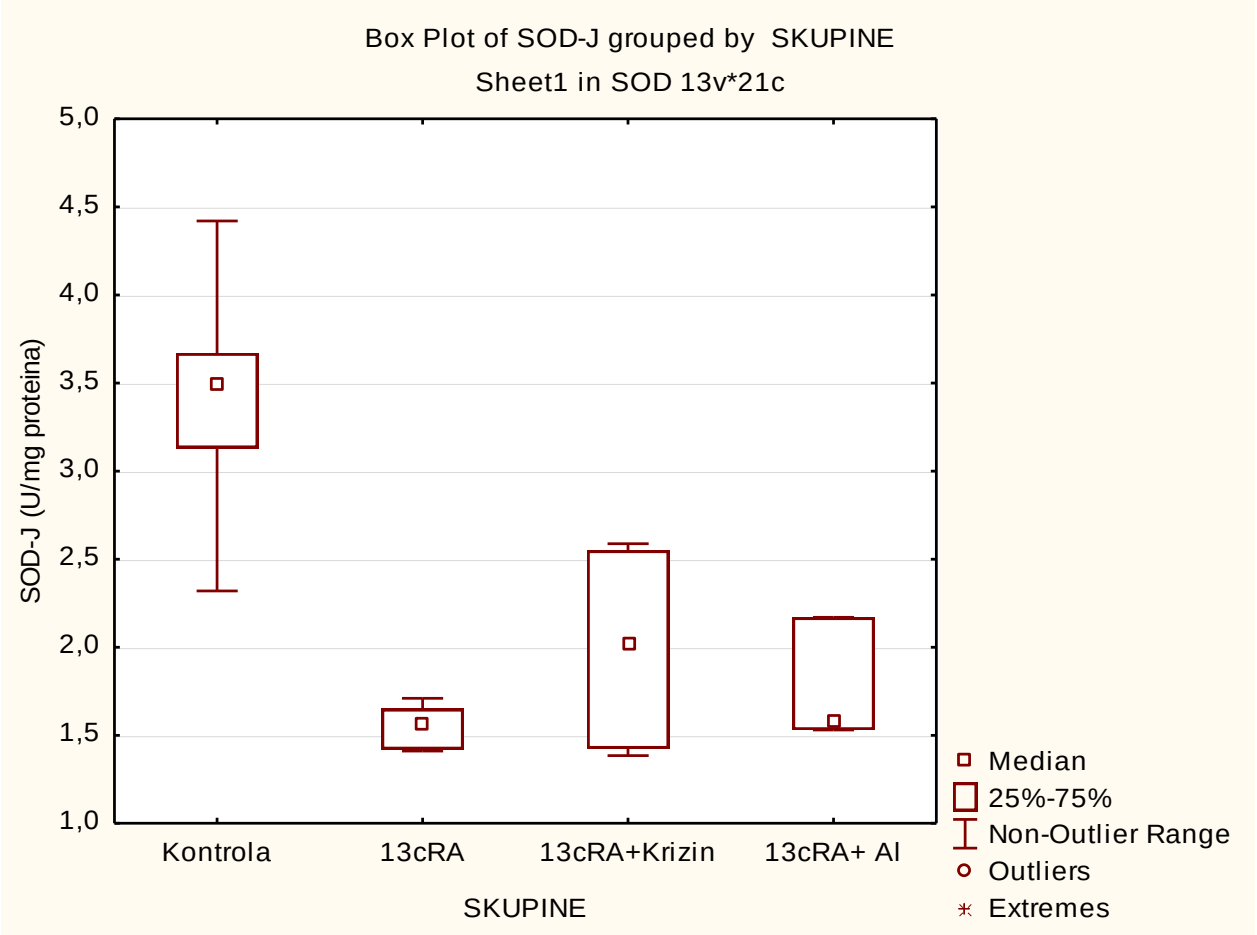
Slika 16. Prikaz vrijednosti GSH u bubregu kod primjene krizina i alendronata u RBM.



