TERAPIJSKI UČINAK FITOESTROGENA IZ EKSTRAKTA HMELJA U KOMBINACIJI S ALENDRONATOM NA OSTEOPOROZU U ŽENKI WISTAR ŠTAKORA

Rođak, Edi

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:221003

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Edi Rođak

TERAPIJSKI UČINAK FITOESTROGENA IZ EKSTRAKTA HMELJA U KOMBINACIJI S ALENDRONATOM NA OSTEOPOROZU U ŽENKI WISTAR ŠTAKORA

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Edi Rođak

TERAPIJSKI UČINAK FITOESTROGENA IZ EKSTRAKTA HMELJA U KOMBINACIJI S ALENDRONATOM NA OSTEOPOROZU U ŽENKI WISTAR ŠTAKORA

Doktorska disertacija

Osijek, 2023.

Mentor rada: doc. dr. sc. Nikola Bijelić

Komentor rada: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Rad ima 155 listova

Zahvaljujem mentoru doc. dr. sc. Nikoli Bijeliću i komentorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić na pomoći u svim aspektima ovog istraživanja od početka pa do kraja. Bez Vaše pomoći ovo istraživanje ne bi bilo moguće.

Također se zahvaljujem članovima Zavoda za histologiju i embriologiju, a posebno prof. dr. sc. Tatjani Belovari, inženjerki Danici Matić i dr. sc. Ivani Ilić na svoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela i izrade ovoga rada.

Zahvaljujem i g. Mateju Eminu iz tvrtke Culmium i prof. dr. sc. Roku Kostanjšeku sa sveučilišta u Ljubljani na pomoći pri mikro CT analizi kostiju, te g. Christofu Eckelu iz tvrtke Hopsteiner i njegovim suradnicima za donaciju ekstrakta hmelja.

Hvala i prijateljima koji su bili uz mene tijekom cijelog ovog putovanja emocionalnom i kofeinskom podrškom – Aleti Šimić, Ivani Jelavić, Maji Jirouš, Teuti Opačak-Bernardi, Matei Matić-Ličanin i mnogim drugima.

Posebno hvala Miloradu Zjaliću, Marini Čović i Robertu Grgcu na utrošenom vremenu i pomoći pri eksperimentalnom dijelu kada god je bilo potrebno.

Također, posebno hvala ide mojoj obitelji koja me je svojom podrškom kroz sve godine školovanja dovela do ovog trenutka.

Još jednom, hvala svima!

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1 Osteoporoza 1
1.2 Koštani metabolizam 3
1.2.1 Osteoblasti 5
1.2.2 Osteoklasti 6
1.2.3 Pregradnja kosti 7
1.2.4 Kontrola metabolizma kosti 9
1.3 Estrogeni 11
1.3.1 Estrogenski receptori – struktura i djelovanje 11
1.3.5 Osteoporoza i estrogeni 12
1.4 Terapija osteoporoze 14
1.4.1 Anabolički lijekovi 14
1.4.2 Antiresorptivni lijekovi 15
1.5 Bisfosfonati 16
1.5.1 Obilježja i djelovanje bisfosfonata 16
1.5.2 Alendronat 17
1.6 Fitoestrogeni 18
1.6.1 Hmelj 19
1.6.2 Ksantohumol i izoksantohumol 20
1.6.3 8-prenilnaringenin 20
1.6.4 6-prenilnaringenin 21
1.7 Oksidativni stres i kost 23
1.8 Životinjski modeli osteoporoze 24
1.9 Svrha i očekivani doprinos istraživanja 25

2. HIPOTEZA 27
3. CILJ ISTRAŽIVANJA 28
4. MATERIJALI I METODE 29
4.1 Ustroj studije 29
4.2 Materijali 29
4.3 Životinje 29
4.3.1 Uzgoj i tretman 29
4.3.2 Uzorkovanje 30
4.4 Hematološka i biokemijska analiza krvi i seruma 32
4.5 Analiza kvalitete kosti 33
4.5.1 Mikro računalna tomografija 33
4.5.2 Western blot analiza biljega pregradnje kosti 37
4.6 Histološka analiza 41
4.6.1 Maternica 41
4.6.2 Perigonadalno masno tkivo 43
4.6.3 Jetra 44
4.7 Oksidativno oštećenje 44
4.7.1 Dušikov oksid i aktivnost arginaze u serumu 44
4.7.2 Stupanj lipidne peroksidacije 45
4.7.3 Količina karbonil proteina 48
4.7.4 Aktivnost katalaze 49
4.7.5 Količina kolesterola i triglicerida u jetri 50
4.8 MALDI-TOF masena spektrometrija 51
4.8.1 Priprema uzoraka jetre 51
4.8.2 Priprema uzoraka perigonadalnog masnog tkiva 51
4.8.3 Prikupljanje i analiza podataka na MALDI-TOF uređaju 52

4.9 Statistička analiza 53
5. REZULTATI 54
5.1 Težine organa 54
5.2 Hematološke i biokemijske odrednice krvi i seruma 54
5.2.1 Hematološke odrednice 54
5.2.2 Biokemijske odrednice seruma 57
5.2.3 Kolesterol i trigliceridi u serumu 60
5.3 Analiza kvalitete kosti 61
5.3.1 Mikro računalna tomografija 61
5.3.2 Western blot analiza serumskih biljega pregradnje kosti 67
5.4 Rezultati histološke analize uzorkovanih organa 68
5.4.1 Histomorfometrijska analiza maternice 68
5.4.2 Imunohistokemijska analiza biljega proliferacije Ki67 u tkivu maternice 70
5.4.3 Histomorfometrijska analiza perigonadalnog masnog tkiva 71
5.4.4 Udio kolagena u tkivu jetre 74
5.5 Oksidativni stres 76
5.5.1 Dušikov oksid i aktivnost arginaze u serumu 76
5.5.2 Stupanj lipidne peroksidacije 76
5.5.3 Količina karbonil proteina 77
5.5.4 Aktivnost katalaze 78
5.5.5 Količina kolesterola i triglicerida u tkivu jetre 79
5.6 MALDI-TOF masena spektrometrija 80
5.6.1 Jetra 80
5.6.2 Perigonadalno masno tkivo 85
6. RASPRAVA 92
6.1 Hematološke i biokemijske odrednice 93

6.1.1. Hematološki pokazatelji....93
6.1.2. Biokemijski pokazatelji....94
6.1.3. Kolesterol i trigliceridi u serumu....95
6.2 Kvaliteta i pregradnja koštanog tkiva....97
6.3 Utjecaj ispitivanih tvari na ostale organe....100
6.4 Oksidativni stres....103
6.5 MALDI-TOF-MS analiza metabolita i lipida....106
6.5.1 Utjecaj na jetru....107
6.5.2 Utjecaj na perigonadalno masno tkivo....110
6.6. Implikacije dobivenih rezultata i mogućnosti daljnjih istraživanja....112
7. ZAKLJUČAK....115
8. SAŽETAK....116
9. SUMMARY....117
10. LITERATURA....119
11. ŽIVOTOPIS....151

POPIS KRATICA

6PN	6-prenilnaringenin
8PN	8-prenilnaringenin
9-AA	9-aminoakridin
AH	ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata
AH-X	ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja
AL	ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata
ALT	alanin aminotransferaza
ALP	alkalna fosfataza
AL-X	ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja
AMI	amilaza
ANOVA	analiza varijance (engl. *analysis of variance*)
BMD	mineralna gustoća kosti (engl. *bone mineral density*)
BP	pufer za blokiranje korišten u western blotu
CFU-M	stanice koje stvaraju kolonije makrofaga (engl. *macrophage colony forming unit*)
CT	računalna tomografija (engl. *computed tomography*)
CTGF	čimbenik rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor*)
CTX1	karboksi terminalni križno povezani telopeptid kolagena tipa 1 (engl. *Carboxy terminal crosslinked telopeptide of type 1 collagen*)
DHB	2,5-dihidroksibenzojeva kiselina
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
ERα	estrogenski receptor alfa
ERβ	estrogenski receptor beta
GPER1	estrogenski receptor vezan na G protein (engl. *G protein-coupled estrogen receptor 1*)
IG	intragastrički

IGF-1	čimbenik rasta nalik inzulinu tipa 1 (engl. *insulin-like growth factor-1*)
IKH	izoksantohumol
K	zdrava kontrolna skupina (placebo operacija)
KH	ksantohumol
M-CSF	čimbenik stimulacije kolonije makrofaga (engl. *macrophage colony-stimulating factor*)
MALDI-TOF-MS	masena spektrometrija metodom MALDI-TOF (engl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*)
MDA	malondialdehid
MMP-9	metaloproteinaza matriksa 9 (engl. *matrix metaloproteinase 9*)
MSC	mezenhimske matične stanice (engl. *mesenchymal stem cells*)
NBF	neutralni puferirani formalin (engl. *neutral buffered formalin*)
OV	ovarijektomirane netretirane životinje
P1NP	N-terminalni propeptid prokolagena tipa 1 (engl. *Procollagen Type 1 N-terminal propeptide*)
PBS	fosfatni pufer (engl. *phosphate-buffered saline*)
PBS-T	fosfatni pufer s 0,1 % Tween 20 detergenta
PPAR-γ	receptor za aktivator proliferacije peroksisoma tip gama (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)
PTH	paratiroidni hormon
PTHrP	protein srodan paratiroidnom hormonu (engl. *PTH-related protein*)
RANKL	ligand za receptorski aktivator nuklearnog čimbenika kapa B (engl. *receptor activator of nuclear factor κB ligand*)
RANK	receptorski aktivator nuklearnog čimbenika kapa B (engl. *receptor activator of nuclear factor κB*)
ROI	područje od interesa (engl. *region of interest*)
ROS	slobodni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*)
SD	standardna devijacija
SERM	selektivni modulator estrogenskih receptora (engl. *selective estrogen receptor modulator*)

SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
TGF-β1	transformirajući čimbenik rasta beta 1 (engl. *transforming growth factor beta 1*)
X	ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja

1. UVOD

1.1 Osteoporoza

Osteoporoza je najčešći metabolički poremećaj koštanog sustava današnjice. Prema definiciji, osteoporoza je sistemski poremećaj skeleta karakteriziran smanjenjem koštane mase i promjenama mikro i makro arhitekture kosti te povezan s povećanim rizikom od nastanka prijeloma (1). Dijeli se u dvije kategorije: primarnu i sekundarnu osteoporozu. Primarna osteoporoza je ili postmenopauzalna (tip 1) ili staračka (tip 2) dok sekundarna osteoporoza nastaje kao posljedica drugih bolesti ili vanjskih utjecaja (2). Bolesti koje uzrokuju sekundarnu osteoporozu mogu biti genetičke (Gaucherova bolest, hemokromatoza, *osteogenesis imperfecta*, porfirija), hipogonodalna stanja (Turnerov i Klinefelterov sindrom, rezistencija na androgene hormone), endokrini poremećaji (akromegalija, *diabetes mellitus*, poremećaji nadbubrežne žlijezde, hiperprolaktinemija), neki poremećaji probavnog sustava, hematološki poremećaji (hemofilija, multipli mijelom, leukemije i limfomi) ili reumatološke bolesti kao reumatoidni artritis. Nedostatak nutrijenata (kalcij, vitamin D, magnezij) ili određeni lijekovi (heparin, varfarin, ciklosporini, glukokortikoidi, tiroksin) također su povezani s nastankom sekundarne osteoporoze (3). Najčešći oblik osteoporoze je postmenopauzalna osteoporoza koja je posljedica nedostatka spolnog hormona estrogena. Stoga je osteoporoza prvenstveno bolest koja zahvaća žene, ali staračka osteoporoza i sekundarna osteoporoza zahvaćaju i muškarce.

Dijagnoza osteoporoze najčešće se uspostavlja korištenjem dvoenergetske apsorpciometrije rendgenskih zraka kojom se mjeri mineralna gustoća kostiju (engl. *bone mineral density*, BMD). BMD pokazuje količinu kalcija u gramima po centimetru kvadratnom mjerene kosti (g/cm^2). Preporučena mjesta za mjerenja BMD-a su kuk ili kralježnica (4). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO) dobiveni BMD se uspoređuje s referentnom srednjom vrijednosti mineralne gustoće kostiju izmjerenom u mladih osoba istog spola. Dobivena usporedba se izražava u obliku rezultata pod nazivom T-score (mjera pomaka vrijednosti iznad ili ispod srednje vrijednosti) s mjernom jedinicom SD (standardna devijacija) (1). Kriterij SZO za dijagnozu osteoporoze je mineralna gustoća kostiju manja za 2,5 ili više SD (T-score manji od -2,5 SD) (4). Dobivene vrijednosti BMD-a mogu se svrstati u 4 kategorije. Prva kategorija je normalna vrijednost mineralne gustoće kostiju koja ima T-score iznad -1 SD u odnosu na referentnu vrijednost. U kategoriju snižene koštane mase ili stanje osteopenije pripadaju vrijednosti BMD-a manje od -1 SD i iznad -2,5 SD. Druge dvije kategorije su osteoporoza

(vrijednost manja od -2,5 SD), a ukoliko uz nisku vrijednost BMD-a postoji i prijelom, takva osoba spada u kategoriju teške osteoporoze (5).

Starenjem populacije i produljenjem očekivanog životnog vijeka dolazi i do povećanja pojavnosti osteoporoze. Meta-analizom dostupne literature od 2000. do 2020. godine, Salari i suradnici su na više od 103 milijuna ispitanika u dobnom rasponu od 15 do 105 godina procijenili da preko 18 % svjetske populacije boluje od osteoporoze (6). Na razini 27 zemalja Europske unije se prema izvješću iz 2010. godine procjenjuje da od osteoporoze boluje 22 milijuna žena i 5,6 milijuna muškaraca (7), a prema izvješću iz 2019. godine procjenjuje se da u zemljama Europske unije brojke iznose 25,5 milijuna žena i 6,5 milijuna muškaraca (8). Dakle, u 9 godina broj oboljelih od osteoporoze u Europskoj uniji je porastao za 15 % u žena i 16 % u muškaraca. Prema podatcima iz 2019. godine procjenjuje se da u Hrvatskoj od osteoporoze boluje oko 250 tisuća ljudi (80 % su žene) što čini 5,5 % populacije (9).

Niska koštana gustoća smanjuje strukturnu snagu kostiju u oboljelih od osteoporoze i čini ih lomljivima. Osteoporoza je „tiha“ bolest s malim utjecajem na oboljelu osobu sve do nastanka prijeloma. Prijelomi kosti uzrokovani osteoporozom vrlo teško zacjeljuju, a veća je i učestalost sekundarnih prijeloma. Najčešća mjesta prijeloma su kuk, kralježnica, podlaktica i rame. Osim navedenih, česti su prijelomi rebara, goljenične kosti, zdjelice i bedrene kosti (8). Takvi prijelomi mogu uzrokovati kroničnu bol, invalidnost, smanjuju kvalitetu života, a u nekim slučajevima dovode i do smrti. Pokazano je da prijelomi kuka dovode do povećanja stope smrtnosti od 15 do 20 % unutar prve godine od prijeloma, u oko 20 do 50 % pacijenata je potrebna dugoročna njega (10), a manje od polovice osoba uspije vratiti razinu funkcionalnosti i kvalitete života koju su imali prije prijeloma kuka (11). Ukupne brojke za prijelome uzrokovane osteoporozom na razini svijeta je teško naći. Za 2000. godinu je procijenjeno da je broj prijeloma zbog osteoporoze iznosio oko 9 milijuna, od čega je 1,6 milijuna bilo prijeloma kuka, 1,7 milijuna prijeloma podlaktice i 1,4 milijuna prijeloma kralježnice (12). Procijenjeno je da se u 2019. godini u Europskoj uniji dogodilo oko 4,3 milijuna novih prijeloma uzrokovanih osteoporozom. Od toga je 19 % bilo prijeloma kuka, što je povećanje od 33 % od 2010. do 2019. godine (8). Prema podacima za 2019. godinu u Hrvatskoj je bilo oko 35 tisuća novih prijeloma uzrokovanih osteoporozom, a do 2034. godine očekivan je porast na 39 tisuća prijeloma godišnje (9).

Osim zdravstvene štete koju oboljelima nanose prijelomi uzrokovani osteoporozom, ta bolest također vrši i pritisak na sustav zdravstva. Cijena liječenja osteoporotskih prijeloma

značajno varira u svijetu, ali prema dostupnim informacijama u Sjedinjenim Američkim Državama za svaki slučaj prijeloma potrebno je utrošiti 5 do 19 tisuća dolara (13). Svaki slučaj u Velikoj Britaniji stvara oko 5300 dolara troška (14). U Europskoj uniji je od ukupnog troška zdravstva za 2019. godinu 3,5 % (55,3 milijardi od 1,6 bilijuna eura) utrošeno na liječenje osteoporotskih prijeloma. Informacije o troškovima drugih bolesti na razini Europske unije su manjkave, ali procijenjeni trošak liječenja koronarnih bolesti srca, prema izvještaju iz 2003. godine i nakon korekcije inflacije, iznosio je oko 58,4 milijarde eura (8), što prema ekonomskom pritisku na zdravstveni sustav svrstava osteoporozu uz bok koronarnim bolestima srca. Na razini Hrvatske trošak liječenja osteoporotskih prijeloma, prema informacijama dostupnim za 2019. godinu, iznosio je 136 milijuna eura što je 3,9 % ukupnog troška zdravstvenog sustava (9).

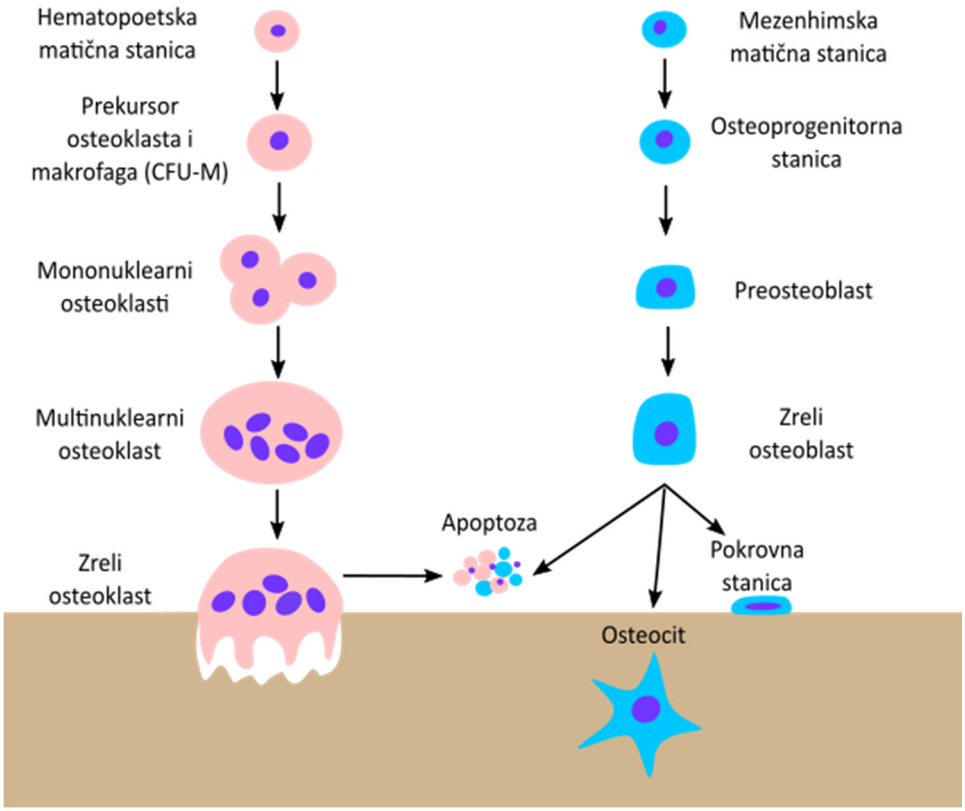
1.2 Koštani metabolizam

Koštani sustav je vrlo dinamična struktura koja se kontinuirano pregrađuje kako bi ispunio strukturne i metaboličke potrebe organizma. Primjerice, kod astronauta je zapaženo da kosti donjih udova gube oko 0,8 % koštane mase svaki mjesec boravka u uvjetima mikrogravitacije (15). Također, dugoročna imobilizacija dovodi do gubitka koštane mase u nekoliko stadija: brzi gubitak koštane mase u početku, potom spori gubitak koštane mase (nakon vise od 12 tjedana imobilizacije) te stabilizacija na 40 do 70 % od originalne koštane mase kao treći stadij (16). Osim strukturnih potreba, koštani sustav svojim remodeliranjem sudjeluje u održavanju homeostaze u organizmu služeći kao glavno skladište kalcija (17). Anatomski, kosti se dijele na duge kosti (kosti udova), plosnate kosti (kosti lubanje, čeljust, lopatica) i kratke kosti (kralješci, kosti zapešća). Osim po anatomskom obliku, kosti možemo podijeliti i prema načinu nastanka. Duge i kratke kosti nastaju prvenstveno enhondralnim okoštavanjem iz hrskavične osnove. Plosnate kosti nastaju intramembranskim okoštavanjem koje kreće zgušnjavanjem stanica mezenhima i izravnim okoštavanjem bez hrskavične podloge. Nastale kosti imaju čvrsti površinski sloj kompaktne kosti i središnji spužvasti dio sastavljen od koštanih gredica između kojih se nalazi koštana srž.

Prema kemijskom sastavu, kost je spoj organske i anorganske tvari. Anorganska tvar čini 60 % mase kosti, organska tvar 30 %, dok preostalih 10 % čini voda (18). Osim prisutnih nečistoća, anorganska je tvar sastavljena od kristala hidroksiapatita kemijske formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Nečistoće su posljedica zamjene fosfatne skupine karbonatnom, zamjene kalcija natrijem, stroncijem, kalijem ili magnezijem, a umjesto hidroksilne skupine neki kristali

hidroksiapatita sadrže kloridni ili fluoridni ion (19). Organski dio kosti građen je većinom od molekula kolagena tipa I (~ 90 %), koji je trostruka uzvojnica sastavljena od tri duga polipeptida od kojih svaki broji preko tisuću aminokiselina. Tri polipeptidna lanca (dva α1 i jedan α2 lanac) su međusobno povezani vodikovim vezama hidroksiprolina i međusobno se udružuju u kolagena vlakanca koja formiraju kolagena vlakna. Uz kolagen tipa I, organski dio sadrži i druge, nekolagene, proteine (~ 10 %) koji potpomažu elastičnost i mehaničku otpornosti kosti, a sudjeluju i u kontroli koštanog metabolizma (18). Nekolageni proteini identificirani u kosti su: osteokalcin, biglikan, dekorin, fibrinil-2, osteonektin, periostin, osteopontin, koštani sijaloprotein i vanstanični protein matriksa (20). Neki od tih proteina, kao primjerice osteopontin, nakon karboksilacije ostaju unutar matriksa i stvaraju veze koje pomažu pri raspršenju energije te čine kosti otpornijima na prijelome (20, 21). Izostanak nekolagenih proteina kosti u koštanom matriksu, dovodi do promjena mehaničkih svojstava kostiju. Nedostatak osteokalcina uzrokuje stvaranje manjih i nezrelih kristala hidroksiapatita, nedostatak biglikana smanjuje broj koštanih gredica i njihovu povezanost, dok nedostatak dekorina mijenja oblik kolagenih vlakanaca i smanjuje njihovu veličinu. Ukoliko nedostaje periostin, manje je veza između kolagenih vlakana i povećava se broj pukotina na kostima, manjak osteonektina povećava mineralni sastav kosti i kristalnost, a manjak osteopontina smanjuje omjer anorganskog i organskog sastava kosti (20).

Stanice koje izgrađuju i održavaju kost su osteoblasti, osteoklasti i osteociti. Osteoblasti izgrađuju novo koštano tkivo i prekrivaju površinu kosti. Nasuprot tome, osteoklasti su zaduženi za razgradnju koštanog tkiva. Oba tipa stanica zajedno održavaju ravnotežu u pregradnji kosti i sudjeluju u održavanju homeostaze kalcija i fosfora u organizmu. Treći tip stanica, osteociti, su stanice koje se nalaze trajno okružene koštanim matriksom i sudjeluju u održavanju koštanog matriksa.



Slika 1.1. Razvojni stadiji stanica koštanog sustava. Lijevo je prikaz razvoja osteoklasta iz hematopoetske matične stanice u stanice koje stvaraju kolonije (CFU-M) do stadija zrelog osteoklasta. Desno je prikaz razvoja osteoblasta iz mezenhimskih matičnih stanica koji se kasnije diferenciraju u osteocite ili stanice endosta. Zreli osteoklasti i zreli osteoblasti mogu ući u apoptozu (programiranu smrt stanice) pod utjecajem signalnih puteva. Sliku izradio autor.

1.2.1 Osteoblasti

Osteoblasti su stanice koje nastaju iz mezenhimskih matičnih stanica (engl. *mesenchymal stem cells*, MSC) koštane srži (22). MSC se unutar kosti nalaze između stanica koštane srži, a inače služe kao izvor za nastanak osteoblasta (osteogeneza), hondrocita (hondrogeneza), adipocita (adipogeneza), miocita (miogeneza) i fibroblasta. Prvi korak u razvoju osteoblasta je opredjeljivanje MSC u osteoprogenitornu stanicu. Opredjeljivanje MSC je kompleksan proces, ali identificirani su glavni transkripcijski čimbenici koji MSC usmjeravaju u jednu od navedenih staničnih linija. Pod utjecajem čimbenika RUNX2 povećava se osteogeneza, smanjuje hondrogeneza i adipogeneza. Čimbenik SOX9 potiče hondrogenezu i smanjuje osteogenezu inhibicijom čimbenika RUNX2. Adipogeneza je pod kontrolom receptora za aktivator proliferacije peroksisoma tip gama (engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, PPAR-γ). Miogeneza je pod kontrolom cijele skupine transkripcijskih čimbenika i ovisi o tipu mišićnog tkiva (23). Glavni transkripcijski čimbenici za poticanje diferencijacije

MSC u fibroblaste *in vivo* nisu poznati, ali *in vitro* istraživanja su pokazala da pod utjecajem čimbenika rasta vezivnog tkiva (engl. *connective tissue growth factor*, CTGF) i askorbinske kiseline dolazi do diferencijacije MSC u fibroblaste (24, 25). Nakon što se MSC opredijeli za osteogenetsku lozu, dolazi do proliferacije i ekspresije karakterističnih proteina unutar osteoprogenitorne stanice: histona, kolagena tipa I, fibronektina, c-fos, c-jun i p21 (26). Nakon toga, stanice završavaju proliferaciju, postaju preosteoblasti i prelaze u fazu stvaranja izvanstaničnog matriksa karakteriziranu sintezom koštane alkalne fosfataze, koštanog sijaloproteina i kolagena tipa I. U zadnjoj fazi, zreli osteoblasti ispoljavaju gene uključene u mineralizaciju koštanog matriksa kao što su geni za osteokalcin, osteopontin i kolagenazu (27). Osim djelovanjem transkripcijskog čimbenika RUNX2, diferencijacija osteoblasta je kontrolirana interakcijama cijelog niza transkripcijskih čimbenika od kojih su neki: Osterix, SMAD porodica, Wnt/β-katenin, NFATc1, Twist, AP-1 i ATF4 (23).

Glavna uloga osteoblasta je izgradnja i mineralizacija kosti. Osim toga, diferencirani osteoblasti prekrivaju površinu kosti i odvajaju koštani matriks od ostatka tkiva. Nusprodukt formiranja hidroksiapatita i izgradnje anorganskog dijela koštanog matriksa su H^+ ioni koji konstantno snižavaju pH vrijednost okoliša na mjestu mineralizacije. Održavanjem ravnoteže iona osteoblasti omogućavaju da izrazito spor proces nastanka hidroksiapatita koji je ovisan o pH može teći neometano i neovisno o serumskoj koncentraciji kalcija i fosfora (28). Rastom kosti, neki od osteoblasta se ugrađuju u koštani matriks i diferenciraju u osteocite, drugi čine pokrovne stanice ili odlaze u programiranu smrt stanice (apoptozu). Osteociti ostaju trajno uloženi u koštani matriks. Međusobno i s površinskim slojem osteoblasta komuniciraju putem tijesnih spojeva na tankim citoplazmatskim izdancima koji se pružaju kroz kanaliće u koštanom matriksu (*canaliculi ossei*). Kako kost raste i osteoblasti zauzimaju različite uloge u kosti, njihova populacija se kontinuirano obnavlja iz mezenhimskih matičnih stanica (Slika 1.1.).

1.2.2 Osteoklasti

Do 1980-tih godina smatralo se kako sve stanice uključene u metabolizam kosti dolaze iz istog izvora i sličnih prekursornih stanica (29). No parabiotski pokusi (spajanje dva organizma operativnim putem) na štakorima i presađivanje koštane srži u svrhu liječenja osteopetroze pokazali su da osteoklasti nastaju iz hematopoetskih stanica (30, 31). Učinkovitost presađivanja koštane srži kao lijeka za osteopetrozu također je potvrđena i u ljudi (32). Hematopoetske matične stanice su pluripotentne stanice koje su osnova za razvoj svih krvnih stanica. Pluripotentne stanice proliferiraju u dvije loze – limfatičnu i mijeloičnu. Jedna od linija razvoja

mijeloične loze su stanice koje stvaraju kolonije makrofaga (engl. *macrophage colony forming unit*, CFU-M) za koje je 1988. godine dokazano da služe i kao osnova za razvoj osteoklasta (33). Također, istraživanja *in vitro* ko-kultura stanica pokazala su da je za diferencijaciju osteoklasta nužan kontakt s osteoblastima i dva čimbenika koji oni proizvode – čimbenik stimulacije kolonije makrofaga (engl. *macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) i ligand za receptorski aktivator nukelarnog čimbenika kapa B (engl. *receptor activator of nuclear factor κB ligand*, RANKL) (34, 35). M-CSF je nužan čimbenik koji potiče ekspresiju receptorskog aktivatora za nukelarni čimbenik kapa B (engl. *receptor activator of nuclear factor κB*, RANK), a stimulacija RANKL-om nakon M-CSF-a dovodi do ispoljavanja gena unutar prekursora osteoklasta koji te stanice usmjeravaju u razvoj do zrelog osteoklasta (35). Prekursori osteoklasta uz utjecaj RANKL-a i RANK-a proliferiraju u mononuklearne osteoklaste koji se stapaju u multinuklearni osteoklast iz kojeg se u konačnici razvija zreli aktivni osteoklast (Slika 1.1.).