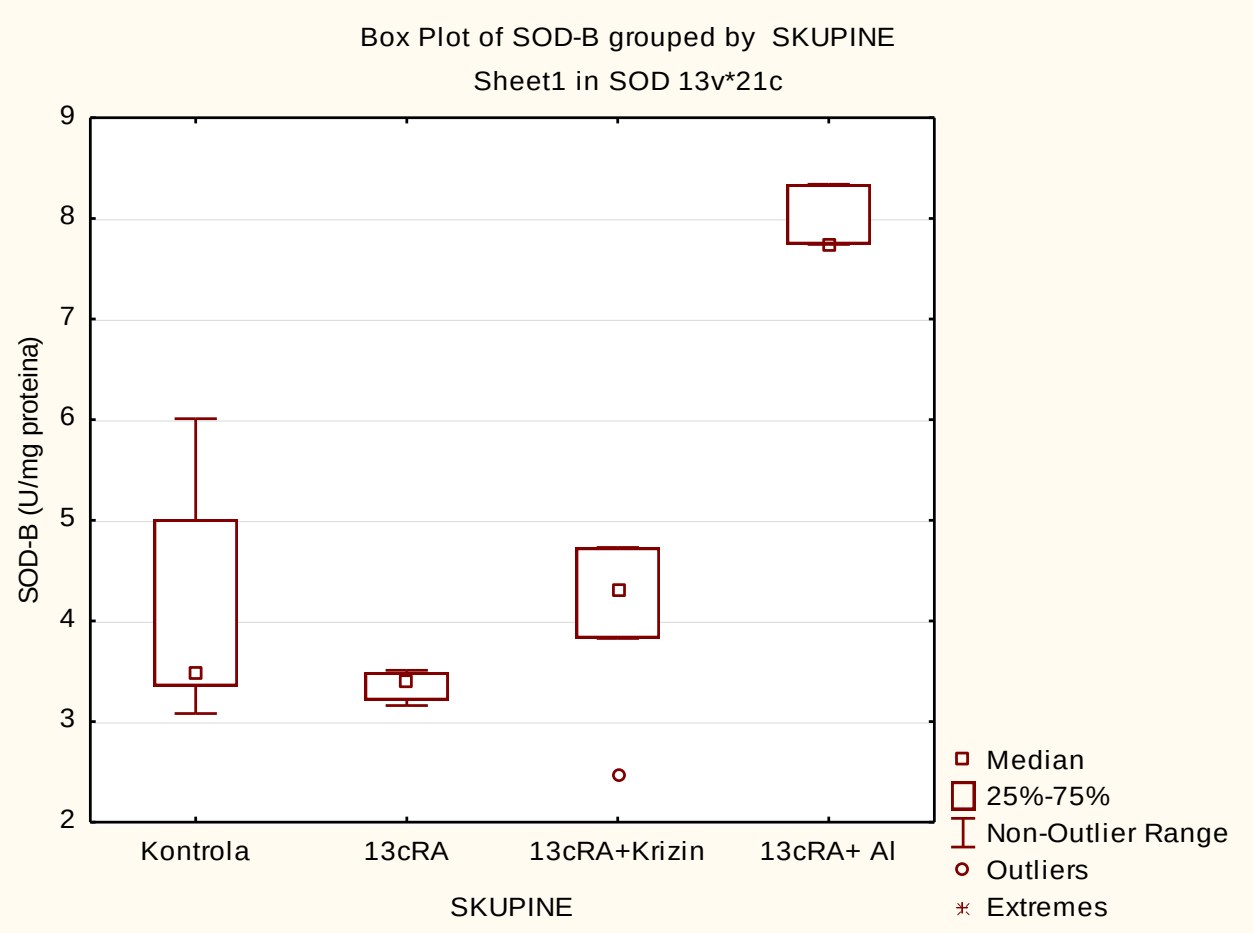
Slika17. Prikaz vrijednosti GSH u slezeni kod primjene krizina i alendronata u RBM. Kontrola *vs* 13cRA (P<0,05).

3.8. Vrijednosti enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

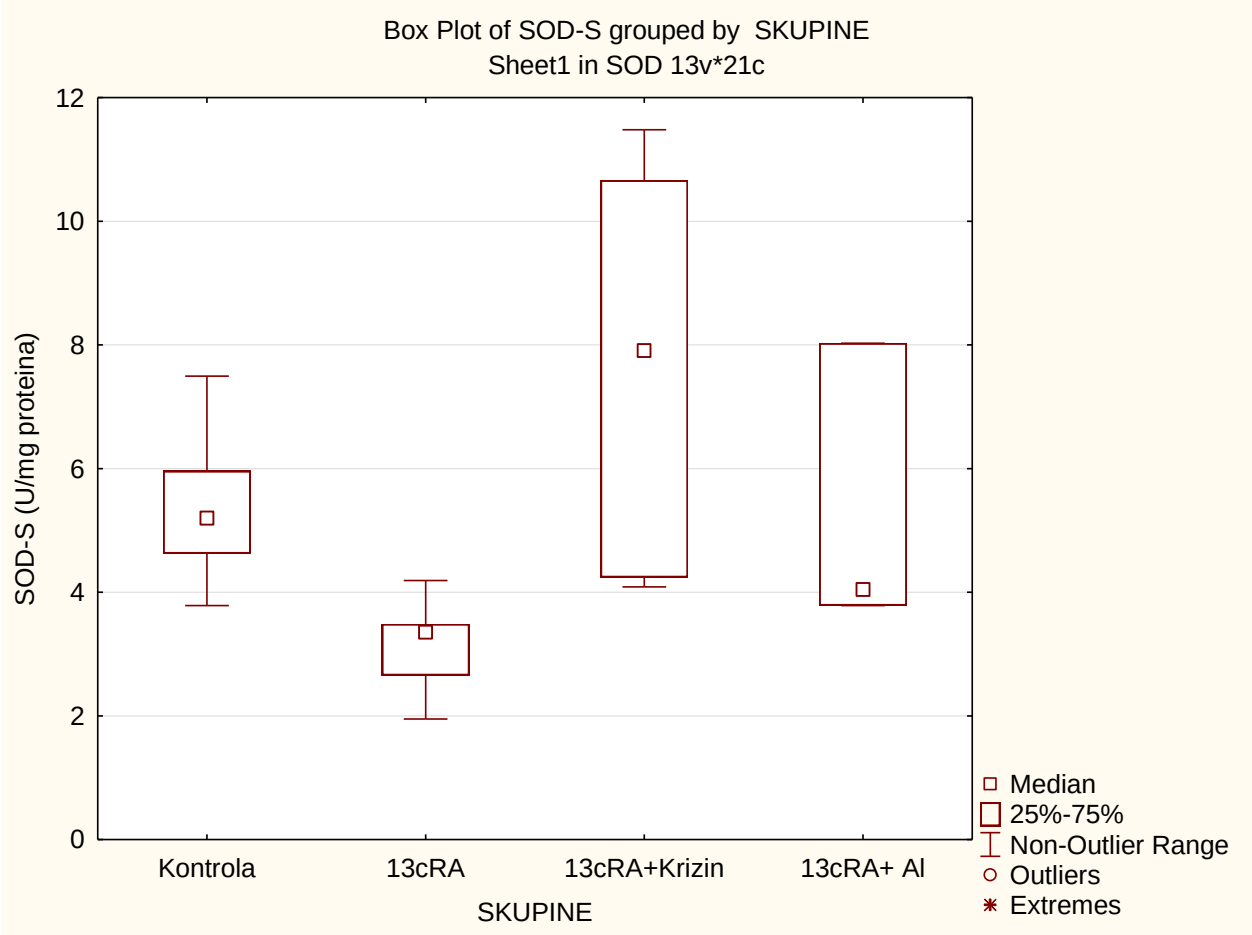
Rezultati analize razine SOD u jetri (Slika 18) pokazuju statistički značajnu razliku između kontrolne skupine i skupine obrađene s 13cRA (P<0,01) dok u bubregu (Slika 19) značajna razlika razine SOD postoji između skupina 13cRA i 13cRA+Al (P<0,05). (Slika 20) pokazuje statistčku značajnu razliku između skupina 13cRA i 13cRA+Krizin (P<0,01).



Slika18. Prikaz vrijednosti SOD u jetri kod primjene krizina i alendronata u RBM. Kontrola vs 13cRA (P<0,01).



Slika19. Prikaz vrijednosti SOD u bubregu kod primjene krizina i alendronata u RBM. 13cRA *vs* 13cRA+Al (P<0,05)

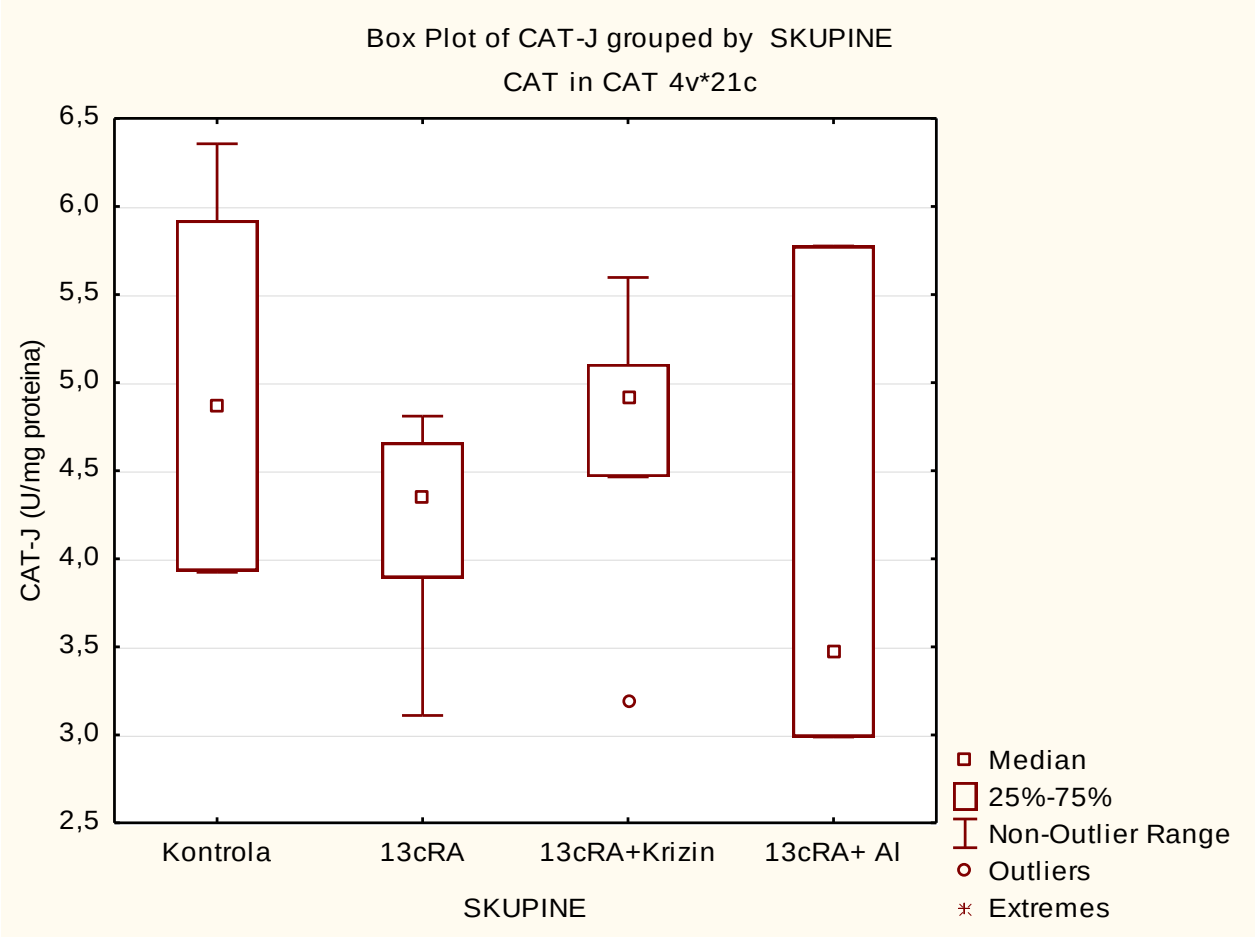


Slika 20. Prikaz vrijednosti SOD u slezeni kod primjene krizina i alendronata u RBM.13cRA *vs* 13cRA+Krizin (P<0,01).