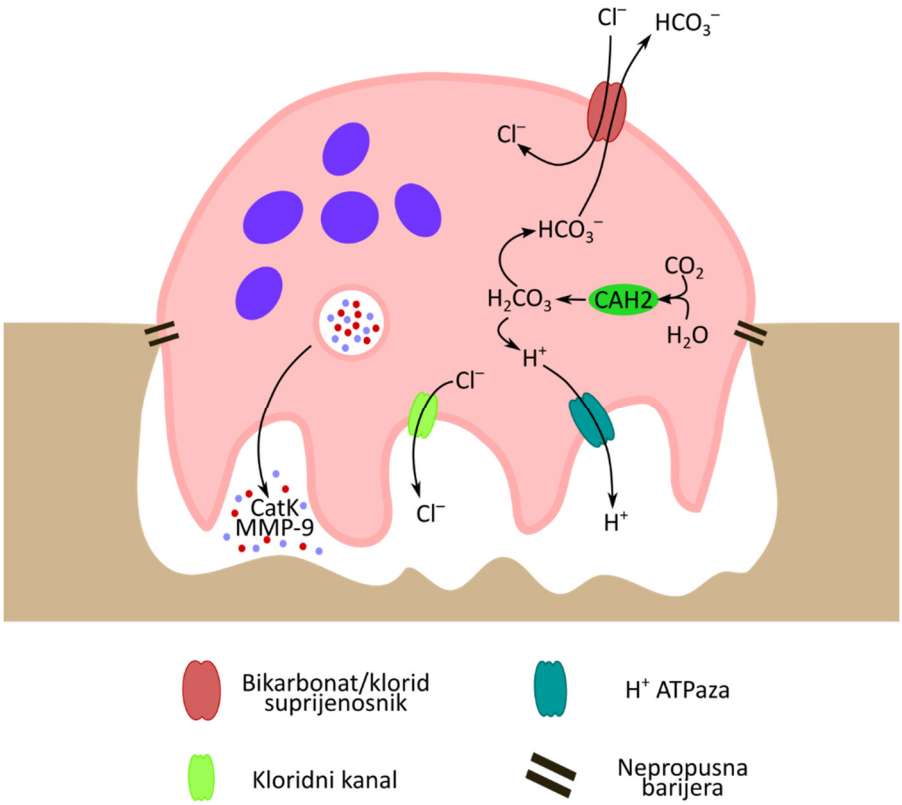
Nastali osteoklasti sudjeluju u pregradnji kosti i njihova glavna zadaća je resorpcija anorganskog matriksa kosti proizvodnjom vodikovih i kloridnih iona te organskog matriksa pomoću katepsina K. Osim toga, uključeni su u lučenje citokina i čimbenika koji kontroliraju koštani metabolizam i održavanje homeostaze kalcija (komponenta komplementa 3a, efrin B2, Atp6v0d2 (V0 domena vaskularne ATPaze), semaforin 4D, sklerostin, mikroRNA (miR-214, miR-214-3p), egzomi osteoklasta, Wnt10b, BMP6, sfingozin-1-fosfat) (36–38).

1.2.3 Pregradnja kosti

Pregradnja kosti je proces u kojem se koštano tkivo resorbira i ponovno izgrađuje. Tim procesom kost se obnavlja kako bi održala svoju strukturnu snagu i kako bi se održala ravnoteža kalcija i fosfora u organizmu. Kroz godinu dana, pregradi se oko 5 % kompaktne i 20 % spužvaste kosti, a kompletni kostur odrasle osobe se izmjeni kroz 10 godina (39). Pregradnja kosti se odvija lokalno na dijelu kosti, a poznata su dva načina inicijacije. Ciljana pregradnja je lokalno potaknuta signalnim molekulama koje privlače osteoklaste i potiču resorpciju kosti, dok stohastička pregradnja kreće nasumično bez utjecaja signalnih molekula (39). Proces pregradnje se odvija kroz cijeli život i može se podijeliti u pet faza:

1. Faza inicijacije: Osteociti detektiraju makro- ili mikrooštećenje kosti te šalju signale koji privlače CFU-M stanice iz koštane srži ili kapilara koje prolaze kroz kanale kosti na mjesto pregradnje kosti. CFU-M stanice se diferenciraju u osteoklaste kako je prethodno opisano (potpoglavlje 1.2.2) i mogu započeti drugu fazu pregradnje (39, 40).

2. Faza resorpcije: Osteoklasti adheriraju uz koštani matriks, stvaraju nepropusnu barijeru oko sebe i počinju otapati koštani matriks. Uleknuće koje nastaje na površini kosti naziva se Howshipova lakuna. Reakcijom unutar osteoklasta od ugljikova dioksida i vode, uz pomoć enzima ugljikove anhidraze 2, nastaje ugljična kiselina (H_2CO_3) koja disocira na vodikove (H^+) i bikarbonatne ($HCO3^-$) ione. Bikarbonatni ion se izbacuje iz osteoklasta kroz bikarbonat/klorid suprijenosnik iona, a vodikovi ioni se aktivnim transportom prebacuju u prostor Howshipove lakune (Slika 1.2.). Kloridni ioni uneseni u osteoklast ulaze kroz kloridni kanal u Howshipovu lakunu i zajedno s vodikovim ionima zakiseljuju prostor na vrijednost pH ~ 4,5, što dovodi do otapanja anorganskog dijela kosti. Organski dio kosti uklanja se uz pomoću enzima katepsina K i metaloproteinaze matriksa 9 (MMP-9) koje sintetiziraju i luče osteoklasti. Resorpcija osteoklastima traje 2 do 4 tjedna i pod kontrolom je RANKL čimbenika. Nakon što završe resorpciju, osteoklasti odlaze u apoptozu a u međuvremenu iz koštane srži i kapilara se novače MSC od kojih će nastati osteoblasti (39, 40).
3. Faza preokreta: Nakon završene resorpcije kosti, pokrovne stanice čiste ostatke kolagena i u lakune se naseljavaju osteoblasti. Prvo se formira sloj glikoproteina (cement) na koji osteoblasti prianjaju i počinju odlagati novi koštani materijal (39, 40).
4. Faza oblikovanja: Osteoblasti odlažu nemineralizirani koštani matriks (osteoid) koji mineralizira u dvije faze. Prva faza je ulaganje iona kalcija i fosfora u organski matriks koji u drugoj fazi sazrijevaju i stvaraju kristale hidroksiapatita. Tijekom faze oblikovanja većina osteoblasta (~ 90 %) odumire apoptozom dok se ostali diferenciraju u pokrovne stanice i osteocite (39, 40).
5. Faza mirovanja: Nakon što je resorpcija i izgradnja kosti dovršena, površinu kosti prekrivaju pokrovne stanice i proces je završen (39).



Slika 1.2 Prikaz resorpcije kosti osteoklastom. Ugljikova anhidraza 2 (engl. c*arbonic anhydrase 2*, CAH2) koristi vodu i ugljikov dioksid za stvaranje ugljične kiseline koja disocira na vodikov i bikarbonatni ion. Bikarbonatni ion se izbacuje bikarbonat/kloridnim ionskim suprijenosnikom dok se kloridni ion unosi u stanicu i prenosi u prostor između osteoklasta i kosti (Howshipovu lakunu) kloridnim kanalom. Vodikov ion se aktivnim transportom kroz protonsku pumpu ubacuje u Howshipovu lakunu dok se enzimi koje osteoklast sintetizira (katepsin K [engl. *cathepsin* K, CatK] i metaloproteinaza matriks 9 [MMP-9]) prenose vezikulama. Između osteoklasta i kosti nalazi se nepropusna barijera koja odvaja Howshipovu lakunu od okoliša. Sliku izradio autor.

1.2.4 Kontrola metabolizma kosti

Osim već spomenute kontrole putem čimbenika koji kontroliraju diferencijaciju osteoblasta i osteoklasta (potpoglavlja 1.2.1 i 1.2.2) postoje i dodatni mehanizmi kontrole na lokalnoj razini. Signalni receptori na membranama samih koštanih stanica kontroliraju aktivnost stanica. Signalne molekule iz obitelji efrina omogućuju dvostranu komunikaciju između stanica osteoblasta i osteoklasta. Efrin B2 na površini osteoklasta veže se na membransku molekulu efrin B4 osteoblasta te potiče osteoblastogenezu i sprječava apoptozu osteoblasta. Preko istog sustava osteoblast može spriječiti osteoklastogenezu (41). FasL-Fas je druga veza preko koje se osteoblast Fas ligandom (FasL) veže na osteoklast i inicira apoptozu u njemu. Treća membranska molekula osteoblasta koja komunicira s osteoklastom je semaforin 3A koji se veže na neuropilin-1 osteoklasta te inhibira osteoklastogenezu potaknutu RANKL-om (37). Osim

membranskih molekula, osteoblast kontrolira osteoklaste i parakrinim lučenjem topivih molekula: M-CSF-a (proliferacija prekursora osteoklasta), osteoprotegerina (inhibicija utjecaja RANKL), proteina Wnt16 (inhibicija osteoklastogeneze) i Wnt5A (poticanje osteoklastogeneze) (37). Osteoklasti luče čimbenike koji potiču osteoblastogenezu: komponenta komplementa C3, Wnt10B, RANK i CTHRC1 (engl. *collagen triple helix repeat containing 1*) (42–44). Sfingozin-1-fosfat, izlučen iz osteoklasta, održava osteoblaste živima i potiče ih na migraciju (45). Dva čimbenika koji se odlažu u koštani matriks i oslobađaju tijekom resorpcije kosti su transformirajući čimbenik rasta beta 1 (engl. *transforming growth factor beta 1*, TGF-β1) i čimbenik rasta nalik inzulinu tipa 1 (engl. *insulin-like growth factor*-1, IGF-1). Otpuštanje TGF-β1 potiče diferencijaciju MSC stanica u osteoblaste, a otpuštanje IGF-1 potiče osteogenezu djelovanjem na osteoblaste (46–48). Također, osteociti odlažu sklerostin u koštani matriks koji se oslobađa resorpcijom kosti i potiče sintezu RANKL (49).

Uz lokalnu kontrolu, metabolizam kosti podliježe i kontroli na razini organizma. U slučaju održavanja homeostaze kalcija, doštitne žlijezde (lat. *glandulae parathyroideae*) direktno kontroliraju pregradnju kosti lučenjem paratiroidnog hormona (PTH). Niske razine kalcija u krvi potiču doštitne žlijezde na lučenje PTH čime se potiče resorpcija kosti osteoklastima i podiže koncentracija iona kalcija u krvi. Kada su razine kalcija previsoke, štitna žlijezda luči hormon kalcitonin, koji potiče aktivnost osteoblasta, smanjuje aktivnost osteoklasta, izgradnju kosti i time smanjuje koncentraciju slobodnog kalcija u krvi (50). Oba hormona su pod utjecajem negativne povratne sprege, jer kada je postignuta normalna razina kalcija u krvi, osjetni receptori na stanicama doštitne i štitne žlijezde zaustavljaju lučenje spomenutih hormona.

Hormon rasta (somatotropin) kojeg luči hipofiza je još jedan od načina kontrole koštanog metabolizma i prvenstveno je uključen u rast kostiju u dužinu. Djeluje vezanjem na receptor hormona rasta i potiče rast direktno ili preko inicijacije sinteze i lučenja IGF-1 (51). Hipotalamus direktno kontrolira lučenje somatotropina iz hipofize putem somatotropnog hormona oslobađanja (potiče lučenje) te somatostatina (smanjuje lučenje) a tu je i utjecaj negativne povratne sprege preko samog somatotropina. Istraživanjima je pokazano da hormon grelin kojeg luče enteroendokrine stanice crijeva također potiče lučenje somatotropina (52). Somatotropin krvotokom dolazi do jetre gdje potiče sintezu i oslobađanje IGF-1 u krv. IGF-1 povratnom spregom djeluje na hipotalamus i regulira otpuštanje somatotropina. U kostima, somatotropin i IGF-1 potiču proliferaciju osteoblasta, izgradnju koštanog matriksa, lokalnu

sintezu IGF-1, proliferaciju osteoklasta i resorpciju kosti što rezultira povećanjem stope pregradnje kosti (53).

Spolni hormoni također reguliraju koštani metabolizam. Povijesno se smatralo da ženski spolni hormon, estrogen, regulira koštani metabolizam kod žena, a muški spolni hormon, testosteron, kod muškaraca. Novije studije su pokazale da estrogen kontrolira građu kompaktne kosti u oba spola (54). Spužvastu kost održavaju oba hormona s tim da je kod muškaraca dominantan testosteron, a kod žena estrogeni (55, 56).

1.3 Estrogeni

Estrogeni su steroidni spolni hormoni koji sudjeluju u razvoju ženskog spolnog sustava i sekundarnih spolnih karakteristika. Osim toga, estrogeni su uključeni u regulaciju lučenja gonadotropina, ovulacije, pripremanje tkiva za odgovor na progesteron, regulaciju sinteze lipida, kontrolu odgovora na inzulin, održavanje kognitivnih funkcija i održavanje koštane mase (57). U ljudi su najčešći oblici estrogena estron (E1), estradiol (E2), estriol (E3) i estretrol (E4) (58). Estradiol je najviše zastupljen u premenopauzalnih žena, a u postmenopauzi i kod muškaraca najčešći je estron (59). Glavni izvor estrogena kod žena su granuloza stanice jajnika koje koriste enzim aromatazu za demetliaciju androgena i sintezu estrogena (60). Osim u granuloza stanicama, aromatazu i sintezu estrogena je moguće naći u različitim dijelovima organizma (u oba spola). Neki od organa koji posjeduju aromatazu su: posteljica, koža, mozak, masno tkivo, jetra, mliječna žlijezda i prostata (57, 60). Stoga nije čudno da uloga estrogena seže puno dalje od posrednika u razvoju ženskog spolnog sustava i sekundarnih spolnih karakteristika. Slobodno kolajući estrogen u krvi i lokalno sintetizirani estrogen imaju sposobnost prolaska kroz staničnu membranu i direktnog djelovanja na dva estrogenska receptora jezgre – estrogenski receptor alfa (ERα) i estrogenski receptor beta (ERβ).

1.3.1 Estrogenski receptori – struktura i djelovanje

Krajem 60-tih godina, Jensen je opisao da tkiva ovisna o spolnim hormonima u žena imaju sposobnost vezanja estrogena iz cirkulacije i time je otkriven prvi ikad receptor za hormone (61, 62). Desetak godina kasnije isti autor dokazao je da vezani kompleks estrogena i estrogenskog receptora ulazi u jezgru i direktno utječe na prepisivanje gena, a dvadesetak godina kasnije taj je isti receptor uspješno kloniran iz ljudskih staničnih kultura i opisan kao estrogenski receptor alfa (58). Drugi jezgreni receptor estrogena otkriven je tek 1996. godine u stanicama prostate štakora (63). ERα i ERβ su slične veličine i građe – 59 kDa (Erα) i 67 kDa

(Erβ). Imaju 4 regije koje im omogućuju aktivaciju prepisivanja gena (kroz upotrebu cinkovih prstiju), direktno vezanje na kromatin i dimerizaciju, vezanje proteina pratilaca (engl. *chaperone*), vezanje liganda i translokaciju u jezgru (58). Početkom 21. stoljeća identificiran je prvi membranski receptor za estrogene koji sudjeluje u brzom odgovoru na estrogen: estrogenski receptor vezan na G protein (GPER1, engl. *G protein-coupled estrogen receptor 1*) (64, 65). GPER1 je transmembranski receptorni protein koji je manji od dva jezgrina estrogenska receptora i veličine 40-tak kDa (66).

Mehanizam djelovanja estrogenskih receptora ugrubo se može podijeliti u 4 kategorije: genomski, upareni, negenomski i neovisni o ligandu (58). Genomski mehanizmi uključuju vezanje aktivnog oblika estrogenskog receptora direktno na motive unutar kromatina koji imaju afinitet za receptor. Time se potiče kaskada transkripcijskih čimbenika koja omogućuje vezivanje RNA polimeraze i potiče prepisivanje gena (67). Vezanjem ili „uparivanjem" aktiviranog estrogenskog receptora na druge transkripcijske čimbenike također dolazi do aktivacije prepisivanja gena, ali prema istraživanjima takav mehanizam signalizacije nije čest (68, 69). Negenomski utjecaj aktiviranog estrogenskog receptora pokreće unutarstanične signalne puteve umjesto direktnog utjecaja na transkripciju gena (70, 71). U načinu djelovanja neovisnom o ligandu aktivacija drugih signalnih puteva dovodi do aktivacije estrogenskih receptora. Primjer toga je aktivacija IGF-1 signalnog puta koja aktivira transkripciju gena vezanjem ERα na kromatin (72). Za GPER1 se smatra da je dio negenomske signalizacije estrogena (64, 65).

Sva tri estrogenska receptora prisutna su u različitim tkivima organizma. Neka tkiva posjeduju samo jedan od receptora dok druga tkiva, kao što je većina reproduktivnih organa i masno tkivo, sadrže sva tri tipa receptora. ERα može se naći u hipotalamusu, testisima, jajniku, maternici, prostati, mliječnoj žlijezdi, bubregu, jetri, mišićima i masnom tkivu. Organi i tkiva koji sadrže ERβ su: testisi, jajnici, prostata, endotelne stanice krvnih žila, mokraćni mjehur, debelo crijevo, nadbubrežna žlijezda, gušterača, mišići i masno tkivo. GPER1 se nalazi u živčanom sustavu (centralni i periferni), maternici, mliječnim žlijezdama, testisima, gušterači, bubregu, jetri, nadbubrežnoj žlijezdi, hipofizi i masnom tkivu (64). U koštanom tkivu postoje oba estrogenska receptora, ali se smatra da je ERα važniji za razvoj i očuvanje kosti (73).

1.3.5 Osteoporoza i estrogeni

Glavna poveznica između razvoja osteoporoze i estrogena prepoznata je 1940. godine kada je Albright pokazao da ovarijektomija i menopauza uzrokuju brzi gubitak koštane mase i da

homeostaza kalcija kod takvih žena može biti poboljšana nadomještanjem estrogena (74). Prema trenutno prihvaćenom modelu djelovanja estrogena na koštani sustav smatra se da estrogen djeluje na sva tri tipa stanica uključenih u metabolizam kosti i indirektno putem T-limfocita. Prema tom modelu, estrogen smanjuje koštanu pregradnju, smanjuje resorpciju kosti, smanjuje apoptozu osteoblasta i povećava stopu apoptoze osteoklasta (75). Istraživanja na životinjama s isključenim genom za ERα pokazala su da estrogen štiti spužvastu kost od resorpcije djelovanjem na osteoklaste, ima važnu ulogu u nakupljanju kompaktne kosti djelovanjem na prethodnike osteoblasta te štiti kompaktnu kost od resorpcije djelovanjem na mezenhimske stanice iz kojih nastaju osteoblasti (76).

Nakon što su nedostatak estrogena i razvoj osteoporoze povezani, nadomještanje estrogena je postalo standardna terapija 1960-tih godina (77). Međutim, istraživanja pripravaka koji sadrže estrogen imaju dugu povijest, od početka 19-og stoljeća, npr. korištenjem sirovih pripravaka reproduktivnih tkiva životinja. Od 60-tih godina do danas, terapija osteoporoze nadomještanjem estrogena je izvor rasprave. Istraživanja pokazuju da terapijsko nadomještanje estrogena pomaže kod osteoporoze i smanjuje rizik od srčanih bolesti u žena, ali također da povećava učestalost raka dojke i maternice te može dovesti do nastanka tromboembolija (78). 1992. godine Ženska zdravstvena inicijativa (engl. *Women's Health Initiative*, WHI) pokrenula je istraživanje utjecaja hormonske terapije na zdravlje žena u trajanju od 15 godina. Istraživanje je obuhvaćalo 161 808 zdravih žena starosti između 50 i 79 godina. Povećana učestalost raka dojke, moždanog udara i kardiovaskularnih komplikacija dovela je do prekida ovog istraživanja u 2002. godini (79). Nakon toga, Međunarodna agencija za istraživanje raka (engl. *The International Agency for Research on Cancer*, IARC) uvrstila je hormonsku terapiju postmenopauzalne osteoporoze na popis znanih humanih kancerogena (80).

Poznato je da estrogen ima utjecaj na homeostazu kalcija u organizmu, i to ne samo u kosti, već i drugim tkivima, npr. u srčanim mišićnim stanicama, gdje estrogen utječe na molekule koje upravljaju ionima kalcija, kao što su kalcijski kanali, membranski suprijenosnici i dr. (81). Estrogen povećava reapsorpciju kalcijevih iona u bubrežnim kanalićima, tako da u postmenopauzi zbog sniženih koncentracija estrogena dolazi do povećanog gubitka kalcijevih iona urinom, a posljedično i do veće resorpcije kosti radi održavanja razine kalcija u serumu (82). Osim toga, estrogen preko svojih receptora na epitelnim stanicama dvanaesnika utječe na ekspresiju kalcijevih prijenosnika na tim stanicama te povećava apsorpciju kalcija u duodenumu. U postmenopauzi je zbog toga smanjena apsorpcija kalcija i povećana potreba za

unosom kalcija hranom (83). Odnos estrogena, homeostaze kalcija i oksidativnog stresa dodatno se opisuje u potpoglavlju 1.7.

1.4 Terapija osteoporoze

Današnja terapija osteoporoze kao primarni cilj ima sprječavanje prijeloma bez obzira na promjene u BMD-u (84). Osnovna terapija osteoporoze je promjena životnih navika (alkohol, pušenje, prehrana…), nadomjestak vitamina D ili kalcitonina, dostatan unos kalcija i tjelesna aktivnost. Medikamentozno liječenje osteoporoze temelji se na davanju anaboličkih ili antiresorptivnih lijekova (85, 86). Terapija nadomještanjem estrogena se još uvijek može koristiti, ali uz već navedene rizike (78).

1.4.1 Anabolički lijekovi

Anabolički lijekovi potiču izgradnju kosti i uzrokuju povećanje BMD-a. Dva glavna lijeka su teriparatid (sintetski oblik paratiroidnog hormona) i abaloparatid (protein sličan paratiroidnom hormonu - PTHrP) (85).

Teriparatid djeluje kao analog PTH-a, čiji je utjecaj na homeostazu kalcija i koštani metabolizam prethodno opisan (potpoglavlje 1.2.4). No istraživanja su pokazala da je za aktivaciju resorpcije kosti putem PTH-a potreban dugotrajni podražaj PTH receptora koštanih stanica. Čestim davanjem malih doza teriparatida aktivira se izgradnja umjesto resorpcije kosti (49). Abaloparatid je sintetski analog PTHrP-a koji je također ligand za PTH receptor. PTH receptor ima dvije moguće konformacije: neovisnu o G proteinima (R^0) i ovisnu o G proteinima (RG). Vezanje na R^0 izaziva duži podražaj, što potiče resorpciju kosti, dok vezanje liganda na RG dovodi do kraćeg podražaja i anaboličkog utjecaja. Nova istraživanja pokazala su da PTHrP, time i abaloparatid, ima veći afinitet za konformaciju PTH receptora ovisnu o G proteinima od samog PTH-a i time veći anabolički utjecaj (87).

Iako povećanje BMD-a anaboličkim lijekovima ima svojih prednosti, ta terapija ima i nedostataka. Smatra se da preveliko ili predugo izlaganje anaboličkim lijekovima može dovesti do razvoja osteosarkoma. Lijekovi se primaju kroz dnevne supkutane injekcije i trajanje terapije je ograničeno na 2 godine, nakon čega dolazi do brzog gubitka koštane mase ukoliko se ne nastavi s davanjem antiresorptivnih lijekova (49, 85).

1.4.2 Antiresorptivni lijekovi

Učinak antiresorptivnih lijekova ograničen je na zaustavljanje ili usporavanje resorpcije kosti. Ne pridonose direktno izgradnji kosti i time ne ispravljaju već narušenu ravnotežu koštanog metabolizma već samo usporavaju napredovanje osteoporoze. Prema načinu djelovanja, postoje četiri grupe antiresorptivnih lijekova: selektivni modulatori estrogenskih receptora (engl. *selective estrogen receptor modulator*, SERM), inhibitori RANKL-a, inhibitori sklerostina i bisfosfonati (49). Najstariji i najkorišteniji lijekovi za liječenje osteoporoze su bisfosfonati. Trenutno su u upotrebi 4 bisfosfonata: alendronat, ibandronat, risedronat i zoledronična kiselina. Način primjene tih lijekova se razlikuje (peroralna primjena, supkutane injekcije, intravenska primjena) (85). Bisfosfonati su podrobnije opisani u potpoglavlju 1.5.

SERM su spojevi koji ovisno o tkivu na koje djeluju funkcioniraju kao agonisti ili antagonisti estrogena, a u koštanom tkivu smanjuju aktivnost osteoklasta (88). Za liječenje osteoporoze koriste se raloksifen i bazedoksifen na dnevnoj bazi u obliku tableta (49). Osim što smanjuje resorpciju kosti, raloksifen umanjuje pojavnost raka dojke u žena, ali povećava rizik za nastanak duboke venske tromboze. Lako se apsorbira u organizam, ali radi svoje slabe topivosti u vodi ima nisku biodostupnost (85, 89). Bazedoksifen se koristi i konjugiran s estrogenom, ali tom slučaju liječenje ima slične nuspojave kao i terapija samim estrogenom. Prilikom ukidanja terapije SERM-om može doći do naglog gubitka koštane mase (49, 85).

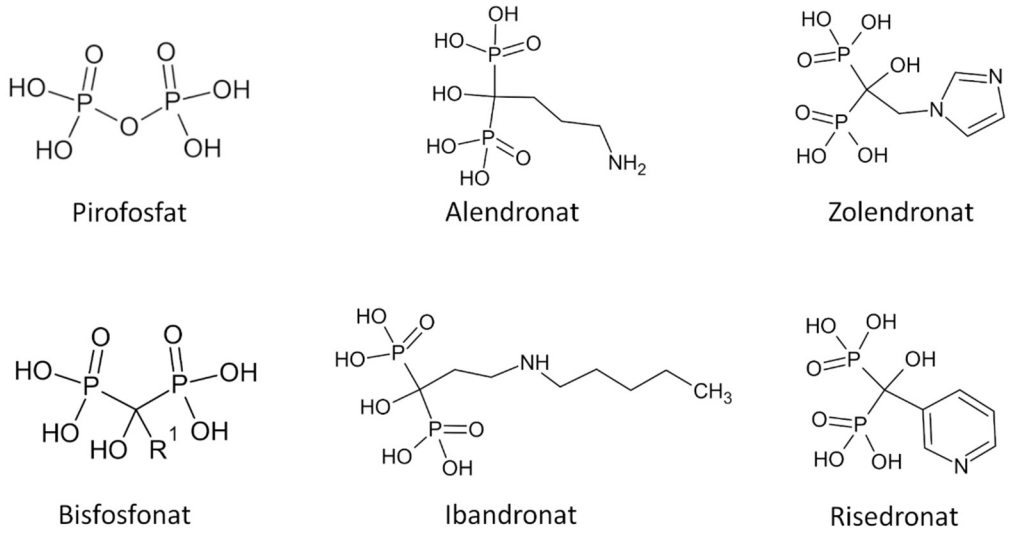
Jedini inhibitor RANKL-a koji se trenutno koristi u terapiji osteoporoze je ljudsko monoklonalno protutijelo pod nazivom denosumab. Osim smanjene resorpcije kosti kroz inhibiciju osteoklasta, istraživanja su pokazala i povećanje BMD-a, ali prilikom ukidanja terapije dolazi do pojačane pregradnje kosti koja rezultira gubitkom BMD-a i povećanjem rizika nastanka prijeloma (49). Denosumab je jedan od najpotentnijih antiresorptivnih lijekova, a primjenjuje se supkutanom injekcijom svakih 6 mjeseci, no u rijetkim slučajevima može dovesti do osteonekroze čeljusti (85).

Najnovija mogućnost u liječenju osteoporoze je romosozumab, monoklonalno protutijelo na sklerostin (protein koji proizvode osteociti i koji inhibira aktivnost osteoblasta). Inhibicija sklerostina dovodi do smanjenja sinteze RANKL-a i smanjenja aktivnosti osteoklasta, a također ima i kratkoročno anaboličko djelovanje (49). Romosozumab se daje supkutanom injekcijom na mjesečnoj bazi kroz godinu dana jer nakon toga gubi anabolički učinak (85). Nuspojave su još fokus istraživanja, ali zasada je pokazano da može doći do hipokalcijemije (uslijed povećane

izgradnje kosti) i u rijetkim slučajevima kadriovaskularnih ili cerebrovaskularnih poteškoća (90).

1.5 Bisfosfonati

Od svih bisfosfonata nove generacije koji se danas koriste kao terapija osteoporoze, najstariji (u upotrebi od 1995. godine u SAD-u) i najkorišteniji je alendronat (91). Punog kemijskog imena 4-amino-1-hidroksibutiliden bisfosfonat, alendronat sadrži alifatski postrani lanac (R^1) koji završava amino skupinom (92). Ibandronat, risedronat i zoledronična kiselina (zoledronat) umjesto ravnog alifatskog lanca imaju ciklične i razgranate postranične lance (Slika 1.3) što pridonosi njihovoj aktivnosti (93).



Slika 1.3 Kemijska struktura pirofosfata i bisfosfonata. Slika prikazuje kemijsku strukturu pirofosfata, opću strukturu bisfosfonata s varijabilnim postranim lancem (R^1) i četiri bisfosfonata koji se koriste u terapiji osteoporoze: alendronat, zolendronat, ibandronat i risedronat. Sliku izradio autor.

1.5.1 Obilježja i djelovanje bisfosfonata

Bisfosfonati su kemijske tvari koje su analogne pirofosfatu. Pirofosfat u organizmu nastaje hidrolizom ATP-a u AMP te se dalje hidrolizira u anorganski fosfat za sintezu ATP-a. U usporedbi s pirofosfatom, bisfosfonati umjesto centralnog atoma kisika između dva fosfata sadrže atom ugljika, što ih čini metabolički stabilnijima i otpornima na hidrolizu (94). Ostatak strukture bisfosfonata (Slika 1.3) čini hidroksilna skupina (-OH) koja omogućuje ugradnju bisfosfonata u kost te postranični lanac koji varira između pojedinih bisfosfonata i može sadržavati dušik (95). Ugradnjom bisfosfonata u međustaničnu tvar kosti stvara se matriks koji

toksično djeluje na osteoklaste. Terapija bisfosfonatima može smanjiti stopu resorpcije za do 70 %, a nakon prestanka davanja terapije akumulirani bisfosfonati u matriksu još uvijek usporavaju resorpciju (86). Starija generacija bisfosfonata koja na postraničnom lancu ne sadrži dušik (etidronat i kolodronat) nakon apsorpcije u osteoklast se ugrađuje u ATP i stvara toksične metabolite ATP-a koji dovode do apoptoze osteoklasta. Nove generacije bisfosfonata sadrže dušik u postraničnom lancu i djeluju tako da inhibiraju enzim farnezil pirofosfat sintazu koja je dio mevalonatnog puta u osteoklastima (94). Farnezil pirofosfat sintaza pokreće kaskadu signala koji reguliraju razne morfološke aspekte funkcije osteoklasta, npr. citoskelet, nabiranje membrane i oblikovanje aktinskih prstenova (95).