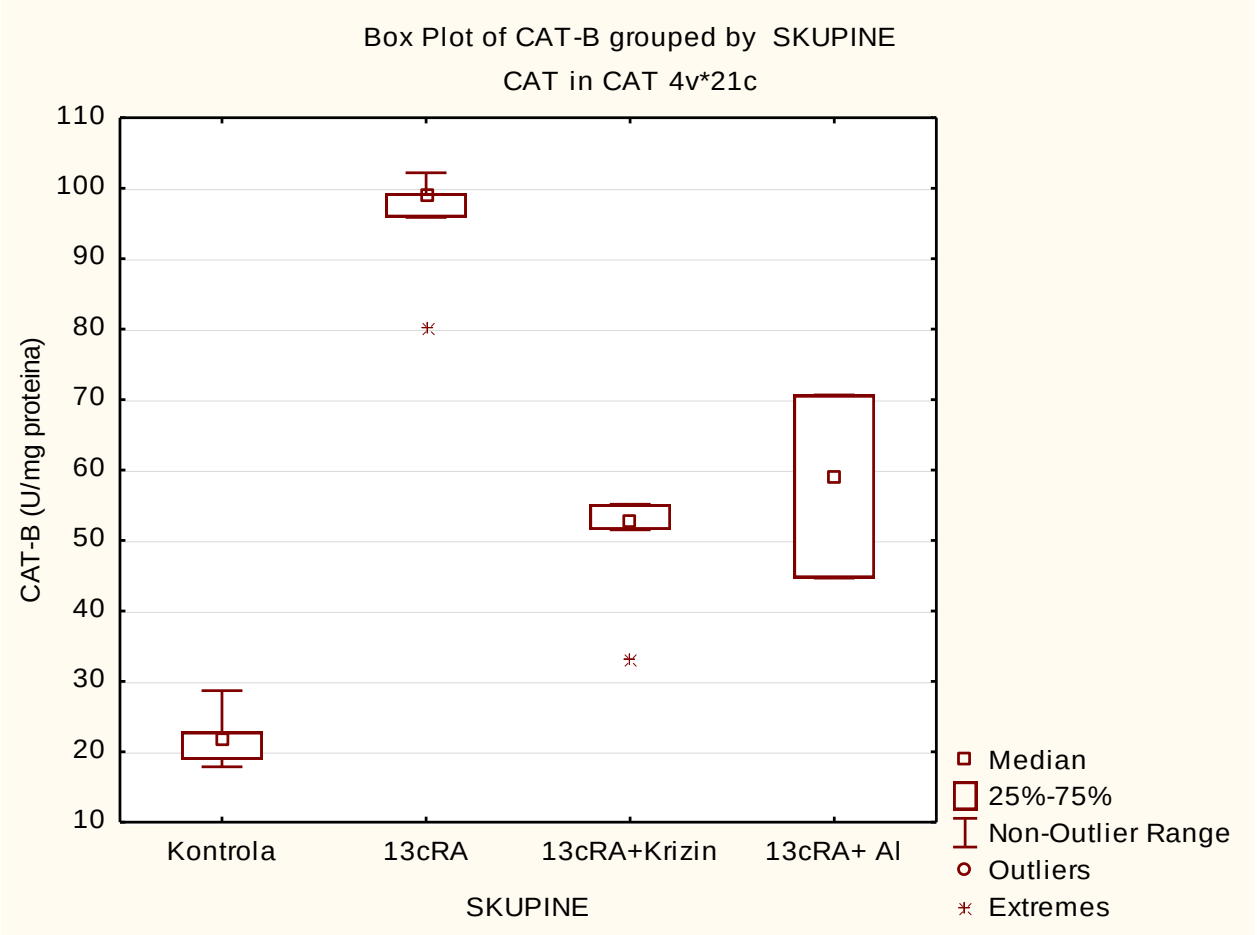
3.9. Vrijednosti enzimske aktivnosti katalaze (CAT)

Slika 21 pokazuje razinu CAT aktivnosti u stanicama jetre; između analiziranih skupina nije vidljiva statistički značajna razlika. Analizom podataka CAT aktivnosti vidljiva je statistički značajna razlika između kontrole i 13cRA+Al (P<0,001).Nadalje, analiza CAT aktivnost u stanicama slezene pokazuje statisički značajnu razliku između kontrolne skupine i 13cRA (P<0,01) te između kontrolne skupinei13cRA+Krizin (P<0,01).

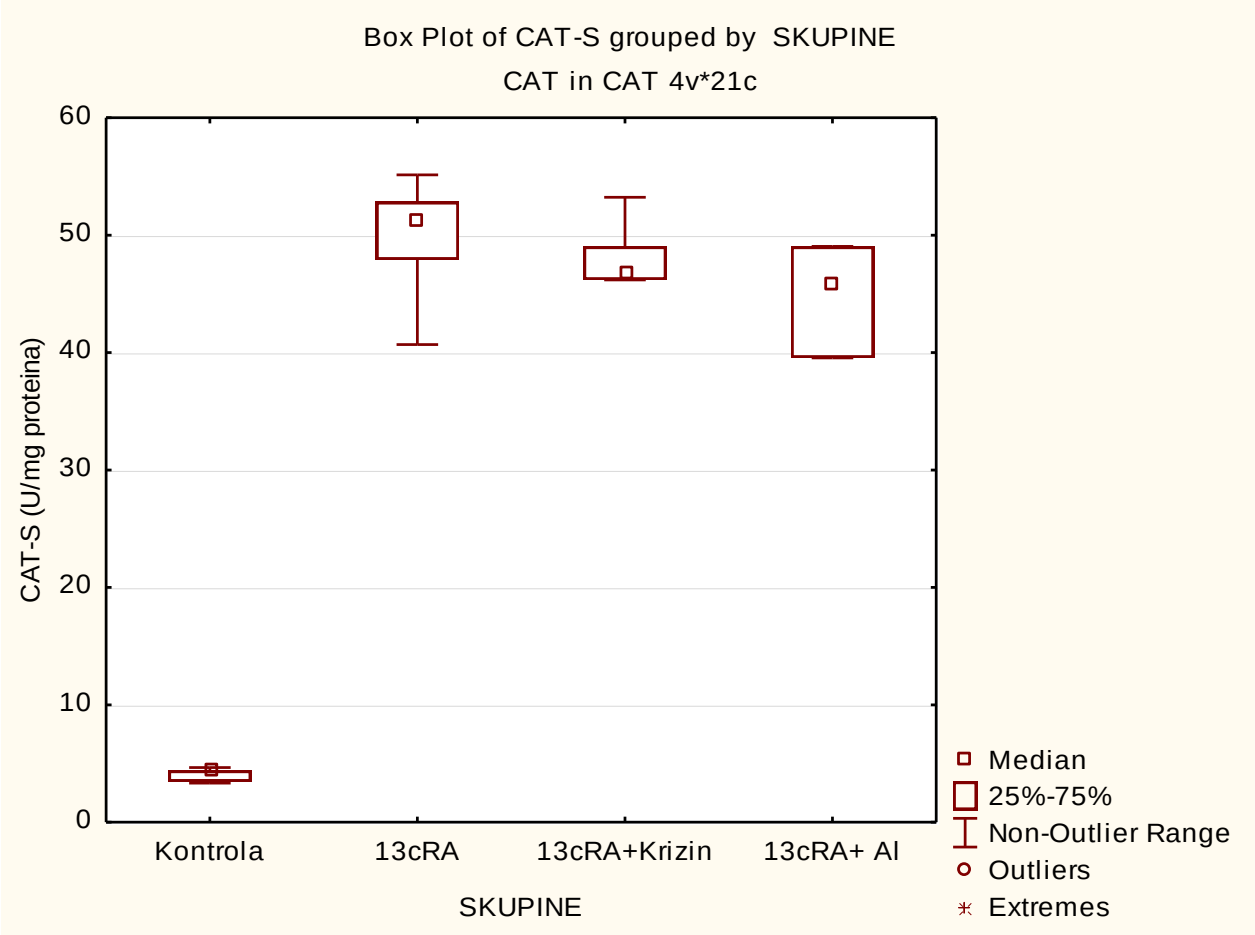
.



Slika21. Prikaz vrijednosti CAT u jetri kod primjene krizina i alendronata u RBM



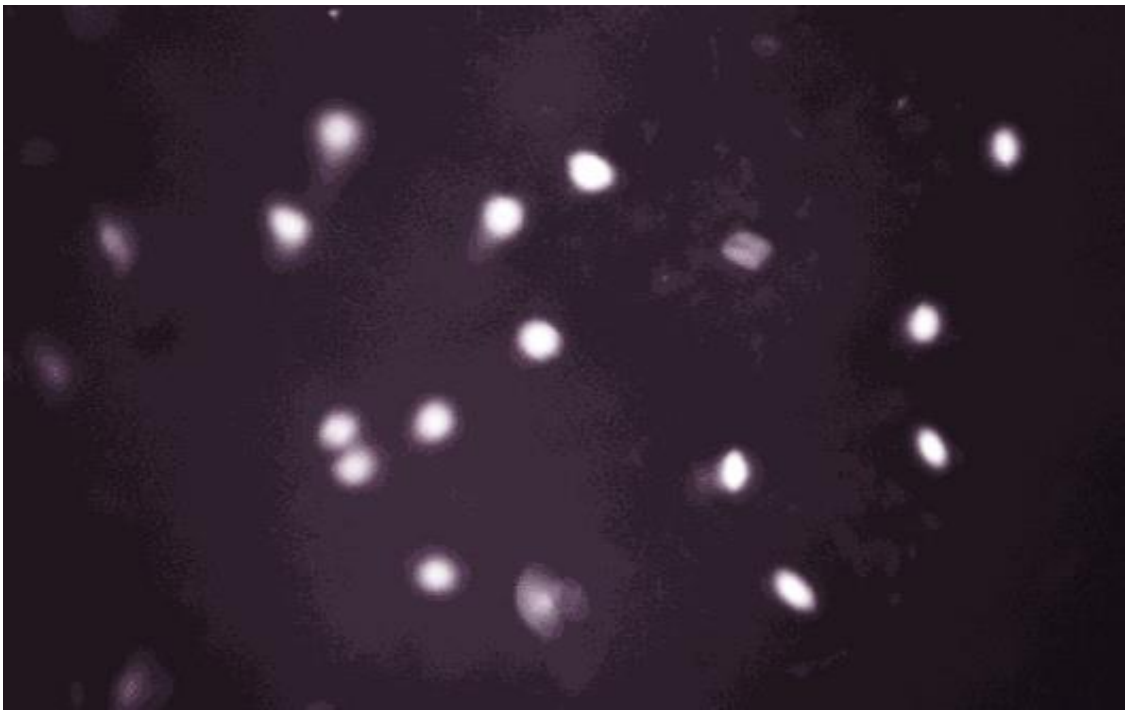
Slika 22. Prikaz vrijednosti CAT u bubregu kod primjene krizina i alendronata u RBM.Kontrola *vs* 13cRA+Al (P<0,001).



Slika 23. Prikaz vrijednosti CAT u slezeni kod primjene krizina i alendronata u RBM.Kontrola *vs* 13cRA (P<0,01); Kontrola *vs* 13cRA+Krizin (P<0,01).

3.10. Rezultati mikronukleus testa

Analizom stanica periferne krvi (mikronukleus test*in vivo*) nismo uočili nikakvu razliku u broju mikronukleusa (Slika 24) u analiziranim skupinama; broj stanica s mikronuleusom je bio zanemarujuće mali tako da nismo prikazali rezultate.