1.5.2 Alendronat

Alendronat se vrlo često koristi kao prva crta prevencije i terapije osteoporoze u obliku tjednih ili dnevnih peroralnih doza, često uz dodatak vitamina D3. Uzimanje alendronata ne preporuča se osobama s bubrežnom insuficijencijom zbog negativnog utjecaja bisfosfonata na funkciju bubrega (84, 85, 96). Istraživanja su pokazala da terapija alendronatom u pacijenata s prethodnim prijelomima kralježnice u naredne tri godine smanjuje vjerojatnost nastajanja sekundarnog prijeloma kralježnice ili prijeloma kuka za 50 %. Kod pacijenata bez prethodnih prijeloma kralježnice smanjuje vjerojatnost prijeloma za 48 % (85). Analiza dostupne literature iz 2021. godine pokazuje da alendronat kroz 3 godine smanjuje vjerojatnost ostalih prijeloma za 16 % i primarnog prijeloma kuka za 39 % (97). Terapija alendronatom najčešće traje 3 do 5 godina nakon čega slijedi pauza od 5 godina. Tijekom prvih 3 do 5 godina, alendronat uspješno štiti od prijeloma, nakon čega dolazi do pada učinkovitosti i većih vjerojatnosti nuspojava kao što su netipični prijelomi bedrene kosti ili osteonekroza čeljusti (98). Osim za terapiju osteoporoze, alendronat se uspješno primjenjuje za liječenje Pagetove bolesti kostiju, metastatske bolesti kostiju i multiplog mijeloma (93). Smatra se da alendronat ima potencijal u prevenciji Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti i Huntingtonove bolesti zbog sposobnosti prolaska kroz krvno-moždanu barijeru i utjecaja na kolesterol i kalcijeve ione (99). Također postoje naznake da smanjuje proliferaciju i migraciju stanica tumora dojke i *in vitro* djeluje citotoksično na stanice osteosarkoma (100, 101).

Terapija alendronatom i drugim bisfosfonatima ima i negativne strane. Povezana je s nastankom osteonekroze čeljusti. Alveolarna kost ima stopu pregradnje deset puta veću od, primjerice, goljenične kosti te se bisfosfonati u njoj nakupljaju puno više nego u ostalim kostima. Tijekom života alveolarna kost se konstantno pregrađuje zbog promjena u gornjoj i

donjoj čeljusti (prirodno pomicanje zuba uslijed pritiska, traume ili vađenja zuba). Ukoliko se u alveolarnoj kosti nalazi velika količina bisfosfonata, njezina pregradnja prestaje, dolazi do hipermineralizacije lamine dure alveolarne kosti i odumiranja dijelova kosti što dovodi do razvoja osteonekroze (102). Još jedan od rizika terapije bisfosfonatima je i atipični prijelom bedrene kosti. Iako su takvi prijelomi češći u osoba koje primaju velike doze bisfosfonata kao onkološku terapiju, ta pojava zabilježena je i u terapiji osteoporoze ukoliko se primjenjuju duže od preporučenih 3 do 5 godina (98). Od ostalih štetnih učinaka postoje naznake da alendronat i bisfosfonati mogu izazvati fibrilaciju atrija, hipokalcijemiju, akutni upalni odgovor i jaku bol u mišićima, smanjenje bubrežne funkcije i iritaciju jednjaka i želudca (103–105). Oštećenja bubrega mogu biti posljedica nakupljanja kompleksa bisfosfata u tkivu bubrega, ali i oksidativnog stresa. Pokusi na štakorima pokazali su da primjena alendronata dovodi do aktivacije imunosnih stanica (makrofaga, neutrofila i drugih), što dovodi do upale, a time i do povećanog oksidativnog stresa (106). Nije do kraja poznato koji mehanizmi su odgovorni za nastanak iritacija u gornjem dijelu probavne cijevi, no istraživanja pokazuju da uzrok može biti kemijska iritacija alendronatom zbog dušika koji sadrži, a to se donekle može spriječiti načinom uzimanja lijeka (107, 108). Dio zabilježenih slučajeva nuspojava u gornjem dijelu probavne cijevi u starijih žena može se objasniti već prisutnim bolestima poput dispepsije i ezofagitisa, a ne samim djelovanjem alendronata (109).

1.6 Fitoestrogeni

Fitoestrogeni su kemijski spojevi biljnog podrijetla koji, zbog svoje strukturne sličnosti estradiolu, imaju estrogeni učinak u organizmu. Glavne skupine fitoestrogena koje se spominju u literaturi su izoflavoni, kumestani, lignani, stilbeni i prenilflavonoidi (110–112). Zbog svoje prisutnosti u hrani koju unosimo i šarolikog utjecaja na organizam, fitoestrogeni su predmet intenzivnog istraživanja. Glavni izvori fitoestrogena su voće, povrće i orašasti plodovi, na primjer soja, češnjak, celer, mrkva, krumpir, jabuke, nar i mnogi drugi (112).

Izoflavoni su skupina fitoestrogena koja je najviše istraživana. Glavni izvori su soja, crvena djetelina (*Trifolium pratense*) i druge mahunarke, a zbog svoje visoke biodostupnosti i visokog dnevnog unosa (pogotovo u Aziji) imaju i najveći utjecaj na ljude (111). Grupa izoflavona sastoji se od genisteina, daidzeina, gliciteina, biokanina A i formononetina. Njihov utjecaj u organizmu je dosada zabilježen kao kemoprotektivan i terapijski u raku dojke i prostate, kardiovaskularnim bolestima, osteoporozi i simptomima menopauze (113–115). Podatci o negativnom utjecaju izoflavona su dvosmisleni, ali postoje naznake da mogu negativno utjecati

na rad štitne žlijezde, reproduktivni sustav i imati kancerogeno djelovanje (114). Kumestani se nalaze u prirodi u manjim koncentracijama nego izoflavoni, no također pokazuju fitoestrogena svojstva te imaju protutumorsko, protuupalno, kardio i neuroprotektivno djelovanje (116). Najviše istraživanja porodice kumestana rađeno je na kumestrolu, čiji su glavni izvori djetelina lucerna (*Medicago sativa*) i soja (116–119). Lignani su porodica spojeva zastupljenih u sjemenkama lana, suncokreta, čaju i žitaricama. Uz njihovu fitoestrogenu aktivnost, prilikom metabolizma od strane crijevne mikroflore ili enzima jetre, pregrađuju se u enterolaktone i enterodiole koji mogu imati protutumorsko, antioksidativno i protuupalno djelovanje (120). Najviše istraživani stilben je rezveratrol koji se nalazi u grožđu i vinu, a dosadašnja istraživanja pokazala su da ima antioksidativna, protuupalna, kardioprotektivna, neuroprotektivna i fitoestrogena svojstva (121). Također, neki od lijekova iz skupine SERM-ova koji se koriste u terapiji osteoporoze i određenih tipova raka dojke imaju motiv stilbena u svojoj strukturi (raloksifen, tamoksifen i toremifen) (122).

Prenilflavonoidi se sastoje od flavonoidne jezgre i preniliranih postranih lanaca koji ih čine izrazito lipofilinima. Flavonoidne jezgre mogu biti izoflavon, flavan, flavon, dihidroflavon ili halkon. Alkilni prenilni lanci koji se vežu na navedene jezgre mogu biti prenil, geranil i farnezil skupine. Istraživanja su pokazala da prenilflavonoidi djeluju citotoksično na tumorske stanice, da imaju protuupalni, antimikrobni, antiparazitni, antioksidativni i estrogeni učinak te da djeluju neuroprotektivno u oboljelih od Alzheimerove bolesti. Imaju i potencijal u terapiji dijabetesa kroz inhibiciju enzima α-glukozidaze ili pojačavanje inzulinskog odgovora aktivacijom receptora PPAR-γ (123). Izvori prenilflavonoida u hrani su hmelj, dud, dudovac (*Broussonetia papyrifera*), smokve, soja i sladić (*Glycyrrhiza glabra*) (124).

1.6.1 Hmelj

Hmelj (*Humulus lupulus*) je biljka koja se prvenstveno koristi u proizvodnji piva. Ženski cvat hmelja sadrži polifenole, fenolne kiseline, halkone, prenilflavonoide, i proantocijanidine koji pivu daju gorčinu, okus te djeluju antibakterijski i antimikotski (125). Kroz povijest, hmelj se koristio i u tradicionalnoj medicini kao blagi sedativ, za simptome nesanice, poboljšanje apetita i probave, zubobolju, bolove u uhu i neuralgije (126). Suvremena istraživanja pokazuju da hmelj olakšava simptome postmenopauze, ima sedativna svojstva koja pomažu pri nesanici i utječe na osteoporozu (127–132). Većina danas proizvedenog hmelja koristi se za izradu ekstrakta hmelja za industriju proizvodnje piva. Najčešće korišteni način izolacije je superkritičnim ugljikovim dioksidom prilikom čega većina bioktivnih tvari (prenilflavonoida)

zaostaje u otpadnom biljnom materijalu koji se može koristiti kao izvor za proizvodnju dodataka prehrani (133–135). Glavni prenilflavonoidi hmelja su ksantohumol (KH), izoksantohumol (IKH), 8-prenilnaringenin (8PN) i 6-prenilnaringenin (6PN) (135).

1.6.2 Ksantohumol i izoksantohumol

KH, po kemijskoj strukturi prenilhalkon (Slika 1.4.; halkonska jezgra i prenil skupina na osmom ugljikovom atomu), najzastupljeniji je prenilflavonoid hmelja, ali nema fitoestrogeni utjecaj. Istraživanja su pokazala da utječe na različite vrste karcinoma kao što su karcinom pluća nemalih stanica, leukemije, karcinomi probavnog sustava (hepatocelularni karcinom, kolangiokarcinom, karcinom gušterače i karcinom debelog crijeva), karcinome spolnog i mokraćnog sustava (dojke, prostate, cerviksa i jajnika), glioblastoma, karcinome štitnjače i melanom kroz apoptozu, inhibiciju angiogeneze i epigenetsku regulaciju (124). Osim toga, ima antioksidativna svojstva, uključen je u prevenciju metaboličkog sindroma, ima protuupalni učinak, djeluje na dijabetes i inhibira enzim aromatazu (enzim potreban za sintezu estrogena iz androgena) (136). IKH je sastavljen od dihidroflavonske jezgre i prenil skupine na osmom ugljikovom atomu (Slika 1.4). Zastupljen je u malim količinama prilikom proizvodnje piva i u ekstraktima hmelja, a u vrenju se većina KH pregradi u IKH (137). Iako ne postoji puno istraživanja biokativnosti IKH, pokazano je da smanjuje inzulinsku rezistenciju na modelu miša, kontrolom mikrobioma smanjuje pretilost, ima protutumorsko djelovanje (karcinom dojke, jajnika, prostate, debelog crijeva i melanom) i potencijalno fitoestrogeno djelovanje (138–140). Oba prenilfalvonoida (KH i IKH) su prekursori za nastanak 8-prenilnaringenina i 6-prenilnaringenina djelovanjem enzima jetre i mikrobioma crijeva (141–143).

1.6.3 8-prenilnaringenin

8PN je najaktivniji fitoestrogen hmelja i jedan od najpotentnijih dosada poznatih fitoestrogena (144–146). Po strukturi je sličan IKH i spada u prenildihidroflavone (Slika 1.4) (123). Glavni izvor 8PN u ljudskoj prehrani je pivo. Prilikom procesa proizvodnje piva, KH ciklizira u IKH ili dezmetilksantohumol iz kojeg izomerizacijom nastaje 8PN, no koncentracije 8PN u pivu su poprilično niske (do najviše 240 μg/L) (147). Prema Stevensu i Pageu, takve koncentracije i dnevni unos 8PN nemaju značajan utjecaj na organizam, stoga je fokus istraživanja na korištenje dodataka prehrani dobivenih iz nusprodukta hmelja u pivarskoj industriji, specijaliziranih ekstrakta hmelja ili čistog 8PN (73, 129, 147–149). Farmakokinetički, 8PN ima veći afinitet za ERα nego za Erβ, što ga čini SERM-om, nadalje,

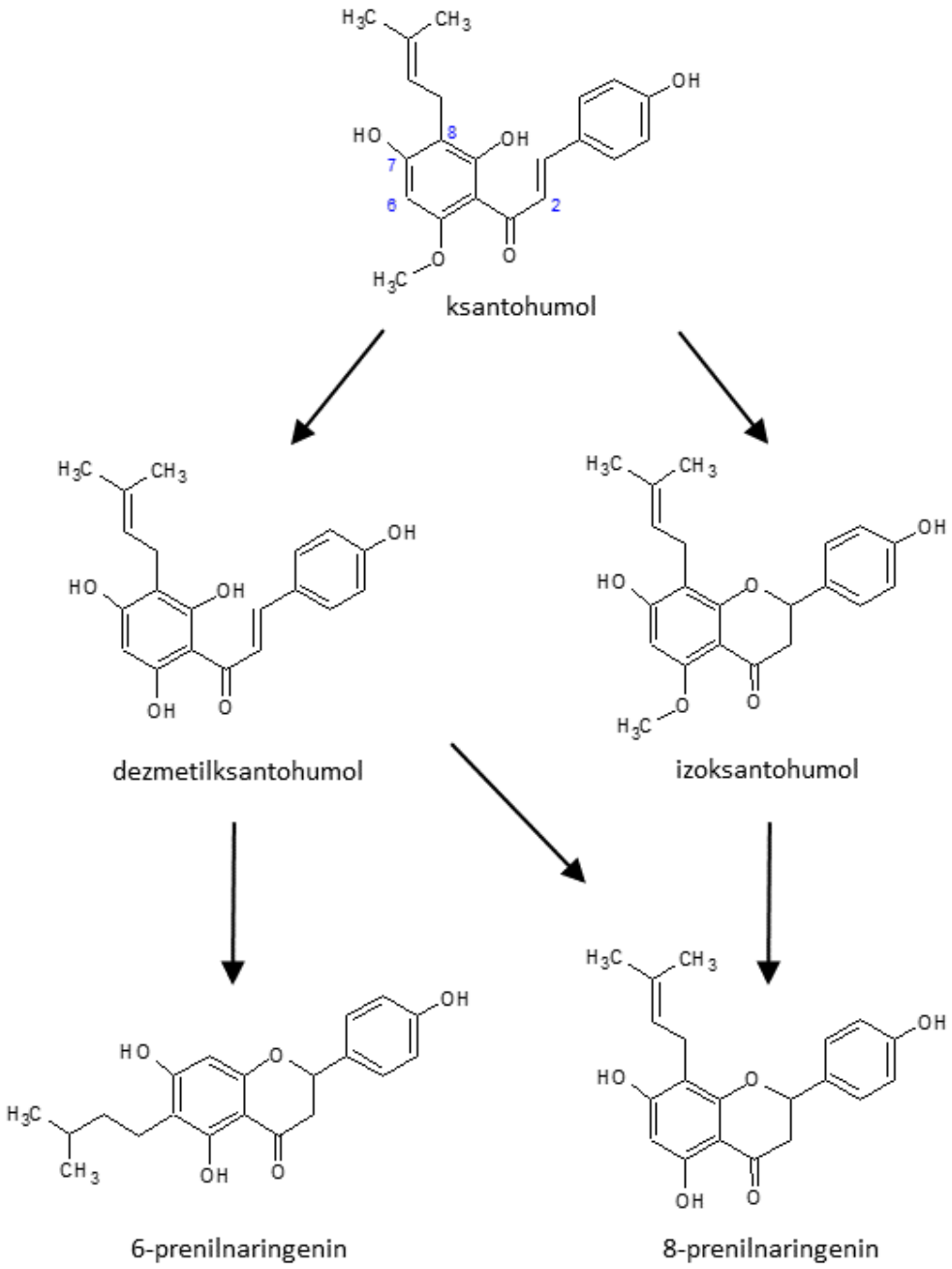
in vitro pokazuje aktivnost jednaku estrogenima (kao endogeni estrogen estron), a *in vivo* učinak na reproduktivne organe je 20 000 puta manji od estradiola (150).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da 8PN ima utjecaj na dijabetes (151–153), karcinome dojke, debelog crijeva i melanom (154–158) te antimikrobna i antivirusna svojstva (159, 160). Iako postoji podosta dokaza da 8PN ima pozitivan utjecaj na organizam, rezultati istraživanja se u određenoj mjeri proturječni. Ovisno o načinu primjene, dozi, vrsti istraživanja (*in vitro* ili *in vivo*) i organizmu na koji se primjenjuju (čovjek, štakor ili miš) rezultati dosta variraju. Primjer toga je njegovo fitoestrogeno djelovanje – dio *in vitro* ispitivanja pokazuje nisku fitoestorogenu aktivnost, različite podatke o vezanju na ERα i ERβ i sposobnost vezanja na GPER1. Za *in vivo* ispitivanja postoje rezultati koji pokazuju sposobnost 8PN da potakne proliferaciju tkiva uterusa, ali zabilježeni su i oprečni rezultati (145). Istraživanja učinka na koštani metabolizam zasada pokazuju jasan osteoprotektivni utjecaj 8PN, minimalan ili nikakav utjecaj na druga tkiva ovisna o estrogenu te utjecaj na strukturu skeletnog mišićnog tkiva (148, 149, 161, 162). Zabilježeni su i neki mogući štetni učinci primjene 8PN, npr. inhibicija sinteze androgena u Leyidigovim stanicama, proliferacija stanica karcinoma *in vitro*, utjecaj na endokrini sustav (hormone štitnjače, hormon rasta, IGF-1) i inhibicija funkcije aromataze, što je razlog za oprez prilikom istraživanja potencijalnog korištenja 8PN u terapijske svrhe (145).

1.6.4 6-prenilnaringenin

Struktura 6PN se od 8PN razlikuje samo po poziciji prenil skupine (Slika 1.4). Pomak prenil skupine s osmog ugljikovog atoma na šesti smanjuje fitoestrogeni učinak 6PN na manje od 1 % učinka koji ima 8PN (163). Osim toga, i biodostupnost i apsorpcija 6PN niže su nego u 8PN (128). Većina istraživanja rađena su na tvarima koje sadrže 6PN u kombinaciji s ostalim prenilflavonoidima hmelja, a istraživanja i podatci o djelovanju 6PN kao zasebnog spoja su rijetka. Dosada je pokazano da 6PN ima antimikrobno i antifungalno djelovanje, smanjuje proliferaciju stanica karcinoma prostate, izaziva apoptozu leukemijskih T-stanica i stanica melanoma *in vitro*, ima sedativni utjecaj vezanjem na GABA receptor, ima blago antiosteoporotsko djelovanje i smanjuje neuropatsku bol (128, 164–169). Osim toga, 6PN je jaki agonist za arilni ugljikovodični receptor koji ubikvitiniranjem ERα dovodi do razgradnje ERα i poticanja razgradnje estrogena što je pozitivna stvar u karcinomima ovisnima o estrogenu, ali može smanjiti željenu učinkovitost drugih fitoestrogena u tkivima koja nisu zahvaćena tumorom (128, 170). Zbog manjka pretkliničkih i kliničkih istraživanja učinka i

farmakokinetike čistog 6PN u organizmu, potreban je oprez prilikom korištenja pripravaka koji sadrže visoke doze 6PN.



Slika 1.4 Prenilflavonoidi hmelja i njihova pregradnja. Od ksantohumola termičkom ciklizacijom nastaje izoksantohumol, a djelovanjem enzima jetre i crijevnog mikrobioma dezmetilksantohumol. Izoksantohumol se u jetri i crijevima pregrađuje u 8-prenilnaringenin dok dezmetilksantohumol ciklizacijom prelazi u 8-prenilnaringenin ili u 6-prenilnaringenin. Sliku izradio autor.

1.7 Oksidativni stres i kost

Proizvodnjom energije unutar mitohondrija nastaju slobodni kisikovi radikali (engl. *reactive oxygen species*, ROS). ROS su molekule i radikali (superoksidni anion, vodikov peroksid, hidroksilni radikal) koji nastaju „curenjem" elektrona koji su dio transportnog lanca tijekom staničnog disanja kroz membrane mitohondrija u staničnu citoplazmu. U malim koncentracijama služe kao signalne molekule koje, među ostalim, kontroliraju staničnu diferencijaciju i proliferaciju, a pomažu i u zarastanju kosti (171). S druge strane, pri velikim koncentracijama dovode do oštećenja molekula važnih za funkciju stanice (proteina, RNA i DNA), što u koštanom tkivu može dovesti do inhibicije diferencijacije koštanih stanica (172). Tijekom kronične sustavne ili lokalne upale dolazi i do povećane produkcije ROS-a i oksidativnog stresa. Kronično izlaganje ROS-u može dovesti do bolesti (osteoporoza, reumatoidni artritis, osteosarkom), uništavanja kosti i apoptoze koštanih stanica (ubrzanim starenjem osteocita i koštanog matriksa), ali i do pretjerane diferencijacije i nakupljanja osteoklasta u slučaju lokalne kronične upale (173, 174).

Nadalje, nedostatak estrogena predstavlja primarni čimbenik koji određuje gubitak kosti nakon menopauze i povezan je s negativnim pokazateljima kvalitete kostiju uključujući apoptotičku smrt osteocita *in vivo*. Nedostatkom estrogena dolazi do pojačane stimulacije T-limfocita i otpuštanja upalnih citokina (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17) koji potiču aktivnost osteoklasta, dok IL-7 potiče apoptozu osteoblasta, a antioksidativna aktivnost estrogena održava homeostazu kosti kontrolom oksidativnih radikala uključenih u diferencijaciju i aktivnost osteoblasta i osteoklasta (174–176). U osteoblastima vodikov peroksid negativno djeluje na rast stanica, aktivnost alkalne fosfataze, kalcifikaciju, mineralizaciju i ekspresiju osteogenih biljega. U prisustvu vodikova peroksida dolazi do povećane resorpcije kosti osteoklastima, diferencijacije prekursora osteoklasta i nastajanja osteoklasta (175). Zhao i suradnici su meta-analizom dostupne literature potvrdili da postoji veza između povećanog sistemskog oksidativnog stresa i postmenopauzalne osteoporoze (177). Osim već navedenog, apsorpcija kalcija u crijevu ovisi i o razini glutationa te zbog smanjene razine glutationa (npr. kod oksidativnog stresa uzrokovanog lijekovima) dolazi i do smanjene apsorpcije kalcija u crijevu (178).

Temeljem navedenog, sustavna upala i oksidativni stres su važan čimbenik na koji bi se trebalo djelovati u prevenciji i liječenju osteoporoze (174, 175, 177). Primjena antioksidansa može spriječiti gubitak koštane mase, apoptozu osteoblasta i diferencijaciju osteoklasta *in vitro*,

a u ovarijektomiranih miševa pokazano je da antioksidansi obnavljaju kost i povećavaju broj osteoblasta (175, 179). Kao što je već spomenuto, prenilflavonoidi hmelja (prvenstveno KH i 8PN) imaju antioksidativnu aktivnost. KH povećava količinu glutationa koji je jedan od glavnih endogenih antioksidativnih peptida, ali u velikim koncentracijama KH dovodi do povećane produkcije ROS-a (128).

1.8 Životinjski modeli osteoporoze

Životinjski modeli su oduvijek bili važan dio temeljnih bioloških i medicinskih istraživanja. Ovisno o tipu osteoporoze koju se istražuje, potrebno je izabrati i prikladni model. Za istraživanja postmenopauzalne osteoporoze preporuča se korištenje ovarijektomijskog modela, za istraživanje sekundarne osteoporoze korištenje glukokortikoidnog modela i modela osteoporoze uzrokovane retinoičnom kiselinom, a za osteoporozu uzrokovanu imobilizacijom se preporuča model u kojem se životinje imobilizira vješanjem za rep ili imobilizacijom stražnjih udova (180–182). Najčešće korištene životinje kao modeli osteoporoze su laboratorijski štakori, ali mogu se koristiti zečevi, ovce, primati, psi i ribe zebrice (180, 183–185).

Model postmenopauzalne osteoporoze uzrokovan ovarijektomijom ženki štakora je detaljno opisan. Najčešće korišteni sojevi laboratorijskih štakora su Sprague-Dawley i Wistar, ali koriste se i smeđi norveški štakor, Fischer 344, Lewis i Wistar Kyoto štakori (186). Bilateralnom ovarijektomijom uklanja se primani izvor estradiola u životinje te one kroz vrijeme gube koštanu masu i dolazi do velikih promjena mikroarhitekture spužvaste kosti, što odgovara promjenama koje se događaju u postmenopauzalnoj osteoporozi u ljudi (186). Starost životinja ima veliku ulogu u utjecaju ovarijektomije na kost. Preporučena starost štakora za postavljanje modela osteoporoze je 6 mjeseci jer je u mlađih životinja aktivnost koštane pregradnje još uvijek velika (zbog rasta i sazrijevanja koštanog sustava), a u životinje starije od 6 mjeseci odgovor na promjene (smanjenje koštane mase nakon ovarijektomije ili primjena ispitivanih spojeva) je prespor (186, 187). Uspješno uspostavljanje modela nakon ovarijektomije je potvrđeno analizom BMD-a cijele životinje i kralježnice na sojevima Sprague-Dawley i Wistar (187). U usporedbi BMD-a cijele životinje, Wistar štakori imaju nagli pad vrijednosti BMD-a u prva tri mjeseca nakon ovarijektomije, dok je u Sprague-Dawley životinja početni pad sporiji, ali dugoročno su vrijednosti BMD-a niže nego u Wistar soja (187). Značajne promjene se događaju već unutar prvih 14 dana nakon ovarijektomije na proksimalnom dijelu tibije i unutar 30 dana u vratu femura (180).

Osim životinjskih modela osteoporoze, postoje i *in vitro* modeli. Za uspješan *in vitro* model potrebno je uspostaviti ko-kulturu stanica osteoblasta i osteoklasta što stvara izazove zbog razlika u medijima i čimbenicima potrebnima za uzgoj i diferencijaciju različitih stanica (188). Najnoviji potencijalni model *in vitro* je trodimenzionalna ko-kultura ljudskih osteoblasta, osteoklasta i osteocita (189). Takav model omogućuje istraživanja samih stanica, njihove interakcije i parakrinog lučenja, ali nije dovoljan za istraživanje koštane pregradnje i diferencijacije stanica te kompleksne kontrole metabolizma i homeostaze kosti. Stoga je životinjski model još uvijek nezamjenjiv u pretkliničkim istraživanjima osteoporoze.

1.9 Svrha i očekivani doprinos istraživanja

Pojavnost osteoporoze raste iz godine u godinu što dovodi do povećanja socio-ekonomskog pritiska na zdravstveni sustav. Terapija osteoporoze temelji se na usporavanju razgradnje kosti i medikamentoznom održavanju ravnoteže koštanog metabolizma. Premda je liječenje bisfosfonatima dosta uspješno i često su prvi izbor u terapiji osteoporoze, i dalje postoji potreba za razvojem novih metoda liječenja. Nedavna istraživanja usredotočena su na druge pristupe liječenju te bolesti, koji se za sada uglavnom koriste kao druga ili treća linija liječenja, ili su u ranim fazama istraživanja te za sada nema informacija o njihovoj dugoročnoj sigurnosti i djelotvornosti (190). Stoga je istraživanje patofizioloških mehanizama nastanka i razvoja osteoporoze te odgovarajućih metoda liječenja i ublažavanja simptoma vrlo aktivno područje. Fitoestrogeni ekstrakta hmelja (prvenstveno 8PN) su se zbog svog selektivnog i osteoprotektivnog djelovanja u zadnjih dvadesetak godina pokazali kao dobri kandidati za daljnje istraživanje u kontekstu terapije osteoporoze (149, 162). Do sada nisu detaljno istražene interakcije i potencijalni sinergistički utjecaj kombinacije ovog prirodnog fitoestrogena i konvencionalne terapije alendronatom. S obzirom da primjena alendronata sa sobom nosi rizik od nuspojava i da je vremenski ograničena zbog mehanizma djelovanja alendronata (vidjeti potpoglavlje 1.5), postavlja se pitanje bi li se korištenjem ekstrakta hmelja kao dopunskog liječenja moglo smanjiti potrebnu dozu alendronata i na taj način smanjiti brojnost i izraženost nuspojava te omogućiti prilagodbu vremenskog okvira njihove primjene. Također, zbog povoljnog i selektivnog djelovanja fitoestrogena iz hmelja (vidjeti potpoglavlje 1.6), moglo bi se očekivati manje nuspojava povezanih s klasičnom terapijom nadomještanjem estrogena. Osim fitoestrogena, ekstrakt hmelja sadrži i antioksidanse. Prema već iznesenim navodima, oksidativni stres uzrokovan nedostatkom estrogena je usko povezan s nastankom osteoporoze i njezinom progresijom (191). Zbog svega navedenog i činjenice da do sada nije ispitana primjena kombinacije alendronata i ekstrakta hmelja u liječenju osteoporoze, u ovom

istraživanju ispitan je utjecaj visoke i niske doze alendronata, ekstrakta hmelja i njihove kombinacije na kvalitetu i pregradnju kosti korištenjem ovarijektomijskog modela osteoporoze u štakora te na razinu oksidativnog stresa, morfološka obilježja organa osjetljivih na estrogen i oksidativni stres te dodatna obilježja eksperimentalnih životinja kao što su hematološke i biokemijske odrednice krvi.

2. **HIPOTEZA**

Fitoestrogeni iz ekstrakta hmelja imaju povoljan učinak na strukturna obilježja kosti te na pokazatelje koštanog metabolizma i oksidativnog stresa na modelu osteoporoze u ženki Wistar štakora i imaju sinergistički učinak s alendronatom.

3. **CILJ ISTRAŽIVANJA**

- Istražiti učinak ekstrakta hmelja, alendronata i njihovih kombinacija na strukturna obilježja i kvalitetu kosti pomoću mikro CT uređaja te izražaj biljega metabolizma kosti (CTX1 i P1NP) metodom Western blot na ženkama Wistar štakora
- Istražiti izražaj biljega oksidativnog stresa u serumu ženki Wistar štakora (NO, arginaza) i na tkivu bubrega i jetre (katalaza, lipidna peroksidacija, karbonilirani proteini) ovisno o primjeni ispitivanih tvari
- Izvršiti histomorfološku analizu tkiva maternice i perigonadalnog masnog tkiva te usporediti imunohistokemijski izražaj Ki67 u tkivu maternice ženki Wistar štakora
- Opisati hematološke i biokemijske odrednice (KKS, ukupni proteini, jetreni enzimi) ženki Wistar štakora

4. MATERIJALI I METODE

4.1 Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao kontrolirani pokus.