Slika 24. Analiza pomoću epifluorescencijskog mikroskopa

3.11. Rezultati komet testa

Rezultati parametara komet testa prikazani su u Tablici 5. Istraživane test komponente nisu pokazale genotoksični učinak na stanice periferne krvi; svi parametri su bili statistički značajno manji u odnosu na kontrolu. Najmanja oštećenja pokazuje RBM skupina obrađena alendronatom.

Tablica 5. Rezultati komet testa na uzorcima limfocita periferne krvi

	Parametri komet testa (X±SP)		
Obrada[a]	**Dužina repa (μm)**	**Intenzitet repa**	**Moment repa**
Kontrola	16,24±0,29***	5,18±0,58**	0,63±0,07*
13cRA	14,72±0,28$^{♦♦♦}$	3,61±0,36$^{♦♦}$	0,45±0,04$^{♦}$
13cRA +Krizin	13,88±0,26$^{♦♦♦*}$	2,5±0,30$^{♦♦♦*}$	0,29±0,03$^{♦♦♦**}$
13cRA+Alendronat	13,84±0,21$^{♦♦♦***}$	1,25±0,19$^{♦♦♦***}$	0,15±0,02$^{♦♦♦***}$

[a]Štakori su obrađeni s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze (RBM) štakori su obrađeni s krizinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana.
Broj životinja po skupini: 7-10.

* Statistički značajno različito u odnosu na 13cRA ($^{*}P$<0,05;**<0,01; ***<0,001).
♦ Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu ($^{♦}P$<0,05; $^{♦♦}$<0,01; $^{♦♦♦}$<0,001).

3.12. Rezultati razine citokina u serumu

Rezultati razine citokina u serumu prikazani su u Tablici 6, gdje je vidljiva statistički značajna razlika u razini proupalnih citokina IL-1β i Il-6 u skupini obrađenoj s 13cRA u odnosu na kontrolnu skupinu.

Tablica 6. Razina citokina u serumu

	Razina citokina(X±SP)				
Obrada[a]	**IL-1β (pg mL^{-1})**	**IL-4 (pg mL^{-1})**	**IL-6 (pg mL^{-1})**	**IL-10 (pg mL^{-1})**	**TNF-α (pg mL^{-1}))**
Kontrola	115,83±8,79*	25,64±2,74	370,00±5,77*	392,00±6,81	3,63±0.10
13cRA	219,00±21,05$^{\blacklozenge}$	25,64±2,77	415,00±5,62$^{\blacklozenge}$	420,00±10,64	2,93±0.61
13cRA +Krizin	150,83±11,50*	25,38±2,13	366,66±10,85*	400,00±6,95	3,03±0,22
13cRA+Alendronat	106,00±27,49*	23,58±8,39	256,66±27,28*	350,00±30,00	1,61±0,53

[a]Štakori su obrađeni s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze (RBM) štakori su obrađeni s krizinom (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana.

Broj životinja po skupini: 7-10.

***** Statistički značajno različito u odnosu na 13cRA ($^{*}P$<0,05).

$^{\blacklozenge}$ Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu ($^{\blacklozenge}P$<0,05).

4. RASPRAVA

U ovom radu istražili smo na životinjskom modelu osteoporoze antioksidativnu i antiupalnu učinkovitost flavonoida krizina, te njegovu mogućnost primjene u liječenju osteoporoze. Antiupalno i antioksidatvno djelovanje krizina na histomorfometrijske značajke osteoporoze istražili smo kroz više različitih metoda kao što su mineralna gustoća kostiju, promjer, dužine i težine bedrene kosti, udio Ca i P u kostima, kao i antioksidativno djelovanje krizina na koncentraciju malondialdehida,biljega lipidne peroksidacije (pokazatelja oksidativnog stresa), glutationa (glavne antioksidacijske molekule prirodno prisutne u tijelu),superoksid dismutaze (SOD) , snažan primarni antioksidans koji katalizira dismutaciju superoksidnog aniona (O_2^-) u kisik i vodikov peroksid, te katalazu (enzim koji katalizira razgradnju vodikova peroksida na molekularni kisik i vodu).

Reaktivni spojevi kisika (ROS) sposobni su direktno ili indirektno oštetiti sve vrste biomolekula uključujući bjelančevine, lipide i DNA (Ahmad i sur., 2000; Shacter, 2000; Almeida i sur., 2002; Ahmad i sur., 2004; Ahmad i sur., 2005).Štetni kisikovi spojevi kao što su superoksid anion, vodik peroksid i hidroksil radikal stvaraju se, osim pri oksidativnom stresu i u normalnim uvjetima unutar organizma tijekom metabolizma (Ferreira i sur., 2005; Filho i sur., 2005).Prirodni tjelesni antioksidativni mehanizmi održavaju ravnotežu između proizvodnje i uklanjanja slobodnih radikala, no uslijed promjena u fiziološkim i okolišnim čimbenicima dolazi do poremećaja ravnoteže i proizvodnja slobodnih radikala nadvlada antioksidativne mehanizme, a stvoreni oksidativni stres, koji je direktna posljedica slabljenja antioksidativnog sustava, može dovesti do izraženog gubitka koštane mase, fragilnosti kostura te ostalih stanja koja su karakteristična za osteoporozu. Pojačana fizička aktivnost organizma dovodi do pojačane potrošnje kisika, pa tako i do pojave oksidativnog stresa (Jiankang i sur., 2000).