4.2 Materijali

Ekstrakt hmelja, komercijalnog imena XanthoFlav^{TM}, pribavljen je u obliku donacije tvrtke Hopsteiner (New York, SAD). Prema visokotlačnoj tekućinskoj kromatografiji provedenoj u laboratoriju tvrtke Hopsteiner, udio ciljanih tvari u ekstraktu je bio: KH 75 %, IKH 0,4 %, 8PN 0,3 % i 6PN 1,7 %. Alendronat je korišten u obliku tableta Alendox 70 (Belupo, Koprivnica, Hrvatska), a inhalacijski anestetik sevofluran kao Sevorane (Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, SAD). Za injekcijsku anesteziju korišteni su kombinacija ketamina u obliku Narketana® (Vetoquinol S.A., Lure Cedex, Francuska) u dozi od 75 mg/kg i ksilazina u obliku Xylapana® (Vetoquinol S.A., Lure Cedex, Francuska) u dozi od 10 mg/kg. Za postoperativnu analgeziju korišten je ketoprofen u obliku ampula koncentracije 50 mg/mL pod nazivom Ketonal® (Sandoz, Basel, Švicarska).

4.3 Životinje

4.3.1 Uzgoj i tretman

U istraživanju je korišteno 70 ženki štakora visokosrodnog soja Wistar iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Na početku istraživanja, životinje su bile starosti oko 6 mjeseci i težine 150 – 250 g. Podijeljene su u sedam skupina po deset životinja i smještene u kavezima dimenzija 20×32×20 cm. Uzgajane su u standardnim uvjetima: ciklus od 12 sati svjetla i 12 sati mraka, temperatura 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka. Životinje su hranjene komercijalnom hranom 4 RF 21 (Mucedola S.R.L., Italija) uz *ad libitum* pristup hrani i vodi. Istraživanje je provedeno u skladu s etičkim načelima važećim u Republici Hrvatskoj, prema Zakonu 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) (192). Uzgoj i žrtvovanje životinja provedeni su u prostorima Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu uz dozvolu Hrvatskog nacionalnog etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (EP 233/2020) i dozvolu Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u

Zagrebu (Klasa: 643-02/19-01/3, Ur.broj: 251-58-10617-19-704). Većina analiza i ostatak istraživanja provedeni su na Medicinskom fakultetu Osijek Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku uz dozvolu etičkog povjerenstva navedene ustanove (KLASA: 602-04/22-08/02 URBROJ: 2158-61-46-22-16).

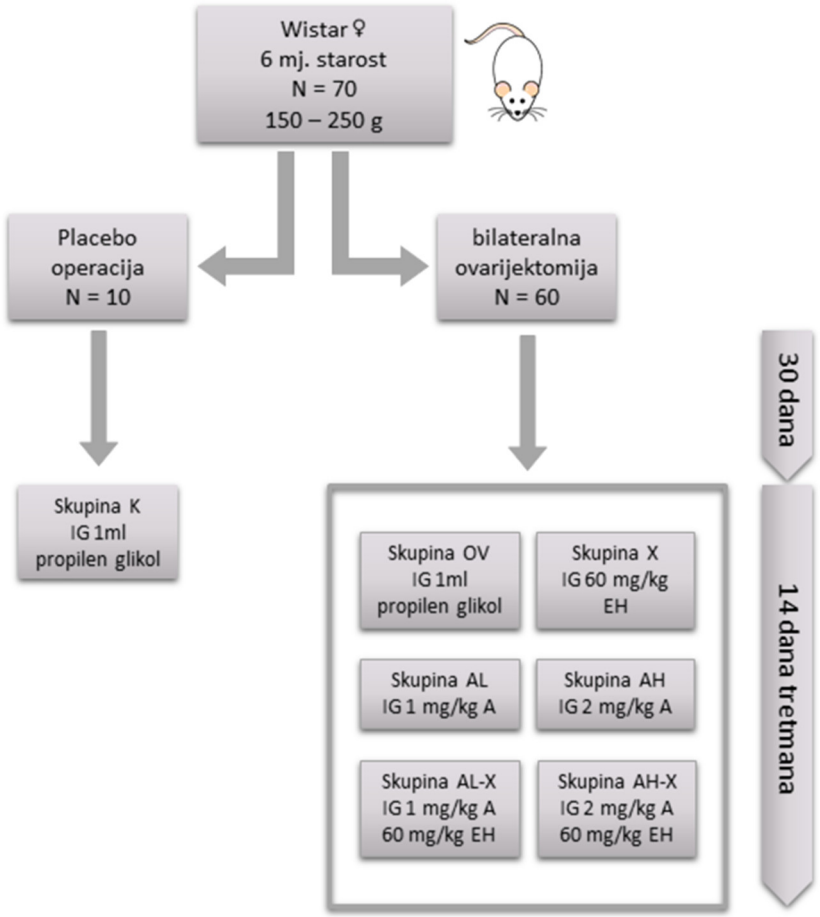
U 10 nasumično izabranih životinja izvedena je placebo (engl. *sham*) operacija (operacija bez odstranjivanja jajnika izvedena u svrhu izjednačavanja utjecaja stresa uzrokovanog operativnim zahvatom u svim skupinama) dok je na ostalih 60 životinja izvedena bilateralna ovarijektomija. Za vrijeme operacije, životinje su bile anestezirane intraperitonealnom injekcijom (IP) kombinacije ketamina (75 mg/kg) i ksilazina (10 mg/kg). Životinje su držane pod nadzorom nekoliko dana nakon operacije i po potrebi su dobivale analgeziju kroz injekcije ketoprofena u dozi 2-5 mg/kg jednom dnevno. Životinje su uzgajane narednih mjesec dana u standardnim uvjetima kako bi se uspostavio model osteoporoze. Nakon mjesec dana, ovarijektomirane životinje nasumično su podijeljene u 6 skupina po 10 životinja, a 10 životinja podvrgnutih placebo operaciji je činilo zdravu kontrolnu skupinu. Terapija je primjenjivana tijekom naredna 2 tjedna u kojima su životinje jednom dnevno intragastrički (IG) primale ispitivane tvari ili otapalo za ekstrakt hmelja (propilen glikol) i vodu. Zdrava kontrolna skupina (K) i ovarijektomirana netretirana skupina (OV) su primale IG 1 mL propilen glikola i vode jednom dnevno. Ovarijektomirana skupina koja je primala nisku dozu alendronata (AL) primala je 1 mg/kg alendronata jednom dnevno IG, a 2 mg/kg alendronata davano je IG ovarijektomiranoj skupini koja je primala visoku dozu alendronata (AH). Naredne dvije ovarijektomirane skupine primale su nisku (AL-X) ili visoku (AH-X) dozu alendronata u kombinaciji s ekstraktom hmelja u dozi od 60 mg/kg. Tim skupinama životinja tvari su davane naizmjenično (jedan dan alendronat, drugi dan ekstrakt hmelja). Zadnja ovarijektomirana skupina životinja primala je samo ekstrakt hmelja u obliku dnevne IG doze od 60 mg/kg. Prilikom svakog davanja dnevne doze, životinje su bile anestezirane upotrebom inhalacijskog anestetika sevofurana. Grafički prikaz korištenih skupina životinja i doze ispitivanih tvari kao i vremenska crta od postavljanja istraživanja do žrtvovanja životinja vidljivi su na slici 4.1.

4.3.2 Uzorkovanje

Nakon 2 tjedna terapije, životinje su anestezirane davanjem intraperitonealne injekcije kombinacije ketamina (75 mg/kg) i ksilazina (10 mg/kg). Životinjama je uzeta krv za hematološku analizu pune krvi i biokemijsku analizu seruma. Dio jetre, bubreg, bedrena kost, maternica i uzorak perigonadalnog masnog tkiva pohranjeni su u 4 %-nu neutralnu puferiranu

otopinu formaldehida (NBF, Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska). Ostatak jetre, uzorak perigonadalnog masnog tkiva, drugi bubreg i druga bedrena kost pohranjeni su -20 °C. Prije pohrane zabilježena je težina svih uzorkovanih organa.

Svi uzorci (osim bedrene kosti) koji su bili pohranjeni u 4 % NBF su nakon fiksacije uklopljeni u parafin standardnim histološkim postupkom te pohranjeni za daljnju analizu tkiva. Uzorci bedrene kosti su ostali pohranjeni u 4 % NBF do analize mikro računalnom tomografijom (CT).



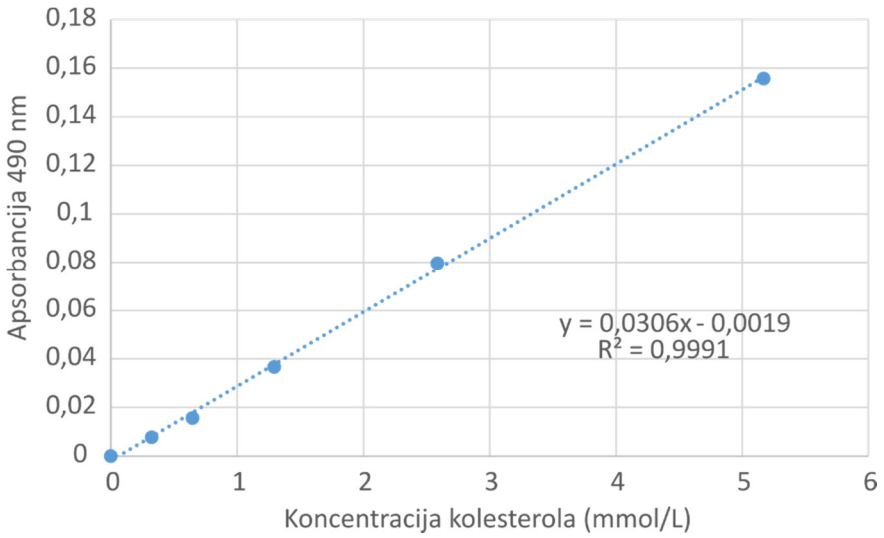
Slika 4.1 Grafički prikaz postavljanja pokusa i korištenih skupina životinja. Slika prikazuje podjelu životinja u skupinu podvrgnutu placebo operaciji (N = 10) i bilateralno ovarijektomirane životinje koje su nakon 30 dana raspodijeljene u 6 pokusnih skupina (N = 10). Životinje su nakon podjele u skupine tretirane 14 dana i potom žrtvovane. IG – intragastrički. K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su naizmjenično primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su naizmjenično primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja, A – alendronat, EH – ekstrakt hmelja. Sliku izradio autor.

4.4 Hematološka i biokemijska analiza krvi i seruma

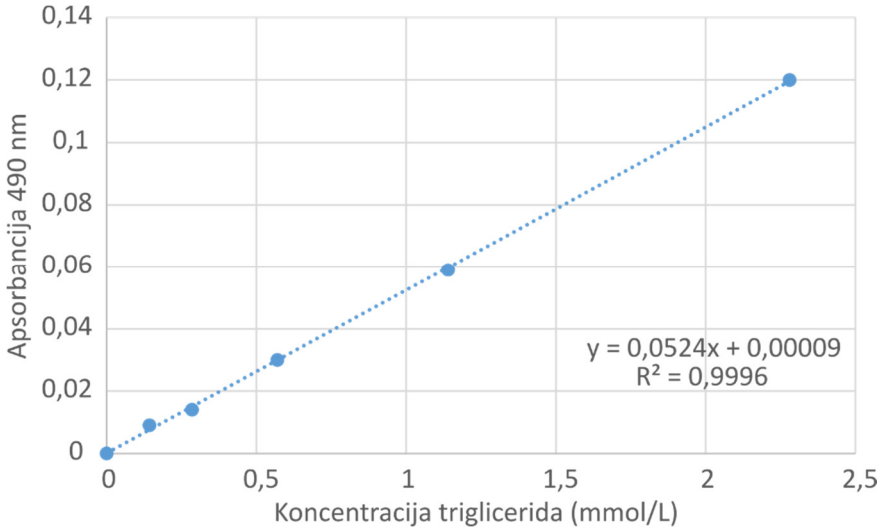
Prilikom uzorkovanja, dio krvi pohranjen je u heparizirane spremnike BD Vacutainer® (BD, New Jersey, SAD) na 4 °C i analiziran drugi dan. Analiza je provedena u Veterinarskoj stanici Osijek na uređaju ABX Micros ESV60 (Horiba Medical, Kyoto, Japan) korištenjem postavki za štakora i standardnog protokola prema proizvođaču. Izmjeren je broj eritrocita, leukocita i trombocita u jedinici volumena krvi, koncentracija hemoglobina u krvi, vrijednost hematokrita, prosječni volumen eritrocita (engl. *mean corpuscular volume*, MCV), prosječni hemoglobin u eritrocitu (engl. *mean corpuscular hemoglobin*, MCH) i prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*, MCHC).

Ostatak krvi pohranjen je u neheparizirane spremnike BD Vacutainer® (BD, New Jersey, SAD). Nakon koagulacije, serum je izdvojen centrifugiranjem 10 min silom od 3000 ×g na centrifugi Eppendorf 5702 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Dio seruma (100 µL) iskorišten je za analizu biokemijskih odrednica krvi, a ostatak je pohranjen na -20 °C. Analiza biokemijskih odrednica izvršena je na Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu korištenjem uređaja VetScan VS2 (Abaxis, Union City, Kalifornija, SAD) i prikladnih rotora s reagensima (VetScan® Comprehensive Diagnostic Profile) istog proizvođača. Rotor sadrži reagense za analizu jednog uzorka i mjerenje alanin aminotransferaze (ALT), ukupne alkalne fosfataze (ALP), amilaze (AMI), kalcija, fosfora, kalija, natrija, uree, albumina, globulina, kreatinina, ukupnih proteina, ukupnog bilirubina i glukoze u krvi. Analiza je izvršena prema uputama proizvođača.

Ukupni kolesterol i trigliceridi u serumu izmjereni su korištenjem kolorimetrijskog enzimatskog testa Cholesterol liquicolor i Trygliceride liquicolor mono (HUMAN, Wiesbaden, Njemačka). Prema priloženom standardu kolesterola (5,17 mmol/L) ili triglicerida (2,28 mmol/L) napravljena su serijska razrjeđenja i izrađene baždarne krivulje u pločicama s 96 jažica mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 490 nm na uređaju iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD) (Slika 4.2 i Slika 4.3). Volumen od 2 µL seruma ispipetiran je u pločice s 96 jažica za mjerenje količine kolesterola i pločice za mjerenje triglicerida na koje je dodano 200 µL prikladnog reagensa. Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi, apsorbancije uzoraka izmjerene su na istom uređaju. Prema dobivenim baždarnim krivuljama, izračunate su koncentracije kolesterola i triglicerida u serumu te su izražene u mmol/L.



Slika 4.2 Baždarna krivulja koncentracije kolesterola korištena za mjerenje koncentracije ukupnog kolesterola u serumu i jetri. Sliku izradio autor.



Slika 4.3 Baždarna krivulja koncentracije triglicerida korištena za mjerenje ukupnih triglicerida u serumu i jetri. Sliku izradio autor.

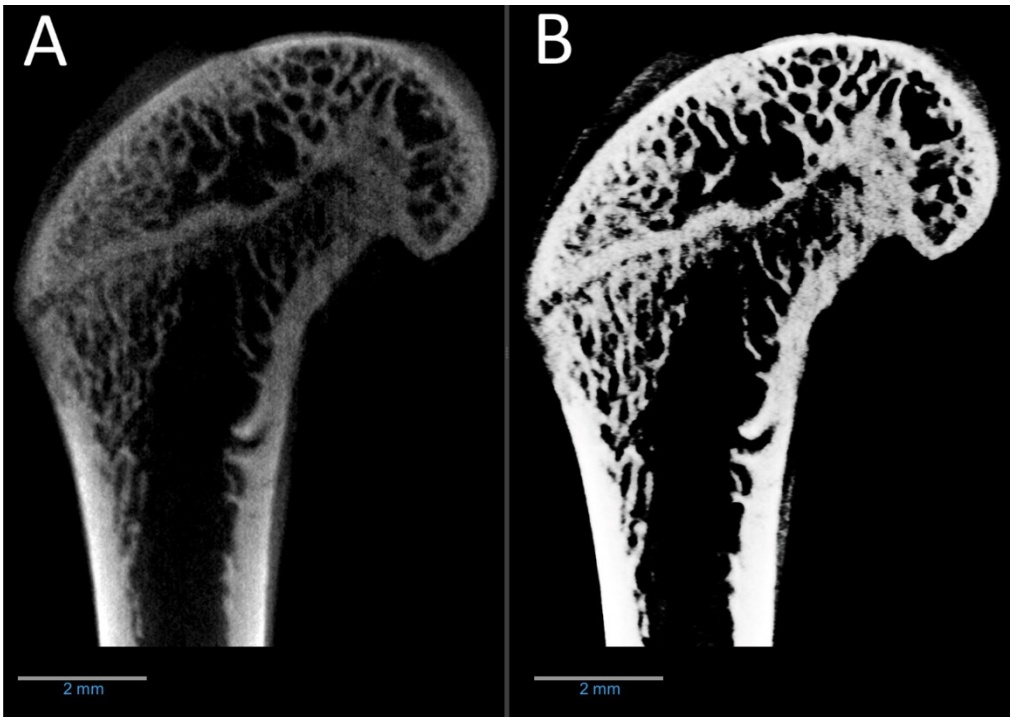
4.5 Analiza kvalitete kosti

4.5.1 Mikro računalna tomografija

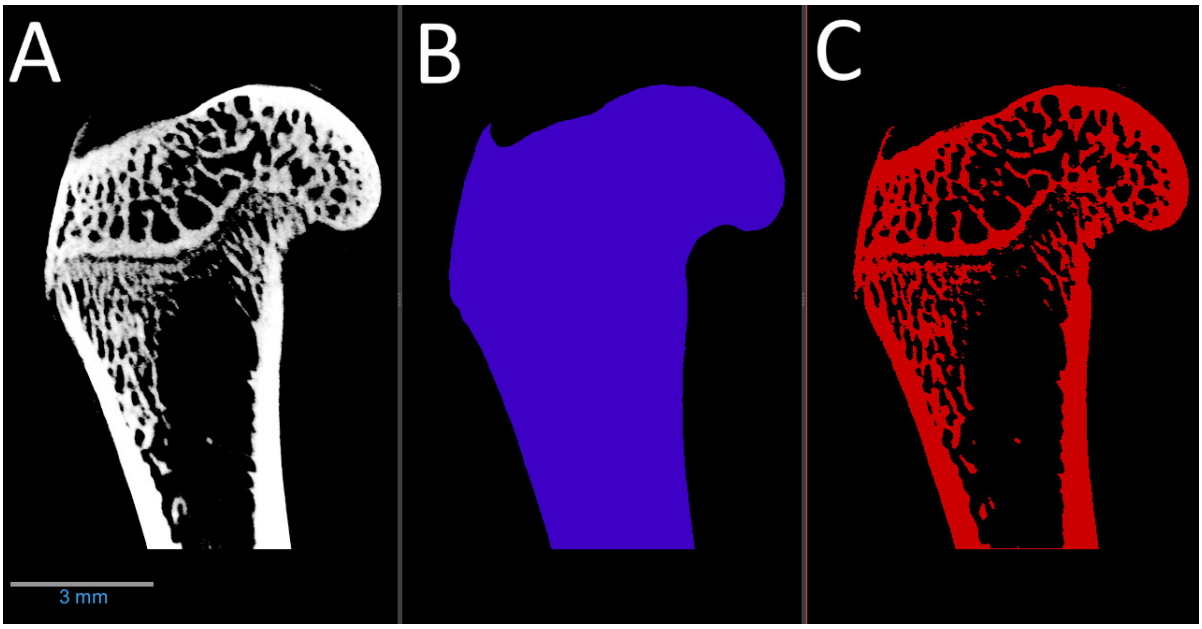
Bedrene kosti fiksirane u formalinu snimljene su korištenjem uređaja za mikrotomografiju rendgenskim zrakama visoke rezolucije Neoscan 80 (Neoscan, Mechelen, Belgija) na Odjelu za biologiju, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani. Korišten je napon izvora od 50 kV, jakost struje 200 µA, trajanje ekspozicije od 136 ms i veličina voksela od 10 µm. Na svakoj

kosti snimljen je segment dužine 1 cm distalne epifize. Snimke su potom obrađene u programu Neoscan (Neoscan, Mechelen, Belgija) i izvezene u obliku 2D projekcijskih slika.

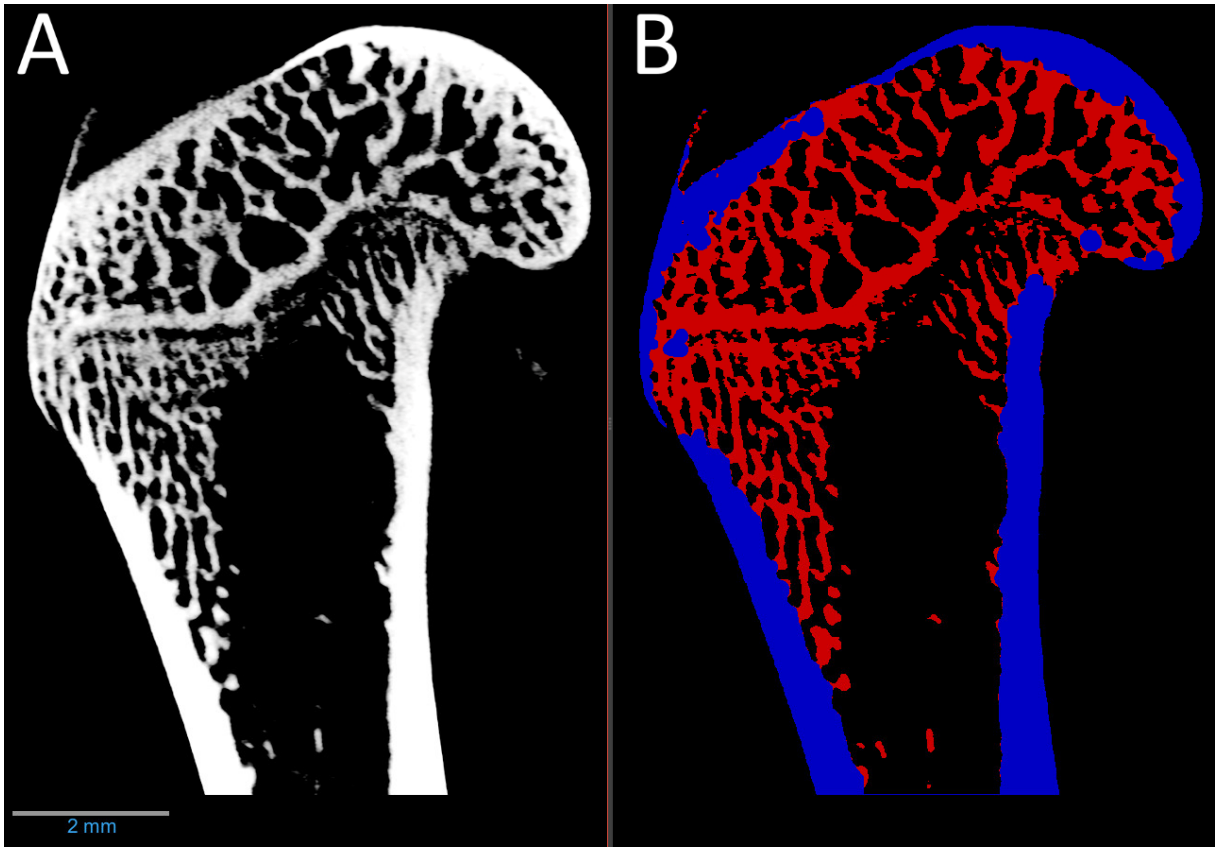
Dobivene 2D projekcijske slike su rekonstruirane u 3D modele kosti korištenjem programa Dragonfly (Object Research Systems, Montreal, Kanada). Modeli kosti su očišćeni od šuma nastalog prilikom snimanja pomoću modela dubokog učenja (engl. *deep learning*) temeljenog na U-net neuralnoj mreži unutar programa Dragonfly (Slika 4.3) (193). Korištenjem dodatka za analizu kosti unutar programa Dragonfly, izdvojena su područja od interesa (engl. *region of interest*, ROI) kao ukupni volumen snimljenog dijela kosti te samo koštanog tkiva (Slika 4.4). Zatim je koštano tkivo razdvojeno na ROI-je koji predstavljaju kompaktnu i spužvastu kost prema Buie i sur. (Slika 4.4; Slika 4.6) (194) Na dobivenim ROI-ma izmjereni su morfometrijski pokazatelji kosti prema Bouxsein i sur. (Slika 4.7) (195): ukupni volumen koštanog tkiva (μm^3), ukupni volumen kosti (μm^3), udio koštanog tkiva u ukupnom volumenu kosti (%), prosječna debljina kompaktne kosti (μm), prosječna debljina koštane gredice (μm), prosječni razmak među koštanim gredicama (μm), prosječna površina kompaktne kosti (μm^2), prosječna površina koštane srži (μm^2), prosječna površina kosti kao zbroj površine kompaktne kosti i površine koštane srži (μm^2), udio kompaktne kosti u ukupnoj površini kosti (%), površina periosta (μm^2), površina endosta (μm^2), opseg periosta (μm) i opseg endosta (μm).



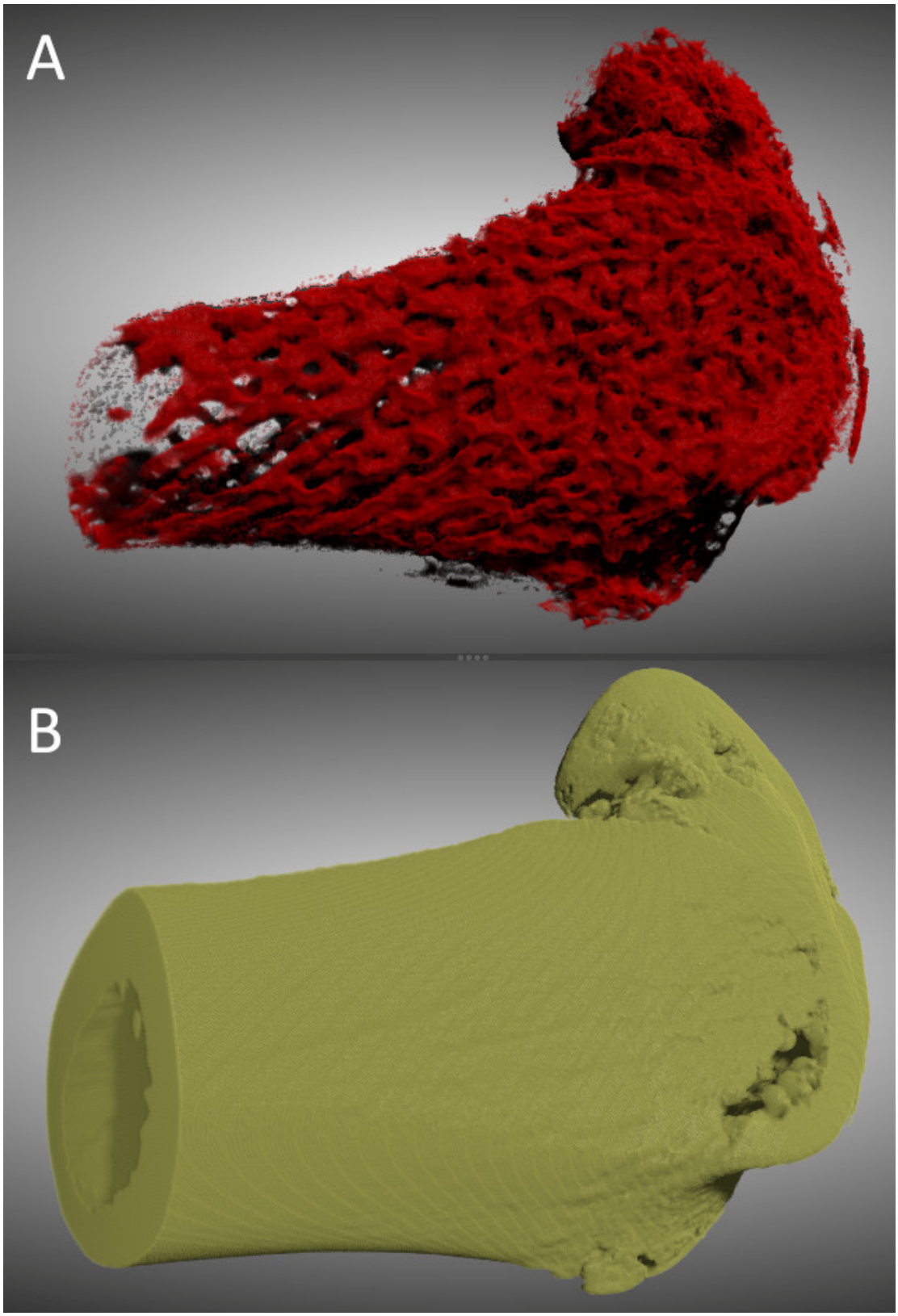
Slika 4.3 Prikaz presjeka kroz snimku kosti prije (A) i nakon uklanjanja šuma (B) pomoću modela dubokog učenja u programu Dragonfly. Mjerilo: 2 mm. Sliku izradio autor.



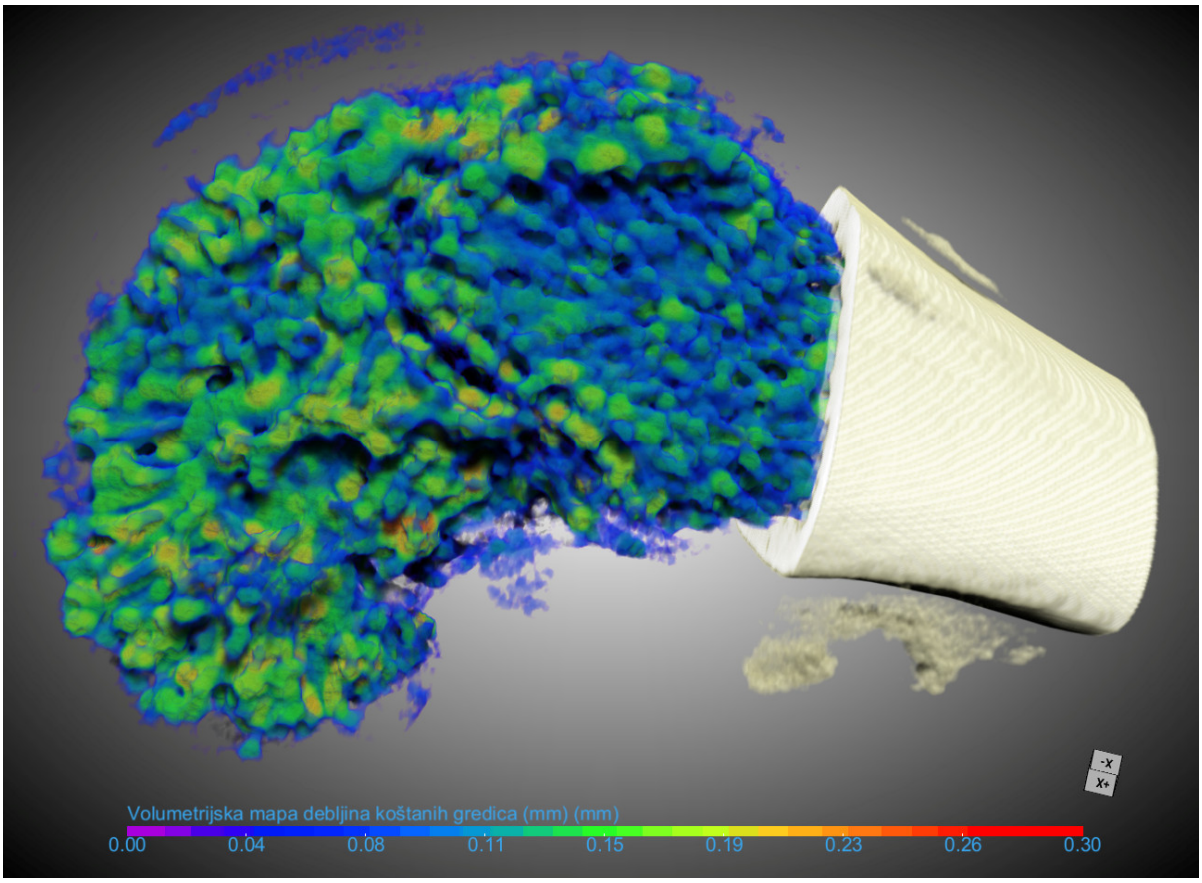
Slika 4.4 Dvodimenzionalni prikaz snimke kosti (A), označenog ukupnog volumena kosti (B) i volumena koštanog tkiva (C) u programu Dragonfly. Mjerilo: 3 mm. Sliku izradio autor.