Kao pokusne životinje korištene su ženke štakora iz originalnog legla Spraque Dawley, Hsd, Harlan Laboratories. Štakori su bili podijeljeni u 4 grupe : zdrava kontrolna, isoretinoičnom kiselinom izazvana osteoporotska grupa (RBM), pozitivna kontrola (alendronat), dok se u jednoj od grupa istovremeno davao i krizin kako bismo utvrdili njegov utjecaj na osteoporozu. Analize prvih vrijednosti su bile promjene težina životinja (vaganja na početku i kraju pokusa) kako bismo ustanovili postoji li značajni utjecaj krizina i ostalih pripravaka na promjenu tjelesne težine životinje. Analizom je ustanovljeno je da primjena krizina najviše

utjecala na na tjelesnu težinu životinja RBM; zapažen je prirast težine od 17,19% dok je kod skupine RBM obrađene alendronatom prirast bio najniži tijekom pokusa (Slika 6).
Hematološki i biokemijski parametri u krvi i serumu su značajno bolji u skupini obrađenoj krizinom ili alendronatom gdje je vidljivo značajno sniženje razine ALP i LDH-u odnosu na RMB skupinu, što jasno ukazuju na njihov pozitivan učinak.
Analizom podataka sakupljenih tijekom ovog istraživanja, dokazano je da su vrijednosti mineralne gustoće kostiju u proksimalnim i distalnim dijelovima metafize bedrene kosti bile značajno više prilikom primjene krizina i alendronata , u odnosu na RMB skupinu štakora. Iz podataka jasno se vidi da je mineralna gustoća kostiju u osteoporozi izrazito smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu, što je u skladu s očekivanjima i prijašnjim istraživanjima utjecaja retinoične kiseline na koštani sustav (Fahmy i Soliman 2009). Rezultati jasno ukazuju da primjena krizina može značajno pomoći u sprječavanju gubitka mineralne gustoće kostiju uslijed osteoporoze. Isto tako pokazuju i vrijednosti koncentracija minerala kalcija i fosfora kod grupe koja je primala krizin gdje su vrijednosti bile gotovo jednake vrijednostima alendronata. Naime, iz analiziranih podataka vidljivo je da su koncentracije Ca i P značajno povišene kod krizinske grupe životinja, u odnosu na kontrolnu i RBM skupinu, što korelira s vrijednostima o mineralnoj gustoći kostiju. Iako je prisutan mehanizam koštane resorpcije, krizin ukazuje na kontrolu i sprječavanje gubitka mineralne gustoće kostiju. Mjerenje mineralne gustoće kostiju ima važnu ulogu u kliničkoj procjeni i dijagnosticiranju osteoporoze, kao i rizika od osteoporoze (Adler 2010).

Flavonoid krizin u posljednje vrijeme privlače puno pozornosti zbog svoje izvanredne antioksidacijske i antiradikalske aktivnosti. Nalazi se u medu agacije, što ukazuje na laganu dostupnost. Istraživanja su pokazala da su flavonoidi dobri “hvatači” slobodnih radikala, a time imaju važnu ulogu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji kao lijekovi i antioksidansi. Krizin korišten u ovom istraživanju pokazao je pozitivan učinak smanjenjem MDA u bubregu, te povećanje GSH i SOD u svim organima, dok je katalaza bila povećana u jetri. Iz dobivenih podataka, možemo zaključiti da su dobivene vrijednosti očekivane.
Poznati su i sinergijski učinci kod antioksidacijskog djelovanja flavonoida. Pokazalo se da flavonoidi imaju antibakterijsko, sedativno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i druga djelovanja. Takav izvanredan spektar biokemijske i stanične funkcije daju obećanja za prevenciju i liječenje raznih ljudskih poremećaja uzrokovanih oksidativnim stresom, uključujući i osteoporozu. Dobiveni podaci potvrđuju rezultate Fahmy iSoliman (2009) koji su pokazali da retinoična kiselina prouzrokuje osteoporozu djelom i kroz povećanje razine oksidativnog stresa i značajno smanjenje koncentracije GSH u organima. Skupina životinja

obrađena krizinom pokazuje izrazito povećanje koncentracije glutationa u bubregu, jetri i slezeni što dokazuje da flavonoid krizin ima utjecaja na antioksidativni sustav tijela i da doprinosi povećanju sinteze koncentracije glutationa, spoja koji kontrolira redoks stanje u stanicama. Iz svega navedenog možemo zaključiti da krizin ima brojne pozitivne učinke na tijelo zahvaćeno osteoporozom, u pogledu povećanja mineralne gustoće kostiju,koncentracija Ca i P, smanjenja oksidativnog stresa kroz kontrolu lipidne peroksidacije i povećanje koncentracije glutationa i katalaze i SOD. Skladno tome može se zaključiti da primjena krizina u svakodnevnoj primjeni može reagirati antagonistički na oksidativni stres te razne bolesti prouzrokovane istim. Nadalje, pozitivan učinak krizina na metabolizam kosti ukazuje da krizin može biti učinkovit u u liječenju stečene osteoporoze kroz protuoksidativnu, protuupalnu, fitoestrogensku i regenerativnu djelotvornost. Upravo učestalost sekundarne osteoporoze prouzročene brojnim lijekovima danas je u porastu. Dobiveni rezultati ukazuju da krizin ima značajnu antioksidativnu, antiupalnu i antiosteoporotsku aktivnost, te da bi njegova primjena mogla poslužiti u sprječavanju osteoporoze. Laka dostupnost, ekonomska isplativost i nedostatak toksičnosti ukazuju da krizin ima prednost u odnosu na alendronat, te bi mogla naći svoj put u regularnom tretmanu u zdravstvenim ustanovama.

5. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja o utjecaju krizina na histomorfometrijske značajke osteoporoze te nakon obrade svih podataka, može se zaključiti:

- ✓ Krizin nije pokazao statistički značajan utjecaj na tjelesnu težinu životinja na početku i kraju pokusa ali je prirast životinja bio veći u odnosu na kontrolnu skupinu.