Slika 4.5 Dvodimenzionalni prikaz snimljene kosti (A) i segmentirane kosti (B) u programu Dragonfly. Kompaktna kost prikazana je plavo, a spužvasta kost crveno. Mjerilo: 2 mm. Sliku izradio autor.



Slika 4.6 Trodimenzionalni prikaz kosti nakon segmentacije spužvaste (A) i kompaktne (B) kosti u programu Dragonfly. Sliku izradio autor.



Slika 4.7 Primjer volumentrijske mape debljina koštanih gredica koje su korištene za analizu odrednica kvalitete kosti u programu Dragonfly. Legenda boja prikazana je na dnu slike. Sliku izradio autor.

4.5.2 Western blot analiza biljega pregradnje kosti

Za procjenu stope pregradnje kosti korišteni su serumski biljezi P1NP (N-terminalni propeptid prokolagena tipa 1, engl. *Procollagen Type 1 N-terminal propeptide*) i CTX1 (karboksi terminalni križno povezani telopeptid kolagena tipa 1, engl. *Carboxy terminal crosslinked telopeptides of type 1 collagen*). P1NP je produkt koji nastaje posttranslacijskom doradom molekule kolagena tipa I, a CTX1 je produkt enzimske razgradnje kolagena tipa I katepsinom K. Oba produkta moguće je naći u serumu te se preporučaju kao dodatni klinički biljezi izgradnje i resorpcije kosti (196). Popis korištenih otopina nalazi se u tablici 4.1.

Tablica 4.1 Popis otopina korištenih za western blot analizu.

Otopina	Sastav i proizvođač
Fosfatni pufer (PBS)	137 mM NaCl*, 2,7 mM KCl†, 10 mM Na_2HPO_4†, 1,8 mM KH_2PO_4† u destiliranoj vodi (dH_2O)
Denaturacijski pufer (DP)	0,35 M Tris-HCl pH 6,8, 10 %-ni SDS, 30 %-ni glicerol‡, 9,3 %-ni ditiotreitol‡
30 %-ni akrilamid/bis-akrilamid (AA/Bis)	30 %-ni akrilamid‡, 2,7 %-ni bis-akrilamid‡
10 %-ni natrijev dodecil sulfat (SDS)	10 %-ni natrijev dodecil sulfat‡ u dH_2O
3M Tris-HCl	36,342 g Tris baze§, dopuniti do 100 mL dH_2O, pH 8,8
1M Tris-HCl	12,114 g Tris baze§, dopuniti do 100 mL dH_2O, pH 6,8
1,5 %-ni amonijev persulfat (APS)	1,5 %-ni amonijev persulfat‡ u dH_2O
Trikloroetanol (TCE)	2,2,2-trikloroetanol‖
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	N,N,N',N'-tetrametiletan-1,2-diamin§
Gel za sabijanje (5 %-ni AA/Bis)	6,4 mL dH_2O, 1,125 mL 1M Tris-HCl, 1,66 mL 30 %-ni AA/Bis, 0,1 mL 10 %-ni SDS, 0,75 mL 1,5 %-ni APS, 10 µL TEMED
Gel za razdvajanje (10 %-ni AA/Bis)	10,2 mL dH_2O, 2,5 mL 3M Tris-HCl, 6,66 mL 30 %-ni AA/Bis, 0,2 mL 10 %-ni SDS, 0,23 mL TCE, 0,46 mL 1,5 %-ni APS, 10 µL TEMED
Pufer za elektroforezu (EP)	25 mM Tris baza, 192 mM glicin§, 0,1%-ni SDS u dH_2O
Towbinov transfer pufer	25 mM Tris baza, 192 mM glicin, 20 %-ni metanol* u dH_2O
Pufer za blokiranje (BP)	3 %-ni goveđi serum albumin‡ u PBS-u
Tween 20	Polisorbat 20§

* Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
† VWR, Radnor, Pennsylvania, SAD
‡ Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
§Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD
‖ Acros Organics, Geel, Belgija

Prvi korak bio je razdvajanje proteina seruma na temelju njihove veličine korištenjem elektroforeze u poliakrilamidnom gelu uz natrijev dodecil sulfat za koju je bilo potrebno pripremiti uzorke jednake koncentracije proteina u puferu za elektroforezu. Količina proteina u serumu je prethodno izmjerena prilikom biokemijske analize seruma (vidjeti 4.4). Serumi su razrijeđeni u fosfatnom puferu (PBS) na volumen 250 µL nakon čega je dodano 50 µL denaturacijskog pufera (DP). Koncentracija proteina u završnom volumenu od 300 µL je bila 1 mg/mL. Tako pripravljeni uzorci su inkubirani 5 minuta na 100 °C kako bi se proteini denaturirali, nakon čega su ohlađeni u ledu i pohranjeni na 4 °C do elektroforeze.

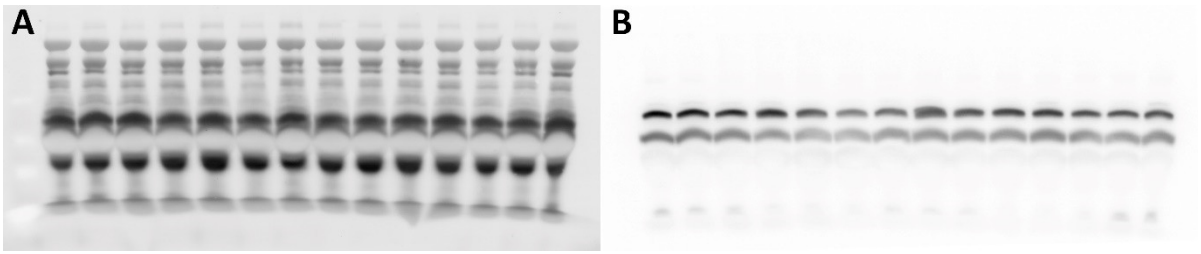
Elektroforeza je provedena na sustavu za elektroforezu Hoefer Mighty Small (Hoefer, Holliston, Massachusetts, SAD). Pripremljeni su diskontinuirani gelovi za elektroforezu

sastavljeni od gornjeg gela za sabijanje (5 % akrilamid) i gela za razdvajanje (10 % akrilamid) debljine 3 mm s dodatkom trikloroetanola za normalizaciju bez bojenja (engl. *stainfree normalization*). Na svaki gel naneseno je 5 µL obojenog proteinskog standarda za elektroforezu SeeBlue 2 Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) i 14 uzoraka u volumenu od 50 µL (50 µg proteina). Za svaki biljeg je korišteno 5 gelova s 15 jažica, a raspored uzoraka je bio takav da je na svakom gelu bilo po dva uzorka od svake skupine životinja kako bi kvantifikacija bila moguća. Elektroforeza je trajala 4 sata uz konstantnu snagu struje od 30 mA po gelu i početni napon ~70 V. Temperatura pufera za elektroforezu (EP) održavana je na 4 °C cirkulacijom hladne vode kroz sustav za elektroforezu.

Nakon završene elektroforeze, nosači gela su uklonjeni i rastavljeni, gornji gel za sabijanje je odrezan, a trikloroetanol u gelu za sabijanje je aktiviran UV svjetlom na uređaju ChemiDoc™ Imaging system (BioRad, Hercules, California, SAD) prema ugrađenom protokolu. U koraku aktivacije, trikloroetanol se veže na prisutne proteine i s njima prelazi na membranu. Prijenos proteina iz gela na poliviniliden diflorid (PVDF, veličina pora 0,45 µm) membranu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) napravljen je u Hoefer Mighty Small Transfer Tank sustavu (Hoefer, Holliston, Massachusetts, SAD) u Towbinovom transfer puferu. Transfer je trajao 2 sata pri konstantnoj jakosti struje od 200 mA i hlađenju cirkulacijom hladne vode kroz sustav. Nakon transfera, membrane su isprane u PBS-u s dodatkom 0,1 %-nog Tween 20 (PBS-T) i snimljene na ChemiDoc™ Imaging system uređaju pod „*stainfree membrane*“ postavkama (Slika 4.8 A). Dobivene snimke su kasnije korištene za normalizaciju nanošenja uzorka prilikom analize membrana.

Na membranama je provedena imunohistokemijska reakcija između ciljanih proteina (CTX1 ili P1NP) i specifičnih protutijela na navedene proteine: mišje monoklonalno primarno protutijelo na CTX1 (kat.br. LS-B16343, LSBio. Seattle, Washington, SAD) i zečje poliklonalno primarno protutijelo na P1NP (kat.br. 141967, USBiological, Salem, Massachusetts, SAD). Prikladne količine svakog primarnog protutijela (2,5 mL za svaku membranu) pripravljene su u puferu za blokiranje (BP) u koncentraciji 1:2000 i membrane su inkubirane u njima na 4 °C preko noći uz konstantno miješanje. Nakon inkubacije, membrane su isprane 3 puta po 10 minuta u PBS-T-u uz konstantno miješanje. Potom je slijedila inkubacija u trajanju od 2 sata na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje u otopinama prikladnog sekundarnog protutijela označenog biotinom koje reagira na prethodno naneseno primarno protutijelo pripravljenog u BP u koncentraciji 1:20 000. Za CTX1 membrane korišteno je kozje protu-mišje poliklonalno sekundarno protutijelo (kat.br. 115-065-071, Jackson

ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, SAD), a za P1NP membrane korišteno je kozje protu-zečje poliklonalno sekundarno protutijelo (kat.br. 111-065-144, Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania, SAD). Nakon inkubacije u sekundarnom protutijelu, membrane su isprane 3 puta po 10 minuta u PBS-T-u uz konstantno miješanje i prebačene u otopinu tercijarnog kompleksa na 1 sat pri sobnoj temperaturi i konstantnom miješanju. Tercijarni kompleks je polimer streptavidina i peroksidaze iz hrena (kat.br. S2438, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) pripravljen u PBS-T-u u koncentraciji 1:1000. Nakon inkubacije u tercijarnom kompleksu, membrane su isprane 3 puta po 10 minuta u PBS-T-u uz konstantno miješanje i snimljene na ChemiDoc™ Imaging system uređaju pod postavkama za kemiluminiscenciju na membrani (Slika 4.8 B). Za vizualizaciju dobivenog signala korišten je supstrat za peroksidazu Immobilon Forte (kat.br. WBLUF0500, Merck, Darmstadt, Njemačka). Razina signala uspoređena je s obojenim proteinskim standardom prema veličinama ciljanih proteina: 140 kDa za CTX1 i 53 kDa za P1NP.



Slika 4.8 Primjer digitalnih fotografija western blot membrana. Prikazane su „*stainfree*“ slika membrane korištene za normalizaciju signala (A) i slika intenziteta kemiluminiscentnog signala (B) označenog P1NP proteina. Sliku izradio autor.

Dobivene slike membrana uvezene su u program Image Lab (BioRad, Hercules, California, SAD) u nativnom .scn formatu. Slike istih membrana su spojene u „*stainfree*“ i kemiluminiscencijske parove korištenjem opcije „*Create Multichannel Image“*. „*Stainfree“* slike prikazuju ukupnu količinu proteina koja je nanesena u gel i uspješno prenesena na membranu, a kemiluminiscencijske slike prikazuju signal ciljanog proteina (CTX1 ili P1NP) na membrani. Korištenjem „*Lane and Bands“* alata, označene su jažice i dobivene linije proteina za obje slike u paru. Jakost signala za obje slike ispisan je i spremljen u obliku Excel tablice kroz opciju „*Analysis Table“*. Podatci su normalizirani i izraženi kao omjer jakosti signala ciljanog proteina u odnosu na ukupnu količinu proteina na membrani. Dobiveni normalizirani podatci su izraženi kao omjer jakosti signala uzorka u odnosu na prosječnu jakost

signala uzoraka kontrolne skupine životinja koji su se nalazili u istom gelu i takvi korišteni za statističku analizu.

4.6 Histološka analiza

4.6.1 Maternica

Na tkivu maternice je nakon fiksacije u 4 %-nom NBF-u izvršena mikrosekcija i srednja trećina roga maternice uklopljena je u parafin standardnim histološkim postupkom. Iz dobivenih parafinskih blokova pripremljeni su rezovi za bojanje metodom hemalaun-eozin i imunohistokemijsko bojenje za prikaz antigena Ki67 (biljeg proliferacije stanica). Korištenjem rotacijskog mikrotoma Slee CUT 4060 (Slee, Mainz, Njemačka) dobivena su dva seta preparata debljine 6 μm. Preparati za metodu hemalaun-eozin montirani su na obična predmetna stakla, a preparati za imunohistokemijsko bojenje na TOMO® adhezivna stakla (CellPath, Newton, Ujedinjeno Kraljevstvo) kako bi se smanjilo oštećenje tkiva prilikom bojenja.

Za bojenje hemalaun-eozin preparati su obojeni standardnim protokolom korištenjem otopine Mayerovog hemalauna i vodene otopine eozina pripravljenih u Laboratoriju za histologiju Medicinskog fakulteta Osijek. Mayerov hemalaun sadrži 0,1 % hematoksilina (Merck, Darmstadt, Njemačka), 0,02 % $NaIO_3$ (Merck, Darmstadt, Njemačka), 5 % $KAl(SO_4)_2 \times 12\ H_2O$ i 5 % kloral hidrata, a eozin je 1 %-na vodena otopina eozina Y (Acros Organics, Geel, Belgija). Preparati su bojani prema standardnom protokolu:

1. deparafiniranje preparata ksilolom i rehidracija silaznim nizom etanola
2. inkubacija 5 minuta u otopini Mayerovog hemalauna
3. ispiranje u destiliranoj vodi
4. razvijanje boje inkubacijom 15 minuta u vodi iz slavine
5. ispiranje u destiliranoj vodi
6. inkubacija 10 minuta u otopini eozina
7. ispiranje u destiliranoj vodi
8. dehidracija uzlaznim nizom etanola
9. inkubacija u ksilolu i zatvaranje preparata kanadskim balzamom

Obojeni preparati su fotografirani na mikroskopu Zeiss Axiovert 200M kamerom Zeiss Axiocam MRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Njemačka). Cijeli poprečni presjek kroz svaki uzorak tkiva maternice slikan je kao matrica slika pri ukupnom povećanju od 200 × korištenjem motoriziranog stolića mikroskopa i funkcije „*MosaiX*“ u programu AxioVision (Carl Zeiss,

Oberkochen, Njemačka). Svaka dobivena matrica slika povezana je u jednu sliku koja prikazuje cijeli poprečni presjek kroz maternicu korištenjem programa FIJI (distribucija programa ImageJ) uz pomoć dodatka „*Grid/Collection stitching*“ (197, 198). Dobivene slike su ručno segmentirane u programu GIMP (GNU image manipulation program, GIMP Development Team, 2022. dostupan na: https://www.gimp.org.) na ROI-je koji predstavljaju ukupno tkivo maternice, endometrij i lumen. Segmentirani ROI su izvezeni u obliku obojenih maski kao zasebne slike. Površine ukupnog tkiva maternice i endometrija izmjerene su na dobivenim maskama u programu FIJI, preračunate iz piksela u kvadratne mikrometre i izražene kao udio površine endometrija u ukupnoj površini tkiva. Prosječna debljina maternice i endometrija izmjerena je korištenjem specijalno izrađene makronaredbe za program FIJI (199). Makronaredba koristi dobivene maske lumena za pronalazak središta lumena maternice i koristi dobivene koordinate za „razmatanje“ maski endometrija ili kompletnog presjeka maternice dodatkom „*Polar transformer*“ (dostupan na: https://imagej.nih.gov/ij/plugins/polar-transformer.html). Polarna transformacija razmata okrugli objekt u linearni na način da svaka dobivena linija predstavlja jedan stupanj od ukupnih 360° iz središta lumena. Potom makronaredba mjeri svaku liniju dobivene slike korištenjem histogramskog prikaza u FIJI-ju i daje zbroj crnih piksela (predstavljaju tkivo maternice ili endometrija). Svih 360 mjera izvezeno je u obliku .csv dokumenta, a iz njih je izračunata prosječna debljina maternice ili endometrija. Dobiveni podatci su preračunati iz piksela u mikrometre, izraženi kao udio prosječne debljine endometrija u prosječnoj ukupnoj debljini maternice i korišteni za statističku analizu.

Preparati poprečnih presjeka maternice koji su prethodno pripremljeni na adhezivnim staklima korišteni su za imunohistokemijsko bojenje za prikaz količine proteina Ki67 u tkivu maternice. Bojenje je provedeno na Kliničkom zavodu za patologiju i sudsku medicinu pri Kliničkoj bolnici Osijek na uređaju VENTANA BenchMark ULTRA (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska) za automatsko imunohistokemijsko bojenje prema odgovarajućem protokolu. Kao primarno protutijelo korišteno je zečje monoklonalno protutijelo proizvođača Roche Diagnostics u preporučenom razrjeđenju (kat.br. 791-4286). Prikaz signala dobiven je korištenjem seta kemikalija UltraView Universal DAB Detection proizvođača Roche Diagnostics (kat.br. 760-500). Jezgre stanica su dodatno obojene hemalaunom koji je dio seta kemikalija namijenjenih za navedeni uređaj. Preparati su potom ručno dehidrirani i zatvoreni u automatskom pokrivaču Dako Sakura (Agilent, California, SAD) korištenjem filma Tissue-Tek Coverslipping Film (kat.br. 4840210). Kao negativna kontrola korišten je reakcijski pufer (kat.br. 950-300, Roche Diagnostics, Basel, Švicarska) bez primarnog protutijela.

Analizu preparata bojenih imunohistokemijski na Ki67 izvršio je kvalificirani patolog na mikroskopu AXIO Imager (Zeiss, Oberkochen, Njemačka). Ručno brojenje Ki67 pozitivnih stanica je izvršeno na 5 uzastopnih vidnih polja pri 40 × objektivu metodom prema Kinri i Maliku, pri čemu se prebroji oko 500 stanica (200). Tkivo je pregledano prema sljedećim kategorijama: epitel lumena, žljezdani epitel, stroma endometrija te miometrij, a pozitivne stanice su sortirane prema dijelu tkiva kojem pripadaju. Statistički je analiziran broj Ki67 pozitivnih stanica u svakom dijelu tkiva i uspoređen s kontrolom skupinom.

4.6.2 Perigonadalno masno tkivo

Uzorci perigonadalnog masnog tkiva su nakon fiksacije u 4 %-nom NBF-u uklopljeni u parafin standardnim histološkim postupkom. Iz formiranih parafinskih blokova pripremljeni su rezovi tkiva debljine 6 μm na rotacijskom mikrotomu Slee CUT 4060 (Slee, Mainz, Njemačka) i montirani na predmetna stakla. Dobiveni preparati obojani su korištenjem metode za prikaz kolagenih vlakana pomoću 0,1 %-ne otopine boje *sirius red F3B* (Magnacol ltd, Montgomery, Ujedinjeno Kraljevstvo) u zasićenoj vodenoj otopini pikrinske kiseline (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) prema Puchtleru. Preparati su nakon deparafiniranja i rehidracije inkubirani u Puchtlerovoj otopini 1 sat na sobnoj temperaturi, potom isprani dva puta u 0,5 %-noj vodenoj otopini octene kiseline (Avantor, Randor, Pensilvanija, SAD), dehidrirani, inkubirani u ksilolu te zatvoreni kanadskim balzamom i pokrovnim stakalcem.

Cijeli preparati slikani su na mikroskopu Zeiss Axiovert 200M kamerom Zeiss Axiocam MRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Njemačka) korištenjem funkcije *„MosaiX“* u programu AxioVision (Carl Zeiss, Oberkochen, Njemačka) kao matrica slika pri ukupnom povećanju 100 ×. Matrice slika su povezane u jednu sliku cijelog preparata korištenjem programa FIJI uz pomoć dodatka „*Grid/Collection stitching*“ (197, 198). Analiza adipocita provedena je uz dodatak *„Adiposoft“* za program FIJI (201). Oštećeni adipociti su automatski izbačeni iz analize. Za detekciju adipocita, promjer je bio limitiran na 40 do 150 piksela, a dobivene mjere površine adipocita, brojnosti adipocita i ekvivalentnog promjera (promjer kruga iste površine kao izmjereni adipocit) su izvezene u obliku Excel tablice. Rezultati su po potrebi preračunati iz piksela u mikrometre i mikrometre kvadratne te izraženi kao: prosječna površina adipocita (μm^2), prosječni ekvivalentni promjer (μm) i broj adipocita po površini tkiva. Dobiveni podatci su statistički analizirani.

4.6.3 Jetra

Na uzorcima jetre je nakon fiksacije u 4 %-nom NBF-u provedena mikrosekcija i srednji dio jetrenog režnja je uklopljen u parafin standardnim histološkim postupkom. Iz formiranih parafinskih blokova pripremljeni su preparati debljine 6 µm na rotacijskom mikrotomu Slee CUT 4060 (Slee, Mainz, Njemačka) i montirani na predmetna stakla. Dobiveni preparati obojeni su metodom za prikazivanje kolagena po Puchtleru istim postupkom kao preparati perigonadalnog masnog tkiva (vidjeti 4.6.2).

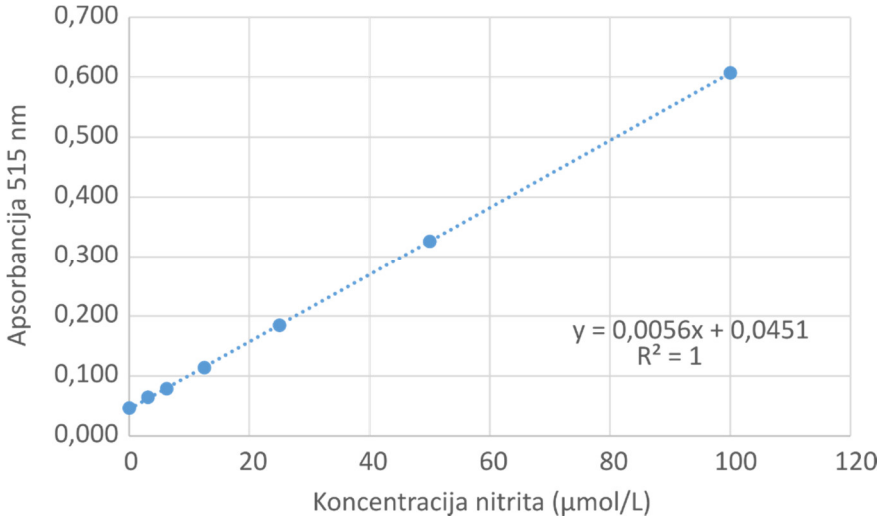
Preparati su slikani na mikroskopu Zeiss Axiovert 200M kamerom Zeiss Axiocam MRc (Carl Zeiss, Oberkochen, Njemačka) korištenjem funkcije *„MosaiX“* u programu AxioVision (Carl Zeiss, Oberkochen, Njemačka) kao matrica slika pri ukupnom povećanju 200 ×. Veličina matrica je bila 10×10 i zahvaćala je najdeblji dio preparata. Matrice slika su povezane u jednu sliku cijelog preparata korištenjem programa FIJI uz pomoć dodatka „*Grid/Collection stitching*“ (197, 198). Odabrane su slike s najmanje artefakata i korištene za analizu. Korištenjem programa GIMP (GNU image manipulation program, GIMP Development Team, 2022. dostupan na: https://www.gimp.org.) izdvojeno je tkivo jetre (uklonjena je pozadina). Iz dobivenih slika izdvojene su maske koje prikazuju kolagen opcijom „*Color Thresholding*“ unutar distribucije FIJI. Na temelju dobivenih maski, izmjerena je površina kolagena i površina ukupnog tkiva u programu FIJI, a vrijednosti su pohranjene u obliku Excel tablice. Dobiveni podaci preračunati su iz piksela u mikrometre kvadratne, izraženi kao udio kolagena u površini tkiva i statistički obrađeni.

4.7 Oksidativno oštećenje

4.7.1 Dušikov oksid i aktivnost arginaze u serumu

Analiza količine dušikova oksida (NO) u serumu izvršena je mjerenjem količine nitrita (NO_2^-) koji nastaje raspadom dušikova oksida. Za analizu je korišten set kemikalija Griessovog reagensa (kat.br. G2930, Promega, Madison, Winsconsin, SAD) koji pomoću reakcije sulfanilamida i nitrata uz N-1-naftiletilendiamin dihidrokorida u kiselim uvjetima stvara azo-spoj kojeg je moguće mjeriti spektrofotometrijski. Iz priloženog standarda nitrita priređena su serijska razrjeđenja za izradu baždarne krivulje prema uputama proizvođača. Razrjeđenja nitrita i 50 µL svakog uzorka seruma ispipetirani su u tehničkom triplikatu u pločice s 96 jažica. U iste pločice dodano je 50 µL otopine sulfanilamida, nakon 10 minuta inkubacije dodano je 50 µL otopine N-1-naftiletilendiamin dihidrokorida i inkubirano 10 minuta. Dobivena reakcija mjerena je na uređaju iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules,

Kalifornija, SAD) pri valnoj duljini 515 nm. Iz prosječne apsorbancije tehničkih triplikata i izrađene baždarne krivulje (Slika 4.9) dobivene su koncentracije nitrita (µmol/L) i statistički analizirane.



Slika 4.9 Baždarna krivulja korištena za izračun količine nitrita u serumu i mjerenje količine dušikova oksida. Sliku izradio autor.

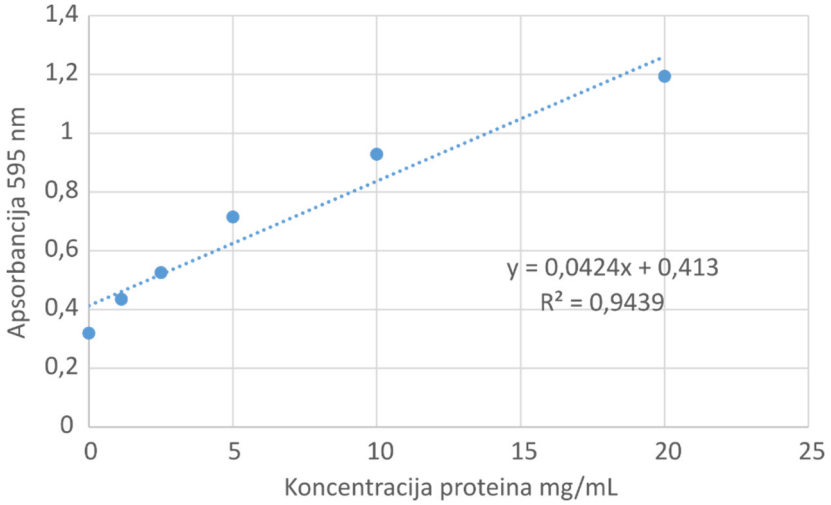
Aktivnost arginaze kao serumskog pokazatelja aktivnosti jetre je mjerena korištenjem komercijalnog seta kemikalija za aktivnost arginaze (kat.br. MAK112, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD). Pripravljeni su standardi ureje prema uputama proizvođača i uzorci seruma su razrijeđeni 10 puta u vodi. U pločice s 96 jažica ispipetirani su standardi i uzorci u duplikatu (eksperimentalni i kontrolni). U eksperimentalni set jažica dodan je supstrat reagens za arginazu i pločice su inkubirane 2 sata na 37 °C. Nakon toga, u sve jažice je dodan reagens koji u reakciji s nastalom i prisutnom urejom daje obojeni produkt, a u kontrolni set dodan je supstrat za arginazu i inkubiran je 1 sat na sobnoj temperaturi. Razvijeno obojenje mjereno je na uređaju iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD) pri valnoj duljini 415 nm. Aktivnost arginaze izračunata je prema uputama proizvođača i izražena u jedinicama arginaze po litri seruma. Jedna jedinica arginaze je količina enzima koja pri pH 9,5 i temperaturi 37 °C pretvori 1 µmol L-arginina u ornitin i ureu.

4.7.2 Stupanj lipidne peroksidacije

Stupanj lipidne peroksidacije analiziran je mjerenjem koncentracije jednog od završnih produkata lipidne peroksidacije – malondialdehida (MDA). U kiselim uvjetima malondialdehid reagira s tiobarbituratnom kiselinom i stvara kompleks čiju apsorbanciju je moguće

spektrofotometrijski mjeriti pri valnoj duljini od 523 nm (202). Koncentracije malondialdehida mjerene su u homogenatima tkiva jetre i bubrega.

U plastičnu tubicu od 1,5 mL dodano je 50 mg tkiva jetre ili bubrega i 500 µL PBS-a te je tkivo homogenizirano korištenjem teflonskog štapnog homogenizatora. Dobiveni homogenati su centrifugirani 15 minuta silom od 15 000 ×g pri temperaturi 4 °C u centrifugi Sigma 1-15PK (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka) kako bi se uklonili veći ostatci tkiva. Dobiveni supernatant prebačen je u novu tubicu i čuvan na -80 °C do analize. Za potrebe normalizacije dobivenih rezultata koncentracije malondialdehida, potrebno je bilo izmjeriti ukupnu količinu proteina unutar dobivenih homogenata. Ukupni proteini mjereni su spektrofotometrijski po Bradfordu na temelju vezanja Coomassie modrila G250 na aromatske skupine aminokiselina u kiselim uvjetima i pomaku apsorpcijskog maksimuma s 465 nm na 595 nm (203). Bradfordov reagens je pripravljen otapanjem 50 mg Coomassie modrila G250 (Carl Roth Karlsruhe, Njemačka) u 50 mL metanola (Carlo Erba, Milan, Italija). Nakon što je boja otopljena, dodano je 100 mL 85 %-ne fosfatne kiseline (Sigma, St. Louis, Missouri, SAD) i nadopunjeno destiliranom vodom do 1 L. Reagens je profiltriran kroz 0,2 µm PES filter Nalgene™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) kako bi se uklonio neotopljeni dio boje i pohranjen na 4 °C. Pripravljena je baždarna krivulja goveđeg serumskog albumina (Sigma, St. Louis, Missouri, SAD) u PBS-u serijskim razrjeđenjima od 20 mg/mL proteina do 0,125 mg/mL uz čisti PBS. Baždarni uzorci i uzorci homogenata ispipetirani su u pločice s 96 jažica u tehničkom triplikatu i volumenu 1 µL. U jažice je dodano 250 µL pripremljenog Bradfordovog reagensa i nakon 10 minuta inkubacije apsorbancija je mjerena na uređaju iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD) pri valnoj duljini 595 nm. Pomoću baždarne krivulje i srednje apsorbancije tehničkog triplikata izračunata je količina ukupnih proteina u homogenatima jetre i bubrega i izražena u mg/mL (Slika 4.10).