- ✓ Krizin je pozitivno utjecao na vrijednosti mineralne gustoće kostiju i u proksimalnom i u distalnom dijelu metafize bedrene kosti, te povećavši gustoću kostiju u odnosu na gustoću kostiju životinja RBM skupine. Također je djelovao pozitivno na povećanje težine kostiju u odnosu na RBM skupinu.

- ✓ Krizin je pokazao i značajan utjecaj na povećanje duljine bedrene kosti u odnosu na kontrolnu skupinu i na RBM skupinu životinja

- ✓ Krizin je pozitivno djelovao na vrijednosti Ca i P, gdje je koncentracija navedenih elemenata bila povišena u odnosu na RBM skupinu štakora.

- ✓ Krizin je pozitivno djelovao na promjer bedrene kosti, koji je bio veći u odnosu na RBM skupinu.

- ✓ Krizin je smanjio proces lipidne peroksidacije u bubregu.

- ✓ Krizin je povećao razinu antioksidacijskog enzima glutationa i SOD u jetri,bubrezima i slezeni.

- ✓ Krizin je povećao razinu katalaze u jetri.

- ✓ Mikronuleus test i komet test ne pokazuju genotoksični učinak

- ✓ 13cRA inducira povećanu razinu proupalnih citokina; razina IL1β i IL-6 su značajno povećani u odnosu na kontrolu.

- ✓ Laka dostupnost, ekonomska isplativost i nedostatak toksičnosti ukazuju da krizin ima prednost u odnosu na alendronat.

6. LITERATURA

Al-Anazi A., Qureshi V.F., Javaid K., Qureshi S. 2011. Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: An overview. Journal of Natural Science, Biology and Medicine 2, 154-163

Briganti S., Picardo M. 2003. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. Journal of the European Academy of dermatology and venereology 17, 663-669.

Buchanan B. B., Gruissem W., Jones R. L. 2009. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. U: Crotean R., Kutchan T. M., Lewis N. G. Natural products (Secondary metabolites). Philadelphia, Courier Companies, Inc., str. 1288-1308.

Chiang CH, Huang CC, Chan WL, Huang PH, Chen TJ, Chung CM et al. 2012. Oral alendronate use and risk of cancer in postmenopausal women with osteoporosis: A nationwide study. Journal of Bone and Mineral Research 27, 1951-8

Dang ZC, Lowik C. 2005. Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. Trends in Endocrinology and Metabolism 16(5), 207-13

Fahmy SR., Soliman AM. 2009. Oxidative Stress as a Risk Factor of Osteoporotic Model Induced by Vitamin A in Rats. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 3, 1559-68

Gadoth N., Göbel H.H. 2011. Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology. U: Stroke and Oxidative Stress. Humana Press, London, str. 137-153

Govil J. N., Singh V. K., Bhardwaj R. 2008. Recent progress in medicinal plants vol. 22: Phytopharmacology and therapeutic values IV. U: Oršolić N., Bašić I. Honey bee products and their polyphenolic compounds in treatment of diabetes. S.A.D., Studium Press LLC, str. 455-553.

Jaganathan S.K., Mandal M. 2009. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols. Journal of Biomedicine and Biotechnology 19, 1-13

Josipović P., Oršolić N. 2008. Citotoksičnost polifenolnih/flavonoidnih spojeva u kulturi leukemijskih stanica. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 59, 299-308.

Kang N. 2012. Oxidative Stress and the Risk of Osteoporosis. The Role of Dietary Polyphenols and Nutritional Supplements in Postmenopausal Women

Katagiri T., Takahashi N. 2002. Regulatory Mechanisms of Osteoblast and Osteoclast Differentiation. Oral Diseases 8, 147-159

Kazazić S. P. 2004. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 55, 279-290.

Kohen R., Nyska A. 2002. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicologic pathology 30, 620-650.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. The journal of biological chemistry 193, 265-275.

Leonarduzzi G., Sottero B., Poli G., 2010. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators.The antioxidant concept revisited 28(2), 336-74

Marcus R., Feldman D., Nelson D.A., Rosen C.J. 2009. Fundamentals of Osteoporosis. Academic Press

Mody N., Parhami F., Sarafian T. A., Demer L. L. 2001.Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. Free Radical Biology and Medicine 31 (4), 509-519

Oršolić N, Goluža E, Đikić D, Lisičić D, Sašilo K, Rođak E, Želko J, Vihnanek Lazarus M, Orct T 2014. Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contents in the retinoic acid-induced bone loss model of rat. European Journal of Nutrition 53(5), 1217-27

Pevalek-Kozlina B. 2003. Fiziologija bilja. U: Površinska zaštita i obrambene tvari. Sekundarni biljni metaboliti. Zagreb, Profil, str. 470-486.

Pilšáková L., Riečanský I., Jagla F. 2010. The Physiological Actions of Isoflavone Phytoestrogens. Physiological research 59, 651-664

Rumora L., Petrik J., Grubišić T. 2003. Oksidacijski stres i stanična smrt. Biochemia medica 13, 75- 82.

Sandhar H. K., Kumar B, Prasher S., Tiwari P., Salhan M., Sharma P. 2011. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. Internationale pharmaceutica sciencia 1, 25-41.

Sheweita S.A., Khoshhal K.I. 2007. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: Role of antioxidants. Current Drug Metabolism Journal 8, 519-25

Šimić P., Giljević Z., Šimunić V., Vukičević S., Koršić M. 2007. Liječenje osteoporoze. Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 58, 55-71

Štefan L., Tepšić T., Zavidić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. 2007. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. Medicina: glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora 43, 84-94.

Van'T Hof R. J., Ralston S. H., 1997. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressing osteoclast activity. Journal of Bone and Mineral Research 12 (11), 1797-1804