Slika 4.10 Baždarna krivulja korištena za izračun koncentracije ukupnih proteina po Bradfordu u homogenatima jetre i bubrega. Sliku izradio autor.

Tablica 4.2 Popis otopina korištenih za analizu stope lipidne peroksidacije

Otopina	**Sastav i proizvođač**
Fosfatni pufer (PBS)	137 mM NaCl*, 2,7 mM KCl†, 10 mM Na_2HPO_4†, 1,8 mM KH_2PO_4† u destiliranoj vodi (dH_2O)
Otopina A	8,1 %-ni natrijev dodecil sulfat‡ u dH_2O
Otopina B	20 %-na octena kiselina§, 0,8547 %-ni HCl‖, pH = 3,5
Otopina C	0,8 %-na tiobarbituratna kiselina**
Otopina D	10 mL otopine A, 75 mL otopine B, 75 mL otopine C

* Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
† VWR, Radnor, Pennsylvania, SAD
‡ Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
§ Avantor, Randor, Pensilvanija, SAD
‖ Carlo Erba, Milan, Italija
**SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Njemačka

Nakon mjerenja proteina, u plastične tubice od 2 mL ispipetirano je 100 µL svakog homogenata jetre ili bubrega. Potom je dodano 1,6 mL svježe pripremljene otopine D (Tablica 4.2) i uzorci su inkubirani 1 sat u vodenoj kupelji na 95 °C. Nakon inkubacije, uzorci su ohlađeni do sobne temperature na ledu i centrifugirani 12 minuta pri 5000 g i temperaturi 4 °C u centrifugi Sigma 1-15PK (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka) kako bi se uklonilo netopive komponente. Razvijeno obojenje u supernatantu mjereno je pri valnoj duljini od 523 nm u polistirenskim kivetama zapremnine 1 mL i puta svjetlosti 1 cm u spektrofotometru Lambda 25 UV/vis (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, SAD). Iz

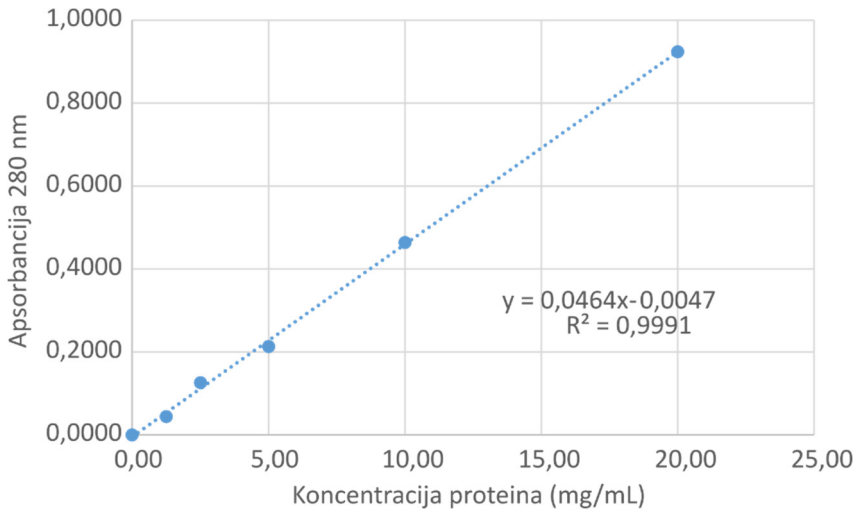
dobivene apsorbancije izračunata je koncentracija malondialdehida u homogenatu pomoću ekstinkcijskog koeficijenta ($\varepsilon = 1{,}56\times10^5\ M^{-1}cm^{-1}$) i normalizirana prema ukupnim proteinima. Dobiveni rezultati izraženi su kao nanomoli malondialdehida po miligramu proteina i korišteni za statističku analizu.

4.7.3 Količina karbonil proteina

Analizirana je količina karbonil proteina kao produkata oštećenja nastalog djelovanjem reaktivnih kisikovih i drugih slobodnih radikala. Za analizu korišteni su prethodno pripremljeni homogenati jetre i bubrega (vidjeti 4.7.2). Mjerenje karbonil proteina temelji se na reakciji 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) s karbonil skupinama oštećenih proteina i spektrofotometrijskom mjerenju nastalog kompleksa pri valnoj duljini 375 nm prema modificiranoj metodi Levine i suradnika (204).

U plastičnu tubicu od 1,5 mL ispipetirano je 10 µL homogenata i razrijeđeno PBS-om 1:4. Pripremljeni su uzorci u duplikatu i jedan set korišten je kao slijepa proba za mjerenje količine proteina jer prilikom ispiranja dolazi do gubitka proteina. U sve tubice dodano je 100 µL 30 %-ne vodene otopine trikloroctene kiseline (Merck, Darmstadt, Njemačka), uzorci su promiješani i centrifugirani 10 minuta pri 5000 ×g na sobnoj temperaturi u centrifugi Sigma 1-15PK (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka) kako bi se iz homogenata izolirali proteini. Potom je supernatant odbačen, talog je otopljen u 100 µL otopine klorovodične kiseline (Carlo Erba, Milan, Italija) i acetona (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska) u omjeru 1:1 kako bi se uklonio hemoglobin (koji interferira prilikom spektrofotometrijskog mjerenja) i uzorci su centrifugirani 10 minuta pri 15000 ×g na 4 °C u istoj centrifugi. Potom je supernatant odbačen i u slijepe probe dodano 250 µL 2 N klorovodične kiseline, a u testne uzorke 250 µL 10 mM DNPH (Acros Organics, Geel, Belgija) u 2 N klorovodičnoj kiselini. Uzorci su inkubirani u tami kroz sat vremena uz miješanje svakih 15 minuta. Potom su centrifugirani 10 minuta pri 15000 ×g na 4 °C i supernatant je odbačen. Višak DNPH ispran je dodavanjem 250 µL otopine apsolutnog etanola (Biognost, Zagreb, Hrvatska) i etil acetata (Merck, Darmstadt, Njemačka) u omjeru 1:1 uz centrifugiranje 10 minuta pri 15000 ×g na 4 °C, nakon čega je odbačen supernatant. Postupak ispiranja ponovljen je za sve tubice (uključujući i slijepe probe) dva puta, nakon čega je talog otopljen u 125 µL 6 M otopine gvanidin hidroklorida (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švicarska). Uzorci su ispipetirani u prikladnu kvarcnu kivetu puta svijetlosti 1 cm i apsorbancija je mjerena pri 375 nm za uzorke tretirane DNPH-om, a 280 nm za slijepe probe u spektrofotometru Lambda 25 UV/vis (PerkinElmer,

Waltham, Massachusetts, SAD). Za baždarnu krivulju pripremljeni su uzorci goveđeg serumskog albumina (Sigma, St. Louis, Missouri, SAD) otopljenog u gvanidin hidrokloridu i apsorbancija je mjerena pri 280 nm na istom spektrofotometru. Iz dobivene baždarne krivulje (Slika 4.11) izračunate su koncentracije proteina u slijepim probama, a iz testnih uzoraka su izračunate koncentracije karbonil proteina pomoću ekstinkcijskog koeficijenta ($\varepsilon = 22\times103\ M^{-1}cm^{-1}$). Sadržaj karbonil proteina u uzorku izražen je kao mikromoli karbonil proteina po miligramu proteina i korišten za statističku analizu.



Slika 4.11 Baždarna krivulja za izračun koncentracije proteina u uzorcima jetre i bubrega mjerenih pri 280 nm valnoj duljini. Sliku izradio autor.

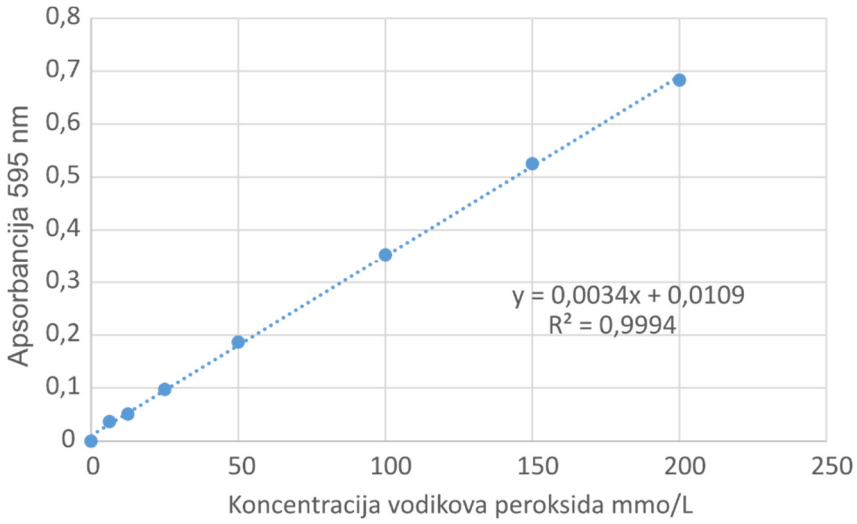
4.7.4 Aktivnost katalaze

Aktivnost katalaze analizirana je u prethodno pripremljenim homogenatima jetre i bubrega uz pomoć prethodno izmjerene koncentracije ukupnih proteina (vidjeti 4.7.2). Korištena je metoda prema Sinhi koja mjeri stopu razgradnje otopine poznate koncentracije vodikova peroksida u uzorku u minuti i redukcijom kalijeva dikromata preostalim vodikovim peroksidom u kromov acetat uz grijanje i prisustvo octene kiseline (205). Količina nastalog kromovog acetata mjeri se spektrofotometrijski.

Pripremljena su serijska razrjeđenja vodikova peroksida (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska) početne koncentracije 200 mM do 6,25 mM. Volumen 330 µL svakog razrijeđena ispipetiran je u triplikatu u plastičnu tubicu od 1,5 mL nakon čega je u svaku dodano 660 µL 1,25 %-ne otopine kalijeva dikromata (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) u 75 %-noj vodenoj otopini octene kiseline (Avantor, Randor, Pensilvanija, SAD). Tako pripravljeni uzorci su

promiješani i grijani na 100 °C kroz 10 min nakon čega su ohlađeni na ledu. Volumen 200 µL svakog razrjeđenja ispipetiran u pločicu s 96 jažica i apsorbancija je mjerena na valnoj duljini 595 nm na uređaju iMark™ Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornija, SAD). Iz dobivenih rezultata napravljena je baždarna krivulja koja je korištena za analizu uzoraka (Slika 4.12).

Uzorci su u triplikatu pripravljeni za mjerenje razrjeđivanjem 1:50 s PBS-om. Volumen od 66 µL uzorka ispipetiran je u plastičnu tubicu od 1,5 mL u koju je dodano 264 µL 0,2 M otopine vodikova peroksida što daje 160 mM vodikova peroksida u uzorku. Nakon 1 minute u uzorke je dodano 660 µL otopine 1,25 % kalijeva dikromata u 75 % vodenoj otopini octene kiseline te je uzorak grijan 10 minuta na 100 °C kako bi preostali vodikov peroksid reducirao kalijev dikromat. Potom su uzorci ohlađeni, ispipetirano 200 µL u pločice s 96 jažica i mjerena im je apsorbanca pri valnoj duljini od 595 nm na istom spektrofotometru. Iz dobivenih apsorbancija je uz pomoć baždarne krivulje izračunata krajnja koncentracija vodikova peroksida i aktivnost katalaze izražena kao milimoli potrošenog vodikovog peroksida po sekundi po mikrogramu ukupnih proteina.



Slika 4.12 Baždarna krivulja koncentracije vodikova peroksida korištena za analizu aktivnosti katalaze u tkivu jetre i bubrega. Sliku izradio autor.

4.7.5 Količina kolesterola i triglicerida u jetri

Koncentracija ukupnog kolesterola i ukupnih triglicerida prisutnih u tkivu jetre analizirane su korištenjem prethodno pripravljenih homogenata jetre (vidjeti 4.7.2). Za mjerenje je korišten kolorimetrijski enzimatski test Cholesterol liquicolor i Tryglicerides liquicolor mono

(HUMAN, Wiesbaden, Njemačka). Protokol mjerenja jednak je kao i za serumske razine kolesterola i triglicerida (vidjeti 4.4). Dobivene koncentracije kolesterola i triglicerida su uz pomoć prethodno izmjerenih koncentracija ukupnih proteina u homogenatima izražene kao mikromoli po gramu ukupnih proteina i korištene statističku analizu.

4.8 MALDI-TOF masena spektrometrija

Prilikom masene spektrometrije MALDI-TOF metodom (engl. *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, MALDI-TOF-MS) koriste se matrice koje potpomažu ionizaciju uzorka nanesenog na elektroprovodljivo predmetno staklo presvučeno slojem oksida indija i kositra ili posebnu metalnu pločicu. Prikupljanje podataka može biti provedeno u pozitivnom ili negativnom načinu rada. U pozitivnom načinu rada molekule uzorka predaju elektrone matrici te postaju pozitivno nabijene dok u negativnom načinu rada matrica donira elektrone molekulama uzorka koje postaju negativno nabijene. Najčešće korištena matrica za pozitivni način rada je 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (DHB), a za negativni način rada 9-aminoakridin (9-AA). Metoda omogućava kvantifikaciju molekula koje se mogu lako ionizirati, dok se neutralne molekule ili one koje se teško ioniziraju detektiraju kao šum ili izrazito nizak signal.

4.8.1 Priprema uzoraka jetre

Za izolaciju lipida iz jetre korištena je metoda izolacije pomoću kloroforma i izopropanola kako bi se uklonio hemoglobin i jetreni pigmenti (206). Iz prethodno pripremljenih homogenata jetre (vidjeti 4.7.2) izdvojeno je 40 µL uzorka u plastičnu tubicu od 2 mL u što je dodano 350 µL kloroforma visoke čistoće (Honeywell, Charlotte, N. Carolina, SAD) i 550 µL izopropanola visoke čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka). Uzorci su inkubirani pri konstantnom miješanju kroz 30 minuta te centrifugirani 10 minuta pri sili od 17000 ×g na temperaturi 4 °C u centrifugi Sigma 1-15PK (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Njemačka). Iz svakog uzorka izdvojeno je 800 µL u staklene bočice od 1,5 mL s teflonskom/silikonskom pregradom (BGB Analytik, Boeckten, Švicarska). Potom su izolirani uzorci ukupnih lipida upareni do suhog grijanjem na 45 °C u struji dušika i pohranjeni na -80 °C do analize.

4.8.2 Priprema uzoraka perigonadalnog masnog tkiva

Polarni i nepolarni lipidi perigonadalnog masnog tkiva izdvojeni su korištenjem metode po Bligh i Dyeru (207). U staklenom Dounceovom homogenizatoru (DWK Life Sciences, Milville, New Jersey, SAD) homogenizirano je 100 mg uzorka perigonadalnog masnog tkiva u

1 mL destilirane vode visoke čistoće (Carlo Erba, Milan, Italija). Homogenizator je ispran nakon svakog uzorka otopinom metanola (Honeywell, Charlotte, N.Carolina, SAD) i kloroforma (Honeywell, Charlotte, N. Carolina, SAD) visoke čistoće u omjeru 2:1. U plastičnu tubicu od 15 mL ispipetirano je 800 µL dobivenog homogenata na koji je dodano 2 mL metanola i 1 mL kloroforma visoke čistoće. Uzorak je potom promiješan i inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je dodano 1 mL kloroforma visoke čistoće i 1 ml destilirane vode visoke čistoće. Dobivena smjesa je promiješana i centrifugirana 10 minuta pri 2500 ×g na centrifugi Eppendorf 5810 (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) pri čemu se uzorak razdvojio na 3 faze. Gornja faza sadrži polarne lipide otopljene u metanolu i vodi, srednja faza sadrži proteine, a donja faza sadrži nepolarne lipide otopljene u kloroformu. U staklene bočice volumena 1,5 mL s teflonskom/silikonskom pregradom (BGB Analytik, Boeckten, Švicarska) izdvojeno je 1 mL gornje faze, a ostatak gornje faze je odbačen. Potom je uzorak ponovno centrifugiran i u drugu staklenu bočicu odvojeno je 1 mL donje faze, a ostatak odbačen. Izolirani uzorci polarnih i nepolarnih lipida su upareni do suhog grijanjem na 45 °C u struji dušika i pohranjeni na -80 °C do analize.

4.8.3 Prikupljanje i analiza podataka na MALDI-TOF uređaju

Pripremljene su obje matrice za analizu u koncentraciji 10 mg/mL. DHB (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) je otopljen u metanolu visoke čistoće (Honeywell, Charlotte, N.Carolina, SAD), a 9-AA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) u otopini acetonitrila (Avantor, Randor, Pensilvanija, SAD) i izopropanola visoke čistoće (Merck, Darmstadt, Njemačka) u omjeru 40:60. Obje matrice su čuvane na 4 °C. Upareni uzorci lipida jetre i perigonadalnog masnog tkiva su neposredno prije analize resuspendirani u 100 µL otopine kloroforma i metanola visoke čistoće u omjeru 3:7. Volumen 10 µL svakog uzorka pomiješan je s 10 µL prikladne matrice (DHB za pozitivan način rada, a 9-AA za negativni način rada) i 2 µL svakog uzorka naneseno je na metalne pločice za MALDI-TOF-MS uređaj (kat.br. 8280781, Bruker, Billerica, Massachusetts, SAD). Na pločice je također nanesen crveni fosfor (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, SAD) za kalibraciju uređaja.

Prikupljanje podataka provedeno je na uređaju Bruker UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF MS (Bruker, Billerica, Massachusetts, United States) na Odjelu za kliničku kemiju Kliničkog bolničkog centra Osijek. Sniman je raspon od 500 Da do 2500 Da u pozitivnom i negativnom načinu rada. Postavke uređaja su bile: stopa uzorkovanja i digitalizator 5,00 GS/s, srednja opcija „S*martbeam*“ lasera, frekvencija lasera 2000 Hz, snaga lasera 90 %, 200 pogodaka po pikselu

i svaka mjera je bila zbroj 15000 pogodaka. Rezultati analize i izvoz podataka obavljeni su u programu Bruker Flex Analysis (Bruker, Billerica, Massachusetts, SAD) uz postavke: algoritam detekcije maksimuma „*Snap*“ uz prag 6, algoritam zaglađivanja Savitzky-Golay (širina 0,2 m/z, 1 ciklus) i funkcija „*TopHat*“ za uklanjanje pozadinskog šuma.

Analiza dobivenih spektara obavljena je u programu R (The R Project for Statistical Computing, R Development Core Team, dostupan na: http://www.r-project.org/) uz knjižnice: *matrixTests, roperators, FELLA, KEGGREST, igraph, magrittr* i *resample* (208).

4.9 Statistička analiza

Izrada tablica i priprema podataka za statističku analizu obavljena je u programu Microsoft Excel. Ako nije drugačije navedeno, za statističku obradu podataka korišten je program Past (209). Podatci koji su se prema Grubbsovom i Dixonovom Q testu značajno razlikovali od ostalih unutar skupine su uklonjeni iz svih vezanih analiza. Normalnost podataka testirana je Shapiro-Wilk testom za normalnost raspodjele. Homogenost varijance provjerena je korištenjem Levenovog testa za homogenost varijance. Ukoliko su podatci bili normalne raspodjele i homogene varijance korištena je analiza varijance s jednim promjenjivim čimbenikom (engl. *one-way analysis of variance*, one-way ANOVA) čiji je rezultat prikazan kao p vrijednost. Normalno raspodijeljeni podatci s nehomogenom varijancom analizirani su korištenjem Welchove verzije one-way ANOVA testa čiji je rezultat iskazan kao F-statistika, stupnjevi slobode i p vrijednost. U slučaju da podatci nisu imali normalnu raspodjelu, korišten je Kruskal-Wallis test, a rezultati testa prikazani su kao vrijednost χ^2 i p vrijednost. Za *post hoc* analizu značajnosti između skupina za normalno raspodijeljene podatke korišten je Tukey-Kramer test, a za podatke koji nisu imali normalnu raspodjelu Dunnov test uz Bonferronijevu korekciju p vrijednosti. Za statističku obradu podataka dobivenih korištenjem MALDI-TOF uređaja korišten je Studentov t-test u programu R (sve eksperimentalne skupine su uspoređene s kontrolnom skupinom životinja i ovarijektomiranim netretiranom skupinom životinja).

Podaci normalne raspodjele tablično su predstavljeni aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a ostali podaci (uključujući grafove) medijanom i interkvartilnim rasponom. Sve p vrijednosti su dvostrane s razinom značajnosti $\alpha = 0,05$.

5. REZULTATI

Ispitivanje je provedeno na 70 štakorica soja Wistar, starosti 6 mjeseci, od kojih je 10 podvrgnuto placebo operaciji, a ostale bilateralnoj ovarijektomiji, čime je uspostavljen model osteoporoze. 60 ovarijektomiranih životinja podijeljeno je u 6 skupina koje su primale visoku ili nisku dozu alendronata, ekstrakt hmelja, njihovu kombinaciju ili samo otapalo za ekstrakt hmelja (za detalje vidjeti potpoglavlje 4.3.1.). Prilikom istraživanja uginule su 2 životinje, jedna u skupini OV, a druga u skupini X. Gdje nije drugačije naznačeno, prikazani su rezultati od po 9 životinja iz skupina OV i X te 10 životinja iz ostalih skupina.

5.1 Težine organa

Prilikom uzorkovanja, izmjerene su težine obje bedrene kosti, cijele maternice, cijele jetre i oba bubrega te su izračunate prosječne težine spomenutih organa (iz težina obje bedrene kosti i oba bubrega izračunata je prosječna težina pojedinog organa životinje). Rezultati analize težine bedrene kosti testom one-way ANOVA pokazali su značajno manju težinu bedrene kosti u svih ovarijektomiranih skupina u odnosu na kontrolnu ($p = 0,002$), a skupine AL-X i X imale su statistički značajno lakše kosti u odnosu na kontrolnu skupinu. Težine maternice u svih ovarijektomiranih skupina bile su statistički značajno niže u odnosu na kontrolu ($F = 25,55$, $df = 22,46$, $p < 0,001$), a ovarijektomirane skupine se međusobno nisu značajno razlikovale. Težine jetre ($p = 0,055$) i bubrega ($p = 0,033$) bile su podjednake u svih skupina te se nisu značajno međusobno razlikovale (Slika 5.1).

5.2 Hematološke i biokemijske odrednice krvi i seruma

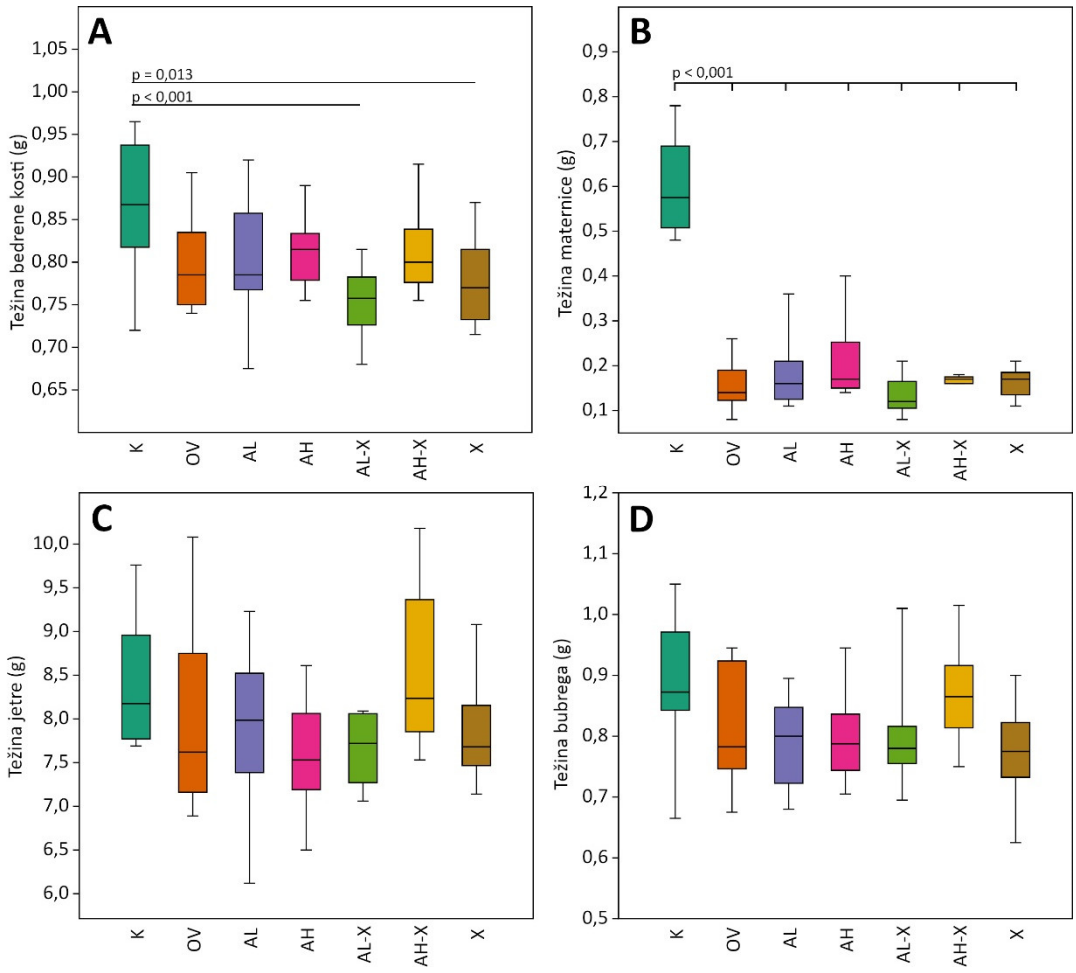
5.2.1 Hematološke odrednice

Za procjenu općeg utjecaja ispitivanih tvari na životinje analizirane su ranije spomenute laboratorijske odrednice iz uzoraka pune krvi. Rezultati analize su statistički obrađeni korištenjem Kruskal-Wallis testa i iskazani kao vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona (Tablica 5.1).

Vrijednosti eritrocita bile su veće u svim skupinama u odnosu na kontrolnu skupinu, a statistički značajno u obje skupine koje su primale niske doze alendronata (AL $p = 0,043$; AL-X $p = 0,01$). Vrijednost hematokrita je također bila statistički značajno veća u istim skupinama (AL $p = 0,028$; AL-X $p = 0,013$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Vrijednosti hemoglobina su, osim u već navedenim skupinama (AL $p = 0,0021$; AL-X $p = 0,014$), bile veće i u životinja koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja ($p = 0,035$). Međutim, prosječni

volumen hemoglobina u eritrocitima bio je veći samo u skupini koja je primala visoke doze alendronata u odnosu na kontrolu (p = 0,043) i u odnosu na ovarijektomiranu netretiranu skupinu (p = 0,0192). Prosječni volumen eritrocita i prosječni volumen hemoglobina u eritrocitu se značajno nisu razlikovali među skupinama.

Broj leukocita bio je značajno veći u skupini koja je primala visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja u odnosu na kontrolnu (p = 0,031), a brojnost trombocita značajno snižena u tri skupine: AH (p = 0,003), AL-X (p = 0,028), AH-X (p < 0,001).



Slika 5.1 Slika prikazuje težine bedrene kosti (A), maternice (B), jetre (C) i bubrega (D) u gramima. K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su one-way ANOVA analizom uz Tukey-Kramer *post hoc* test, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

Tablica 5.1 Analiza hematoloških odrednica krvi.

Skupina*		Eritrociti $\times 10^{12}$/L	Leukociti $\times 10^{9}$/L	Trombociti $\times 10^{9}$/L	Hemoglobin g/L	Hematokrit L/L	MCV* fL	MCH* pg	MCHC* g/L
K		6,99 (6,78 – 7,13)	3,4 (2,8 – 4,45)	722,5 (681,25 – 742,5)	153 (147 – 156,5)	0,403 (0,397 – 0,417)	58,5 (56,75 – 60)	22 (21,17 – 22,5)	376,5 (367,25 – 380,25)
OV		7,49 (7,28 – 7,98)	4,2 (4,1 – 4,5)	666 (620 – 684)	161 (156 – 179)	0,435 (0,419 – 0,468)	57 (57 – 62)	21,5 (21,3 – 23)	372 (370 – 376)
AL		7,77 (7,07 – 8,55) ‡	4,3 (3,85 – 5,17)	597,5 (542,5 – 680,5)	171 (163 – 190,25) ‡	0,458 (0,41 – 0,503) ‡	59 (58 – 60)	22,45 (21,95 – 22,97)	381,5 (374,25 – 390,75)
AH		7,48 (6,82 – 7,78)	5,3 (3,65 – 6,25)	549 (464,5 – 623) ‡	171 (157,5 – 178)	0,424 (0,404 – 0,447)	59 (57,5 – 59,5)	22,6 (22,45 – 23,55) ‡§	387 (381 – 406)
AL-X		7,94 (7,68 – 8,02) ‡	4,3 (3,57 – 5,5)	534,5 (493 – 628,75) ‡	170,5 (167 – 176,75) ‡	0,454 (0,436 – 0,472) ‡	57,5 (56 – 59,25)	21,45 (21,27 – 22,6)	377 (369 – 380,5)
AH-X		7,23 (6,94 – 7,93)	5,5 (3,6 – 6,5) ‡	541 (403,75 – 585,75) ‡	171,5 (161 – 175) ‡	0,435 (0,412 – 0,46)	59,5 (58 – 61,25)	23,2 (21,92 – 23,72)	386,5 (376 – 393,5)
X		7,17 (7,06 – 7,38)	5,1 (4,85 – 5,25)	625 (572,5 – 647,5)	163 (162 – 168,5)	0,422 (0,420 – 0,435)	59 (58,5 – 60)	22,9 (22,45 – 23,15)	386 (384 – 387,5)
Kruskal-Wallis †	χ^2	16,93	14,5	27,56	19,99	16,38	5,274	14,66	19,51
	p	0,009	0,024	<0,001	0,003	0,012	0,489	0,023	0,003

*Kratice: K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja, MCV – prosječni volumen eritrocita (engl. *mean corpuscular volume*), MCH – prosječni hemoglobin u eritrocitu (engl. *mean corpuscular hemoglobin*), MCHC – prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (engl. *mean corpuscular hemoglobin concentration*).

† Vrijednosti dobivene Kruskal-Wallis statističkim testom uz Dunnov *post hoc* i Bonferronijevu korekciju p vrijednosti. Vrijednosti u tablici prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon).

‡ $p < 0,05$ u odnosu na K, § $p < 0,05$ u odnosu na OV56

5.2.2 Biokemijske odrednice seruma

Osim hematoloških odrednica analizirane su i biokemijske odrednice u serumu: alanin aminotransferaza (ALT), ukupna alkalna fosfataza (ALP), amilaza (AMI), kalcij, fosfor, kalij, natrij, urea, albumin, globulini, kreatinin, ukupni proteini, ukupni bilirubin i razina glukoze. Analiza rezultata provedena je korištenjem Kruskal-Wallis statističkog testa uz Dunnov *post hoc* i Bonferronijevu korekciju p vrijednosti.

U tablici 5.2 prikazani su rezultati provedene analize koncentracija iona i malih organskih spojeva. Koncentracije kalcija bile su značajno niže u ovarijektomiranoj skupini životinja koja je primala visoku dozu alendronata ($p = 0,003$) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Niti jedna od ispitivanih tvari nije pokazala utjecaj na koncentracije fosfora, natrija i kalija. Koncentracije glukoze, uree i bilirubina u krvi nisu se značajno razlikovale između skupina.

Rezultati analize serumskih proteina (ALP, ALT, AMI, kreatinin, albumin, globulini i ukupni proteini) koji služe za procjenu funkcije jetre i drugih organa prikazani su u tablici 5.3. Koncentracija alkalne fosfataze bila je značajno niža u skupini ovarijektomiranih životinja koje su primale samo ekstrakt hmelja ($p = 0,041$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Vrijednost alanin aminotransferaze bila je značajno viša u ovarijektomiranoj skupini životinja koje su primale visoke doze alendronata u odnosu na ostale skupine koje su primale alendronat (AL $p = 0,029$; AL-X $p = 0,001$; AH-X $p = 0,001$) i ovarijektomiranu netretiranu skupinu ($p < 0,001$). Ovarijektomirana skupina životinja koja je primala samo ekstrakt hmelja imala je značajno niže vrijednosti ALT u odnosu na ostale skupine koje su primale ekstrakt hmelja (AL-X $p = 0,016$; AH-X $p = 0,023$) kao i u odnosu na ovarijektomiranu netretiranu skupinu ($p = 0,007$). Koncentracije amilaze nisu se značajno razlikovale, a količine kreatinina bile su značajno niže spram dvije skupine koje su primale ekstrakt hmelja (AL-X $p = 0,048$; X $p = 0,003$). Koncentracija albumina bila je niža u svih skupina u odnosu na kontrolu, a statistički značajno niža u ovarijektomiranoj skupini životinja koje su primale kombinaciju visoke doze alendronata i ekstrakta hmelja ($p = 0,048$). Nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji globulina između skupina. Ukupne koncentracije proteina u serumu bile su niže u svih skupina u odnosu na kontrolu, a statistički značajno niže u obje skupine koje su primale visoke doze alendronata (AH $p = 0,024$; AH-X $p = 0,001$).

Tablica 5.2 Analiza koncentracije iona i organskih spojeva u serumu.

Skupina*		Kalcij mmol/L	Fosfor mmol/L	Natrij mmol/L	Kalij mmol/L	Glukoza mmol/L	Urea mmol/L	Bilirubin mmol/L
K		2,72 (2,67 – 2,78)	2,11 (1,86 – 2,42)	134 (125 – 136,25)	4,55 (4,15 – 4,82)	13,55 (12,47 – 14,47)	5,75 (4,82 – 6,42)	4,5 (4 – 5)
OV		2,66 (2,62 – 2,67)	2,2 (1,98 – 2,37)	132 (132 – 135)	4,6 (4,05 – 5)	16,9 (12,9 – 18,55)	6 (5,5 – 6,95)	4 (3 – 6)
AL		2,67 (2,66 – 2,75)	1,84 (1,71 – 2)	133 (130 – 135)	4,6 (4,3 – 4,8)	15,8 (14,1 – 16,4)	5,7 (5,2 – 6,6)	5 (5 – 6)
AH		2,52 (2,5 – 2,59) ‡	1,94 (1,59 – 2,14)	123 (120,5 – 134,75)	4,45 (4,22 – 5,1)	15 (14,15 – 16,85)	5,9 (4,85 – 6,42)	5 (5 – 5)
AL-X		2,68 (2,59 – 2,69)	2 (1,92 – 2,24)	133,5 (128 – 135)	4,6 (4,1 – 5,15)	16,35 (15,02 – 16,87)	5,65 (5,12 – 5,87)	5 (4 – 5)
AH-X		2,69 (2,63 – 2,7)	2,03 (1,88 – 2,35)	135 (130 – 136)	4,9 (4,1 – 5,4)	16,1 (13,8 – 16,7)	6,5 (6,4 – 7,1)	5 (4 – 5)
X		2,64 (2,61 – 2,68)	2,01 (1,97 – 2,13)	134 (127 – 135)	4,4 (3,9 – 5)	14,7 (13,2 – 16,5)	5,9 (5,4 – 7)	5 (4 – 6)
Kruskal-Wallis †	$\chi 2$	15,77	10,07	4,967	1,767	9,297	9,25	5,507
	p	0,015	0,121	0,538	0,939	0,157	0,159	0,372

*Kratice: K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja.

† Parametri dobiveni Kruskal-Wallis statističkim testom uz Dunnov *post hoc* i Bonferronijevu korekciju p vrijednosti. Vrijednosti u tablici prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon).

‡ $p < 0,05$ u odnosu na K

Tablica 5.3 Analiza proteinskog sastava seruma u ispitivanih životinja.

		Količine mjerenih proteina u serumu (medijan (IQ25 – IQ75)))						
Skupina*		ALP U/L	ALT U/L	AMI U/L	KRE µmol/L	ALB g/L	GLO g/L	UP g/L
K		58 (45,75 – 79,5)	58 (45,75 – 79,5)	486,5 (432,25 – 567,5)	39 (31,5 – 48,75)	53 (50,25 – 55,5)	11 (9,75 – 14)	65,5 (62,75 – 67)
OV		106 (70,5 – 151)	106 (70,5 – 151)	470 (414,5 – 527,5)	34 (30 – 44,5)	46 (41 – 50,5)	15 (10 – 17,5)	60 (57 – 62,5)
AL		68 (54 – 71)	68 (54 – 71) ‖	456 (434 – 479)	42 (36 – 44)	49 (47 – 51)	12 (11 – 15)	61 (59 – 63)
AH		85 (69 – 132,5)	20 (13,75 – 23,5) §	496,5 (477,5 – 553,5)	18 (18 – 25,5)	49,5 (47 – 50,75) ‡	11 (10 – 12)	59 (58 – 61,5) ‡
AL-X		73,5 (65,5 – 95,75)	73,5 (65,5 – 95,75) ‖**	453,5 (405,25 – 531,75)	49 (37,5 – 60,5) ‖	48,5 (46 – 50,75)	12 (11 – 15)	61 (58,75 – 61,75)
AH-X		75 (69 – 86)	75 (69 – 86) ‖**	528 (441 – 543)	43 (31 – 50)	47 (46 – 48)	12 (10 – 14)	60 (56 – 61) ‡
X		93 (85 – 142) ‡	28 (21 – 31) §	469 (442 – 520)	49 (49 – 72) ‖	47 (46 – 49)	11 (10 – 13,5)	59 (59 – 62)
Kruskal-Wallis †	$\chi 2$	14,14	36,11	5,489	16,73	14	6,575	17,3
	p	0,028	0,003	0,483	0,01	0,028	0,347	0,008

*Kratice: K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinja koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. ALP – alkalna fosfataza, ALT – alanin aminotransferaza, AMI – amilaza, KRE – kreatinin, ALB – albumin, GLO – globulini i UP – ukupne koncentracije proteina

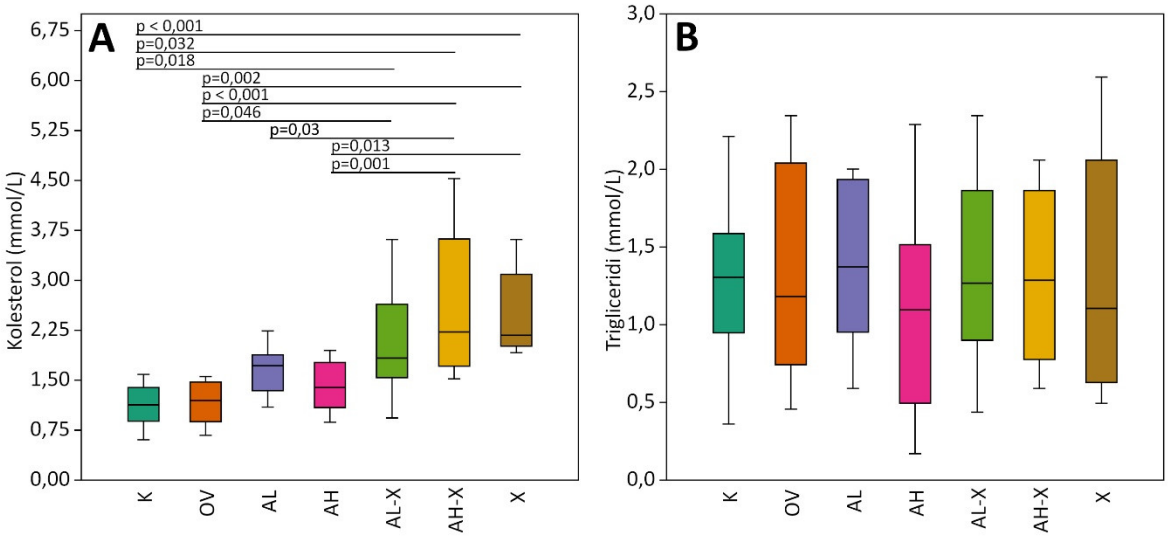
†Parametri dobiveni Kruskal-Wallis statističkim testom uz Dunnov *post hoc* i Bonferronijevu korekciju p vrijednosti. Vrijednosti u tablici prikazane su kao medijan (interkvartilni raspon).

‡p < 0,05 u odnosu na K; §p < 0,05 u odnosu na OV; ‖p < 0,05 u odnosu na AH; **p < 0,05 u odnosu na X59

5.2.3 Kolesterol i trigliceridi u serumu

Rezultati ukupnog kolesterola (p = 0,001) i ukupnih triglicerida (p = 0,97) u serumu dobivenih one-way ANOVA testom i Tukey-Kramer *post hoc* testom prikazani su na slici 5.2.

Sve skupine koje su primale ekstrakt hmelja imale su značajno povišene koncentracije kolesterola u odnosu na ostale skupine. Skupina koja je primala samo ekstrakt hmelja imala je značajno povišene koncentracije kolesterola u odnosu na kontrolnu skupinu, ovarijektomiranu netretiranu skupinu i skupinu koja je primala visoku dozu alendronata. Skupina koja je primala visoke doze alendronata uz ekstrakt hmelja imala je značajno višu razinu kolesterola spram skupine koja je primala samo visoku dozu alendronata, a razina kolesterola u toj skupini također je bila značajno viša spram skupine koja je primala nisku dozu alendronata, ovarijektomirane netretirane skupine i zdrave kontrolne skupine. Skupina koja je primala niske doze alendronata i ekstrakt hmelja ima nešto nižu razinu kolesterola spram ostalih skupina koje su primale ekstrakt hmelja, iako ne značajno, dok je spram ovarijektomirane netretirane skupine i zdrave kontrolne skupine razina kolesterola bila značajno povišena. Razine triglicerida nisu se značajno razlikovale između skupina.



Slika 5.2 Koncentracije kolesterola (A) i triglicerida (B) u serumu. K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su one-way ANOVA analizom uz Tukey-Kramer *post hoc* test, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

5.3 Analiza kvalitete kosti

5.3.1 Mikro računalna tomografija

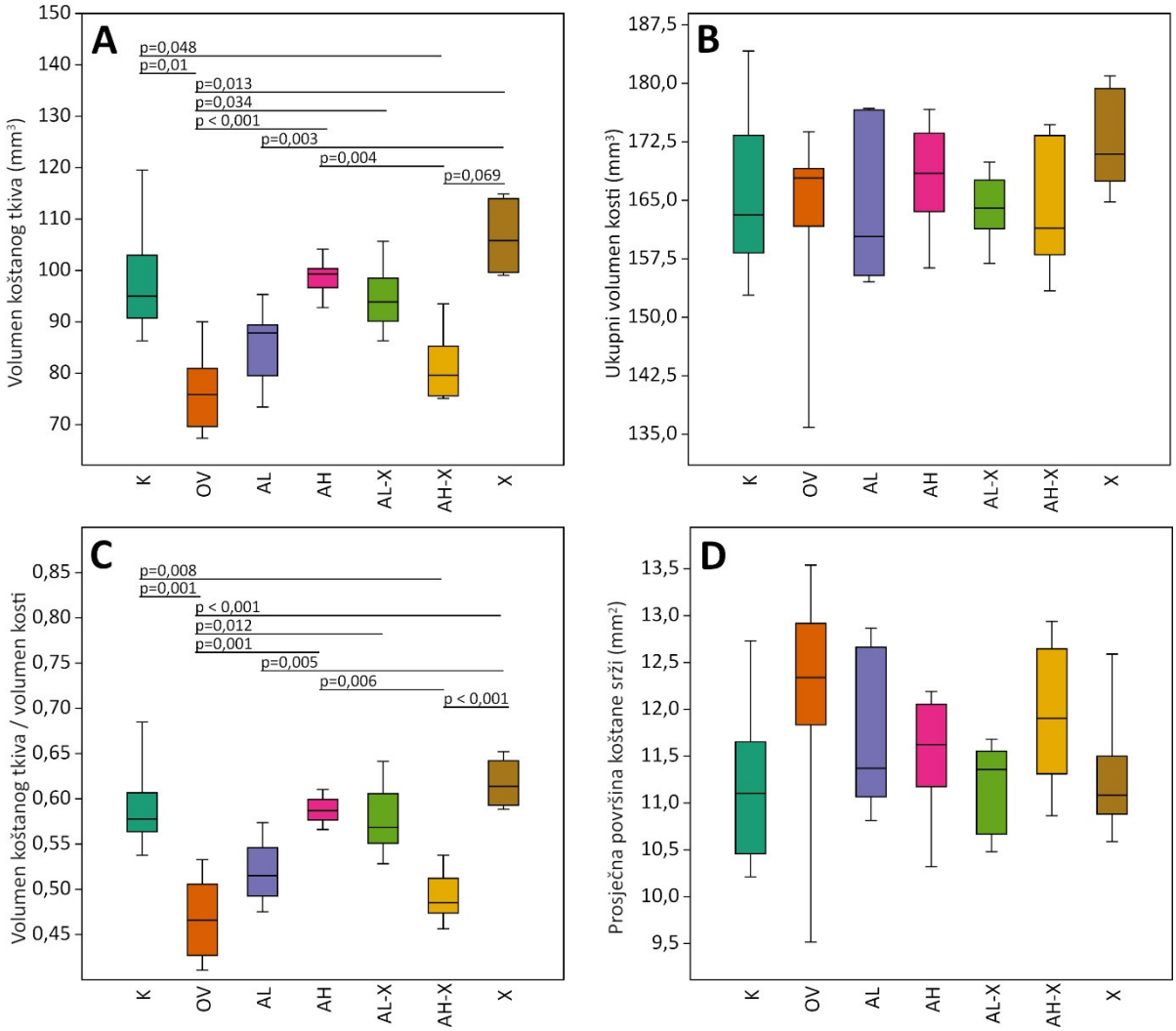
Sve izmjerene odrednice koje opisuju promjene unutar distalne epifize bedrene kosti analizirane su Kruskal-Wallis testom (Tablica 5.4) uz Dunnov *post hoc* i Bonferronijevu korekciju p vrijednosti za usporedbu između skupina. Odrednice su podijeljene u opće mjere kosti, mjere koštanih ovojnica, mjere kompaktne kosti i mjere spužvaste kosti.

Rezultati analize općih mjera kosti prikazani su na slici 5.3. Ukupni volumen mjerenog dijela bedrene kosti bio je jednak. Udio volumena koštanog tkiva unutar mjerenog volumena kosti (Slika 5.3 C) bio je značajno snižen u ovarijektomiranoj netretiranoj skupini spram zdrave kontrolne skupine životinja. Također je bio značajno niži u odnosu na ovarijektomiranu skupinu koja je primala visoke doze alendronata, skupinu koja je primala samo ekstrakt hmelja i skupinu koja je primala kombinaciju niske doze alendronata i ekstrakt hmelja. Osim toga, udio volumena koštanog tkiva u volumenu mjerene kosti bio je značajno je niži u skupini koja je primala kombinaciju visoke doze alendronata i ekstrakt hmelja spram zdrave kontrolne skupine, skupine koja je primala samo visoku dozu alendronata, a i skupine koja je primala samo ekstrakt hmelja. Skupina koja je primala samo nisku dozu alendronata imala je manji udio koštanog tkiva u ukupnom volumenu kosti spram skupine koja je primala samo ekstrakt hmelja. Statistički značajne razlike apsolutnih vrijednosti volumena koštanog tkiva pronađene su između istih između skupina kao i za omjer udjela volumena koštanog tkiva u ukupnom volumenu kosti (Slika 5.3 A).

Tablica 5.4 Vrijednosti odrednica dobivenih analizom strukture kosti pomoću mikro računalne tomografije.

	BV	TV	BV/TV	Ma.Ar	Ps.Pm	Ps.S3D	Ec.Pm
$\chi 2$	44,5	8,104	47.01	13.64	14.48	14.11	49.75
p	< 0,001	0,23	< 0,001	0,034	0,025	0,028	< 0,001
Odrednice*	Ec.S3D	Ct.Ar	Tt.Ar	Ct.Ar/Tt.Ar	Ct.Th	Tb.Sp	Tb.Th
$\chi 2$	50,58	46,68	9,198	47,24	24,8	7,578	49,51
p	< 0,001	< 0,001	0,162	< 0,001	< 0,001	0,27	< 0,001

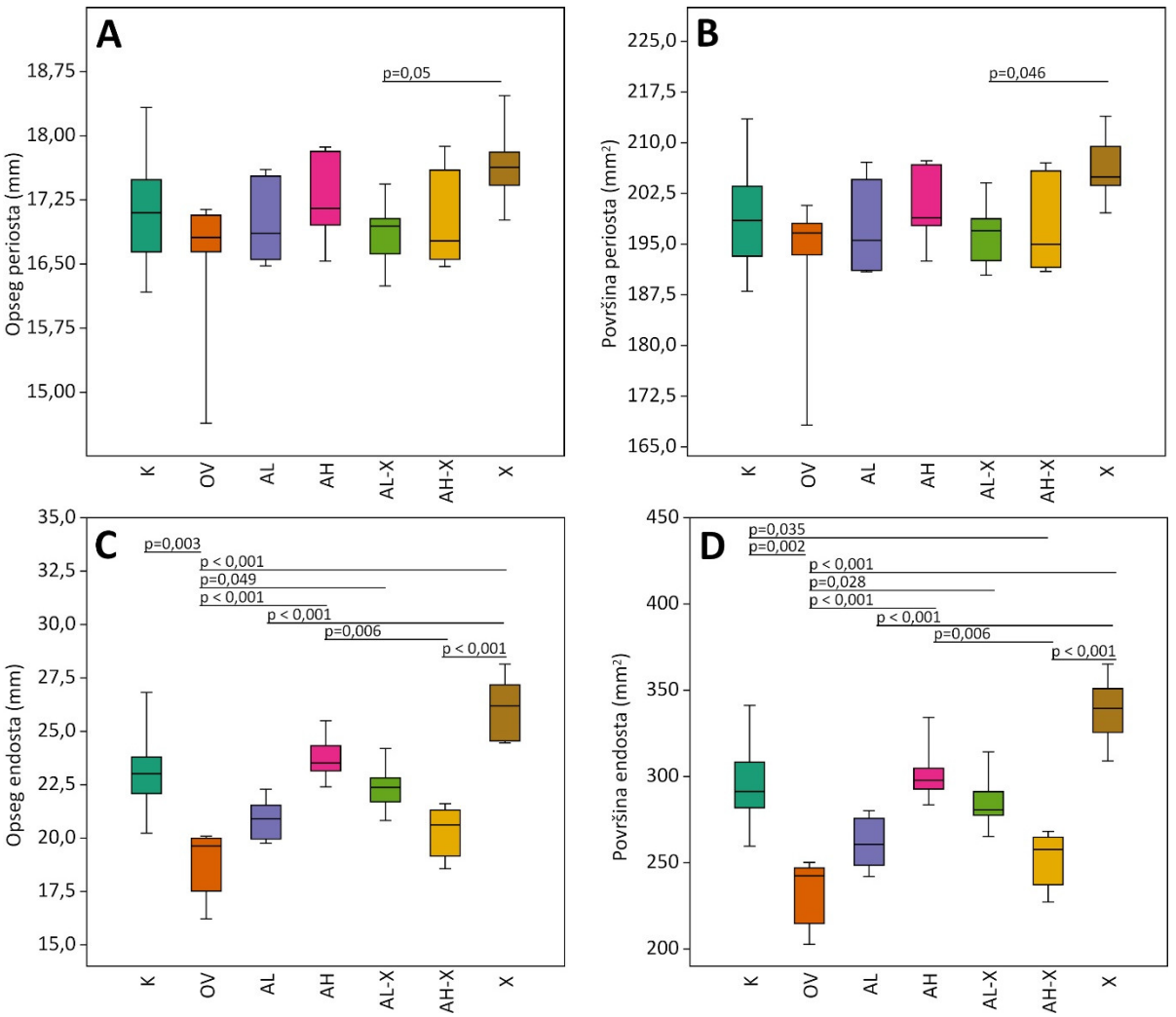
*Kratice: BV – volumen koštanog tkiva, TV – ukupni volumen kosti, BV/TV udio volumena koštanog tkiva u volumenu kosti, Ma.Ar – prosječna površina koštane srži, Ps.Pm – opseg periosta, Ps.S3D – površina periosta, Ec.Pm – opseg endosta, Ec.S3D – površina endosta, Ct.Ar – prosječna površina kompaktne kosti, Tt.Ar – prosječna površina poprečnog presjeka kosti, Ct.Ar/Tt.Ar – udio površine kompaktne kosti u površini poprečnog presjeka kosti, Ct.Th – prosječna debljina kompaktne kosti, Tb.Sp – prosječna udaljenost između koštanih gredica i Tb.Th – prosječna debljina koštane gredice



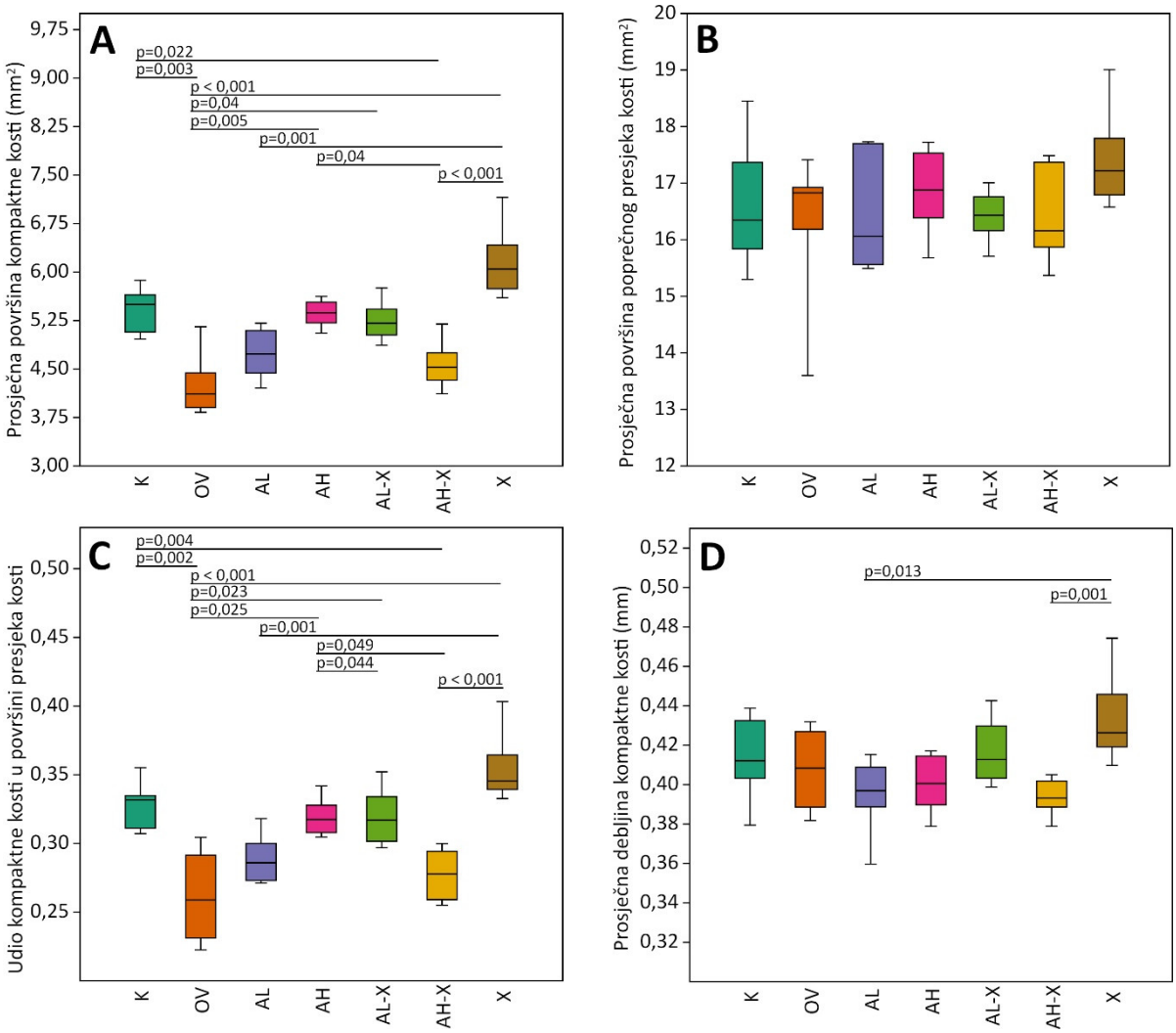
Slika 5.3 Rezultati analiza općih mjera koštanog tkiva. Prikazan je apsolutni volumen koštanog tkiva (A), ukupni volumen mjerene kosti (B), omjer volumena koštanog tkiva i ukupnog volumena kosti (C) i prosječna površina poprečnog presjeka koštane srži (D). K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su Kruskal-Wallis testom uz Dunnov *post hoc* test i Bonferronijevu korekciju p vrijednosti, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

Na slici 5.4 prikazani su rezultati analize promjena u ovojnicama kosti. Opseg periosta bio je značajno veći u skupini koja je primala samo ekstrakt hmelja u odnosu na skupinu koja je primala nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja dok je u ostalim skupinama opseg bio ujednačen. Statistički značajna razlika vidljiva je i u površini periosta u istih skupina. Opseg endosta bio je značajno niži u ovarijektomiranoj netretiranoj skupini u odnosu na kontrolnu skupinu, skupinu koja je primala samo ekstrakt hmelja, skupinu koja je primala nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja i skupinu koja je primala visoku dozu alendronata. Skupina koja je primala samo ekstrakt hmelja imala je viši opseg periosta u odnosu na skupinu koja je primala nisku dozu alendronata i skupinu koja je primala visoku dozu alendronata, a skupina koja je primala visoku dozu alendronata u odnosu na skupinu tretiranu kombinacijom visoke doze alendronata i ekstrakta hmelja. Značajne promjene u površini endosta prate rezultate analize opsega, a uz već spomenute promjene, kontrolna skupina imala je veću vrijednost površine endosta spram skupine koja je primala visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja.

Analiza promjena u kompaktnoj kosti prikazana je na slici 5.5. Prosječna površina kompaktne kosti bila je značajno veća u skupini koja je primala samo ekstrakt hmelja u odnosu na skupinu koja je primala kombinaciju visoke doze alendronata i ekstrakt hmelja, skupinu koja je primala nisku dozu alendronata i ovarijektomiranu netretiranu skupinu. Također, zdrava kontrola imala je statistički veću površinu kompaktne kosti u odnosu na ovarijektomiranu netretiranu skupinu i skupinu koja je primala visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja. Ovarijektomirana netretirana skupina imala je nižu površinu kompaktne kosti spram skupine koja je primala nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja i skupinu koja je primala visoku dozu alendronata. U odnosu na skupinu koja je primala visoku dozu alendronata, površina kompaktne kosti bila je povišena u skupini koja je primala visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja. Prosječna površina kompletnog presjeka kroz kost nije se značajno razlikovala između skupina. Razlike u udjelu kompaktne kosti u prosječnoj površini bile su značajne između istih skupina kao i prosječna površina kompaktne kosti s tim da je i skupina koja je primala nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja imala značajno viši udio kompaktne kosti u odnosu na skupinu koja je primala visoku dozu alendronata. Prosječna debljina kompaktne kosti bila je značajno veća u skupini koja je primala samo ekstrakt hmelja u odnosu na skupinu koja je primala visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja i skupinu koja je primala nisku dozu alendronata.

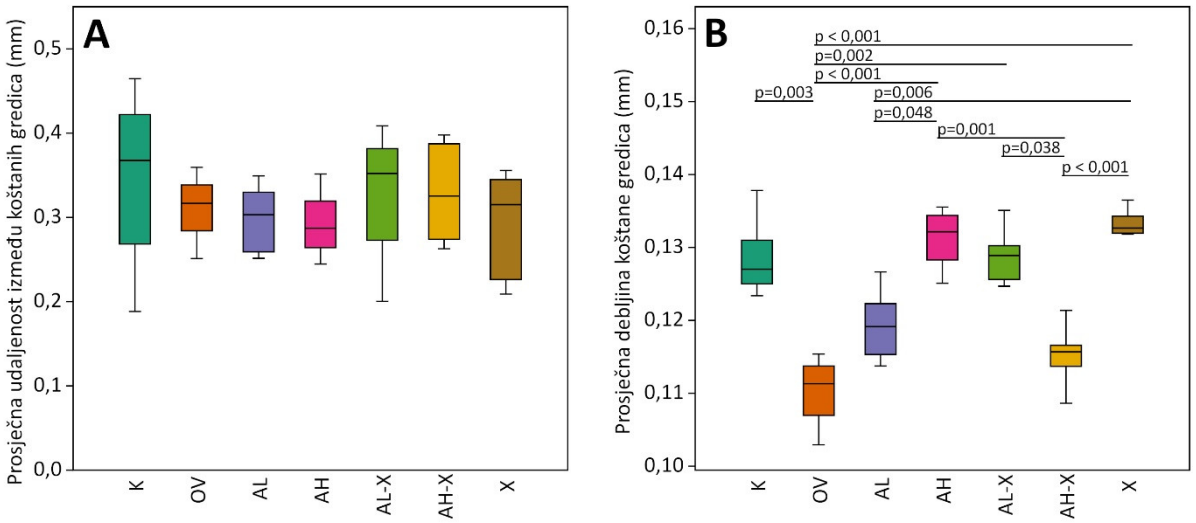


Slika 5.4 Rezultati analize mjera ovojnica kosti. Prikazani su opseg periosta (A), površina periosta (B), opseg endosta (C) i površina periosta (D). K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su Kruskal-Wallis testom uz Dunnov *post hoc* test i Bonferronijevu korekciju p vrijednosti, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.



Slika 5.5 Rezultati analize mjera kompaktne kosti. Prikazana je prosječna površina kompaktne kosti (A), prosječna površina poprečnog presjeka kroz kost (B), udio kompaktne kosti u površini presjeka kosti (C) i prosječna debljina kompaktne kosti (D). K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su Kruskal-Wallis testom uz Dunnov *post hoc* test i Bonferronijevu korekciju p vrijednosti, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

Razlike u građi spužvaste kosti prikazane su na slici 5.6. Prosječna udaljenost između koštanih gredica nije se značajno razlikovala između skupina. Prosječna debljina koštanih gredica ovarijektomirane netretirane skupine je značajno niža spram većine skupina (K, X, AL-X, AH). Također, skupina koja je primala nisku dozu alendronata imala je značajno tanje koštane gredice u odnosu na skupinu koja je primala visoku dozu alendronata i skupinu koja je primala samo ekstrakt hmelja. Značajno tanje koštane gredice također su pronađene u skupini koja je primala visoke doze alendronata i ekstrakt hmelja u odnosu na skupinu koja je primala visoku dozu alendronata, skupinu koja je primala nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, kao i skupinu koja je primala samo ekstrakt hmelja.

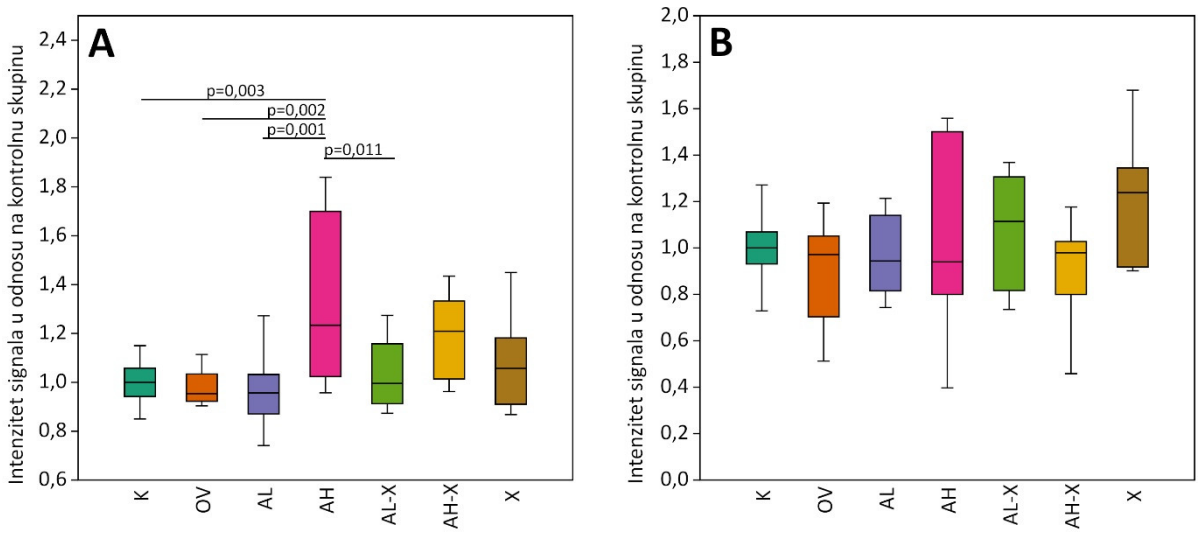


Slika 5.6 Rezultati analize mjera spužvaste kosti. Prikazana je prosječna udaljenost između koštanih gredica (A) i prosječna debljina koštane gredice (B). K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su Kruskal-Wallis testom uz Dunnov *post hoc* test i Bonferronijevu korekciju p vrijednosti, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

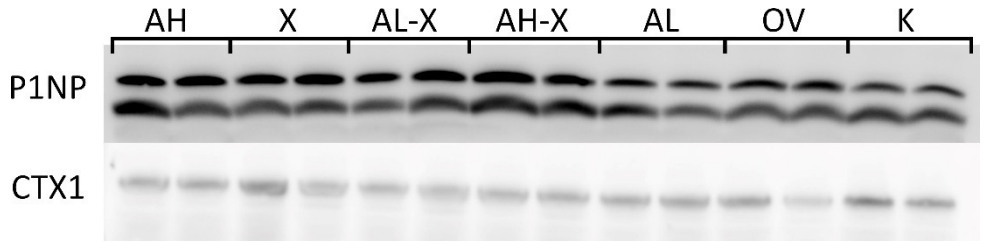
5.3.2 Western blot analiza serumskih biljega pregradnje kosti

Iz digitalnih fotografija membrana kvantificiran je intenzitet signala analiziranih serumskih biljega pregradnje kosti: N-terminalnog propeptida prokolagena tipa 1 (P1NP) i karboksi terminalnog križno povezanog telopeptida kolagena tipa 1 (CTX1). Dobiveni intenzitet je normaliziran i izražen u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu životinja. Rezultati su analizirani korištenjem one-way ANOVA testa (P1NP: F = 3,876, df = 27,19, p = 0,006; CTX1: F = 1,717, df = 27,14, p = 0,155) uz Tukey-Kramer *post hoc* za usporedbu među skupinama.

Dobiveni rezultati prikazani su na slici 5.7. U skupini koja je primala visoku dozu alendronata, količine P1NP bile su značajno više u odnosu na većinu skupina (K, OV, AL, AL-X). Vrijednosti CTX1 nisu se značajno razlikovale između skupina. Digitalne fotografije membrana prikazane su na slici 5.8.



Slika 5.7 Rezultati Western blot analize serumskih biljega pregradnje kosti: N-terminalnog propeptida prokolagena tipa 1 – P1NP (A) i karboksi terminalnog križno povezanog telopeptida kolagena tipa 1 – CTX1 (B). K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su one-way ANOVA analizom uz Tukey-Kramer *post hoc* test, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.



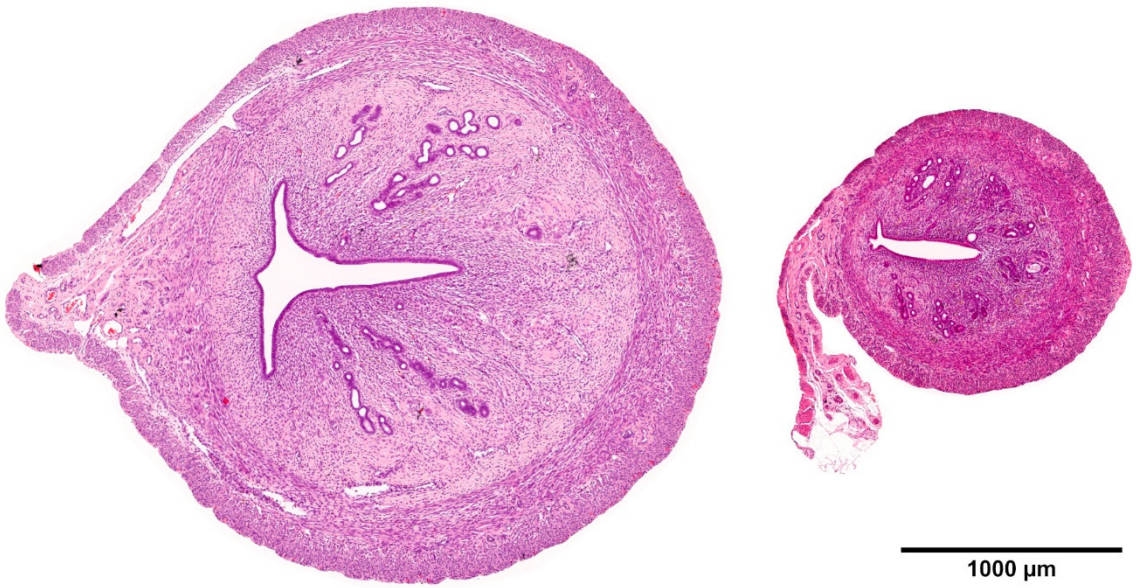
Slika 5.8 Digitalna fotografija reprezentativnih membrana dobivenih prilikom western blot analize serumskih biljega pregradnje kosti: N-terminalnog propeptida prokolagena tipa 1 (P1NP) i karboksi terminalnog križno povezanog telopeptida kolagena tipa 1 (CTX1). AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, OV – ovarijektomirane netretirane životinje i K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija).

5.4 Rezultati histološke analize uzorkovanih organa

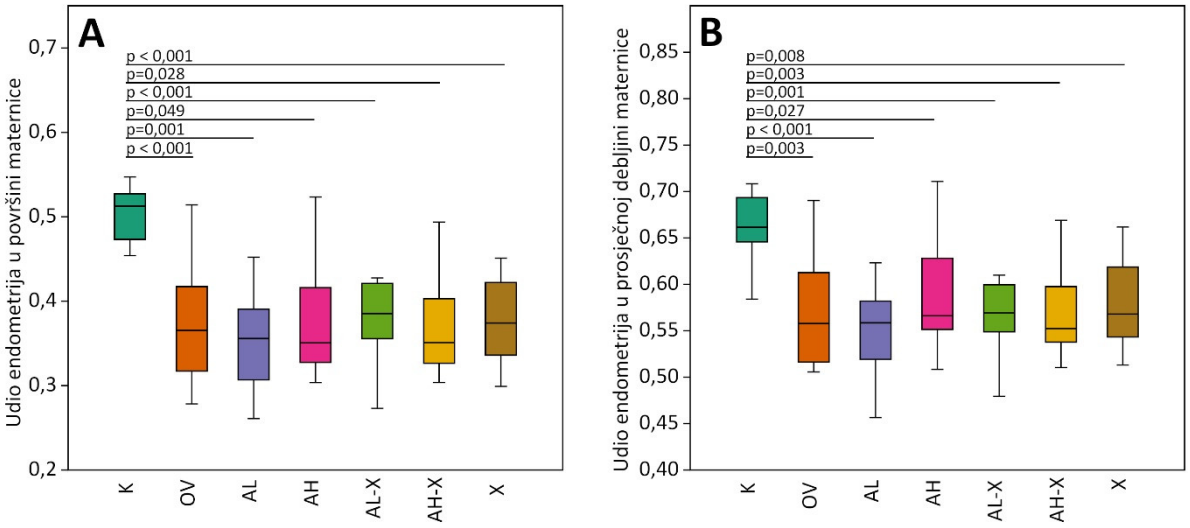
5.4.1 Histomorfometrijska analiza maternice

Analiza udjela endometrija u površini poprečnog presjeka kroz maternicu i udjela prosječne debljine endometrija u debljini stjenke cijele maternice izvršena je u svrhu procjene fitoestrogenog utjecaja ispitivanih tvari na tkiva ovisna o estrogenu. Pregledom slika, bila je jasno vidljiva razlika između veličine maternica životinja kontrolne skupine na kojima je izvršena placebo operacija i ovarijektomiranih skupina, koje su međusobno bile slične veličine. Primjer usporedbe poprečnog presjeka kroz organ prikazan je na slici 5.9.

Analiza izmjerenih udjela površina ($p = 0,001$) i udjela debljine endometrija ($p < 0,001$) izvršena je korištenjem one-way ANOVA testa uz Tukey-Kramer *post hoc* za usporedbu između skupina (Slika 5.10). Udio endometrija u ukupnoj površini maternice bio je značajno veći kod kontrolne skupine spram svih ostalih skupina, a ovarijektomirane skupine se nisu međusobno razlikovale. Udio endometrija u prosječnoj debljini maternice bio je također veći u kontrolnoj skupini spram svih ovarijektomiranih skupina, koje se međusobno nisu značajno razlikovale.



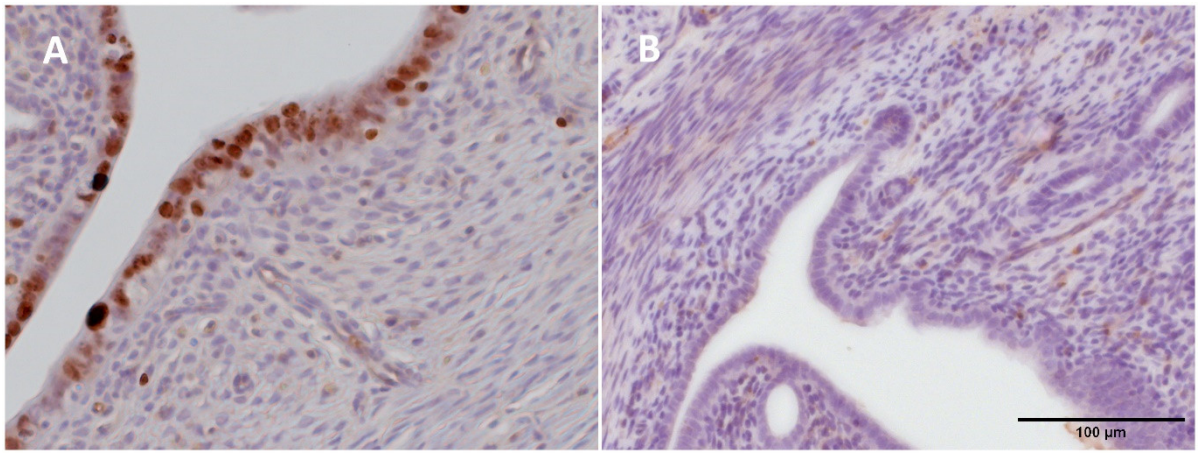
Slika 5.9 Prikaz razlike u veličini poprečnog presjeka kroz maternice zdrave kontrolne skupine (lijevo) i ovarijektomirane netretirane skupine (desno). Bojenje hemalaun i eozin, objektiv 20×, Mjerilo: 1000 µm.



Slika 5.10 Rezultati analize udjela površine endometrija u ukupnoj površini maternice (A) i udjela prosječne debljine endometrija u prosječnoj debljini maternice (B). K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su one-way ANOVA analizom uz Tukey-Kramer *post hoc* test, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

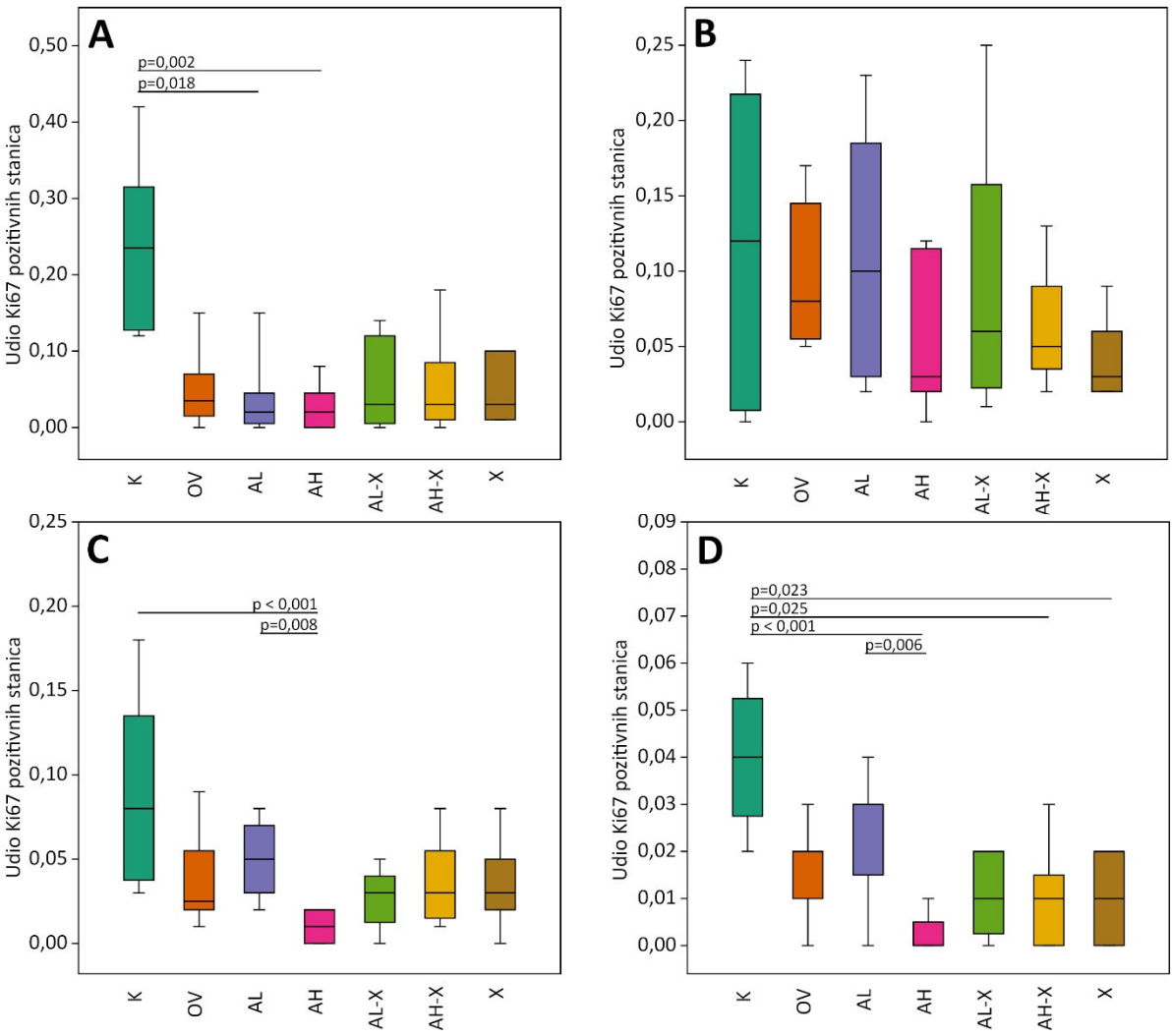
5.4.2 Imunohistokemijska analiza biljega proliferacije Ki67 u tkivu maternice

Analiza stanja proliferacije stanica u tkivu maternice izvršena je imunohistokemijskim bojenjem na Ki67 i računanjem udjela pozitivnih stanica (Slika 5.11). Rezultati su analizirani Kruskal-Wallis testom u epitelu lumena (χ^2 = 16,68, p = 0,01), epitelu žlijezda (χ^2 = 6,146, p = 0,402), stromi endometrija (χ^2 = 20,78, p = 0,002) i u miometriju (χ^2 = 26,39, p<0,001). Razlike između skupina testirane su Tukey-Kramer *post hoc* testom uz Bonferronijevu korekciju p vrijednosti i prikazani na slici 5.12.



Slika 5.11 Primjer preparata maternice imunohistokemijski obojenog na antigen Ki67 (A) i negativne kontrole (B). Na slici A su jasno vidljive stanice u epitelu lumena pozitivne na Ki67. Objektiv 20 ×, Mjerilo: 100 µm.

Udio stanica pozitivnih na Ki67 u epitelu lumena kontrolne skupine bio je veći u odnosu na sve skupine, a značajno veći u odnosu na obje skupine koje su primale samo alendronat (AL i AH). Imunohistokemijski izražaj Ki67 u epitelu žlijezda se nije značajno razlikovao između skupina. Skupina koja je primala visoku dozu alendronata imala je značajno niži udio stanica pozitivnih na Ki67 u stromi u odnosu na skupinu koja je primala nisku dozu alendronata i zdravu kontrolnu skupinu životinja. Udio pozitivnih stanica u miometriju bio je veći u zdravoj kontrolnoj skupini spram tri skupine (AH, AH-X, X), a u skupini koja je primala nisku dozu alendronata bio je značajno veći spram skupine koja je primala visoku dozu alendronata.

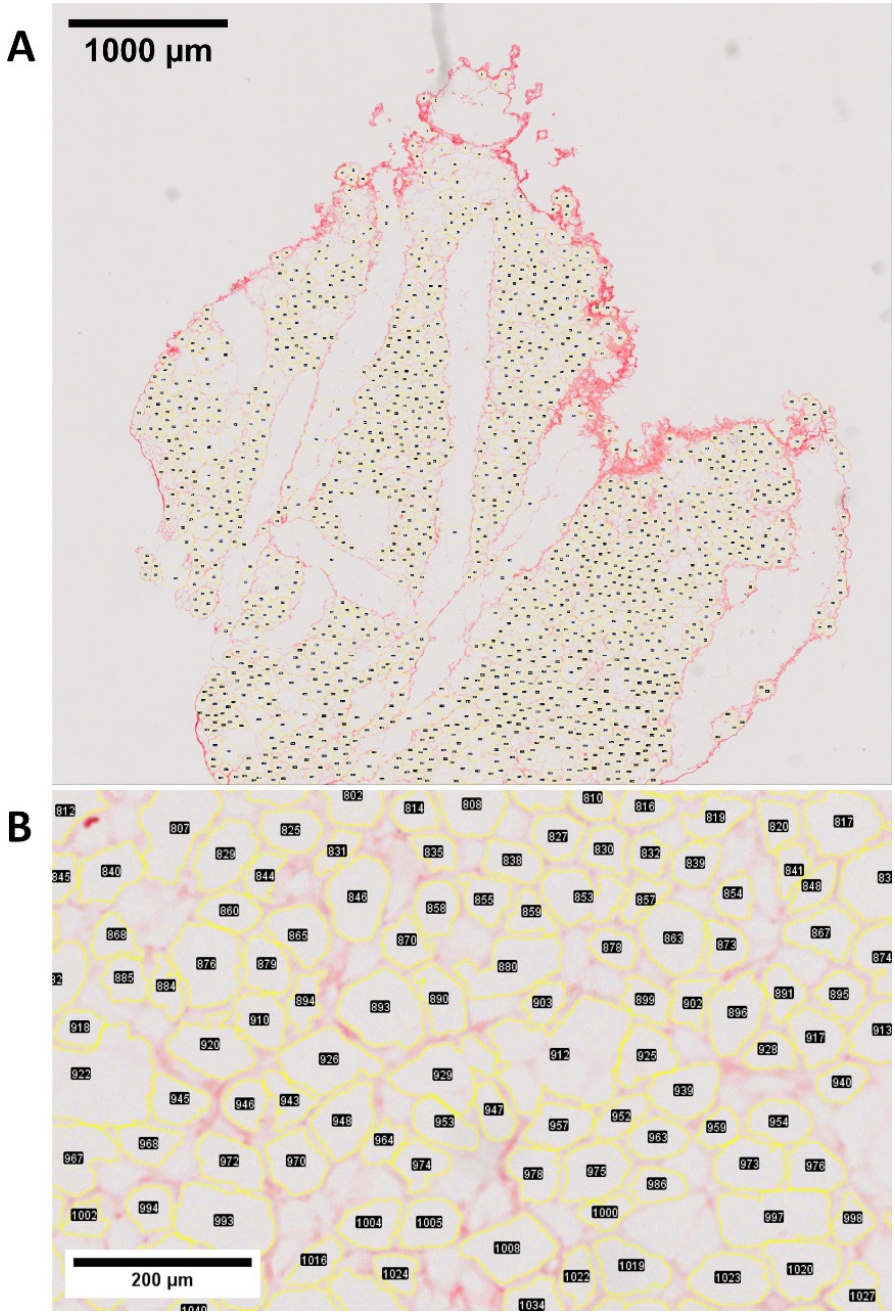


Slika 5.12 Rezultati analize udjela stanica pozitivnih na Ki67 u epitelu lumena (A), epitelu žlijezda (B), stromi endometrija (C) i miometriju (D). K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su Kruskal-Wallis testom uz Dunnov *post hoc* test i Bonferronijevu korekciju p vrijednosti, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

5.4.3 Histomorfometrijska analiza perigonadalnog masnog tkiva

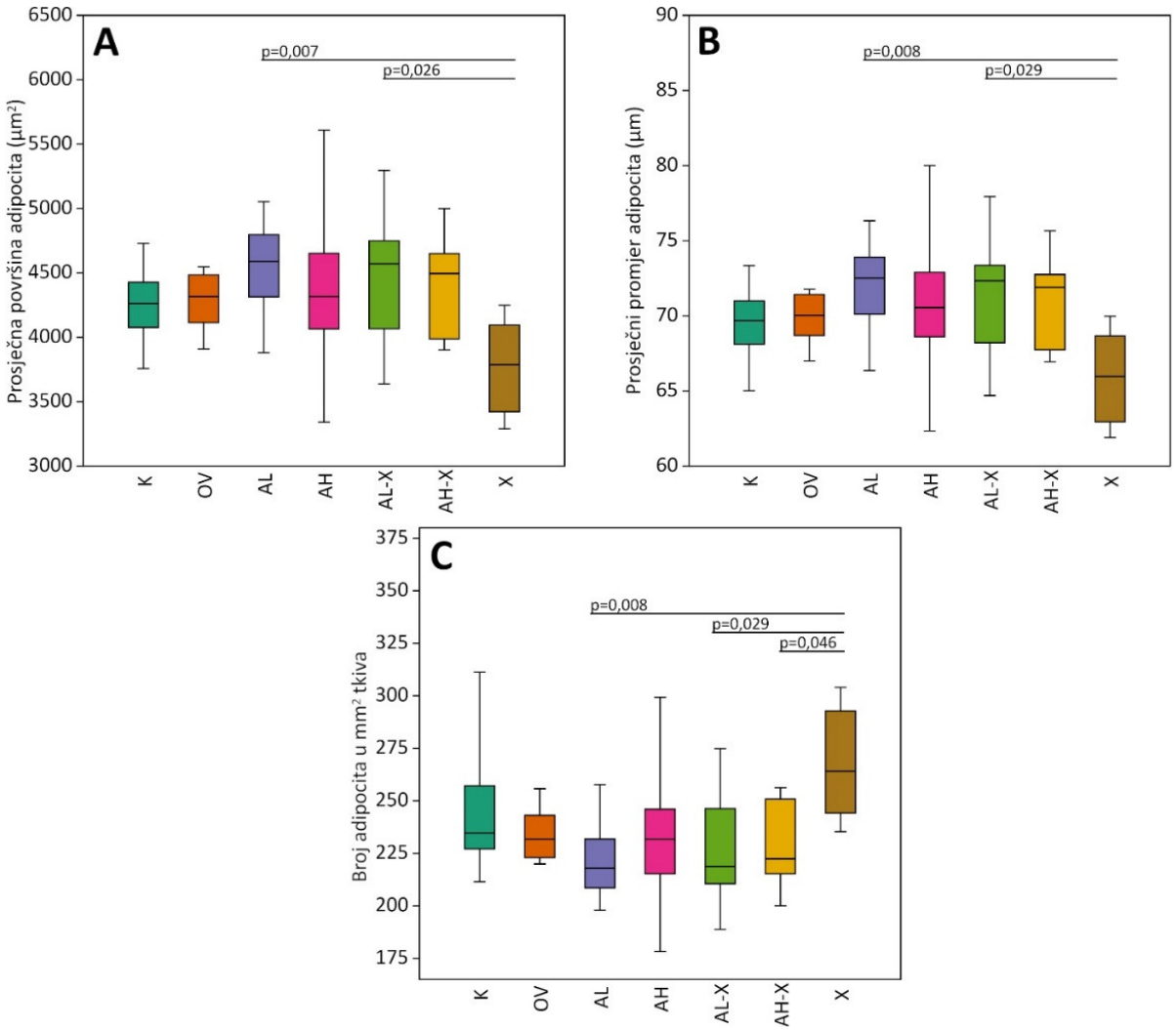
Na presjecima kroz perigonadalno masno tkivo, uz korištenje dodatka *Adiposoft* za programski paket FIJI identificirani su adipociti prisutni u cijelom preparatu (Slika 5.13) te su izmjerene površine adipocita (μm^2), brojnost adipocita i promjer adipocita kao promjer kruga ekvivalentne površine (μm). Iz dobivenih mjera izračunata je brojnost adipocita po površini

tkiva (/mm^2). Rezultati su analizirani korištenjem one-way ANOVA testa, a skupine su međusobno uspoređene Tukey-Kramer *post hoc* testom (Slika 5.14). Rezultati ANOVA testa: prosječna površina adipocita: p = 0,016, prosječni promjer adipocita: p = 0,016 i brojnost adipocita po površini tkiva: p = 0,013.



Slika 5.13 Primjer označenih adipocita perigonadalnog masnog tkiva nakon analize dodatkom *Adiposoft* u programu FIJI. Na slici je prikazan cijeli presjek kroz preparat perigonadalnog masnog tkiva (A) i dio te fotografije s obilježenim adipocitima (B). Crni pravokutnici označavaju svaki prepoznati adipocit, a žute linije omeđuju njegovu površinu. Bojenje pikrosirijus crvenilo, objektiv 10 ×, Mjerilo: 1000 µm (A), odnosno 200 µm (B).

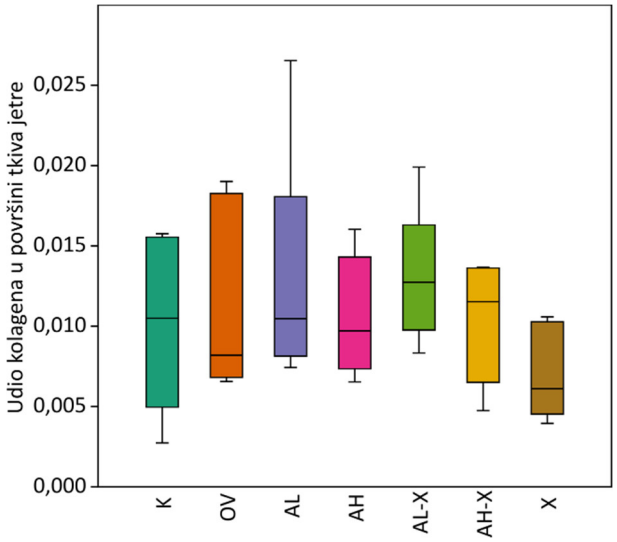
Prosječna površina adipocita bila je niža u skupini koja je primala samo ekstrakt hmelja u odnosu na sve skupine, a statistički značajno niža u odnosu na skupinu koja je primala nisku dozu alendronata i skupinu koja je primala nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja. Sukladno tome, prosječni promjer adipocita je također bio manji u skupini koja je primala ekstrakt hmelja u odnosu na iste skupine. Broj adipocita po milimetru kvadratnom tkiva bio je veći u skupini koja je primala ekstrakt hmelja u odnosu na dvije već navedene skupine, ali i spram skupine koja je primala visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja.



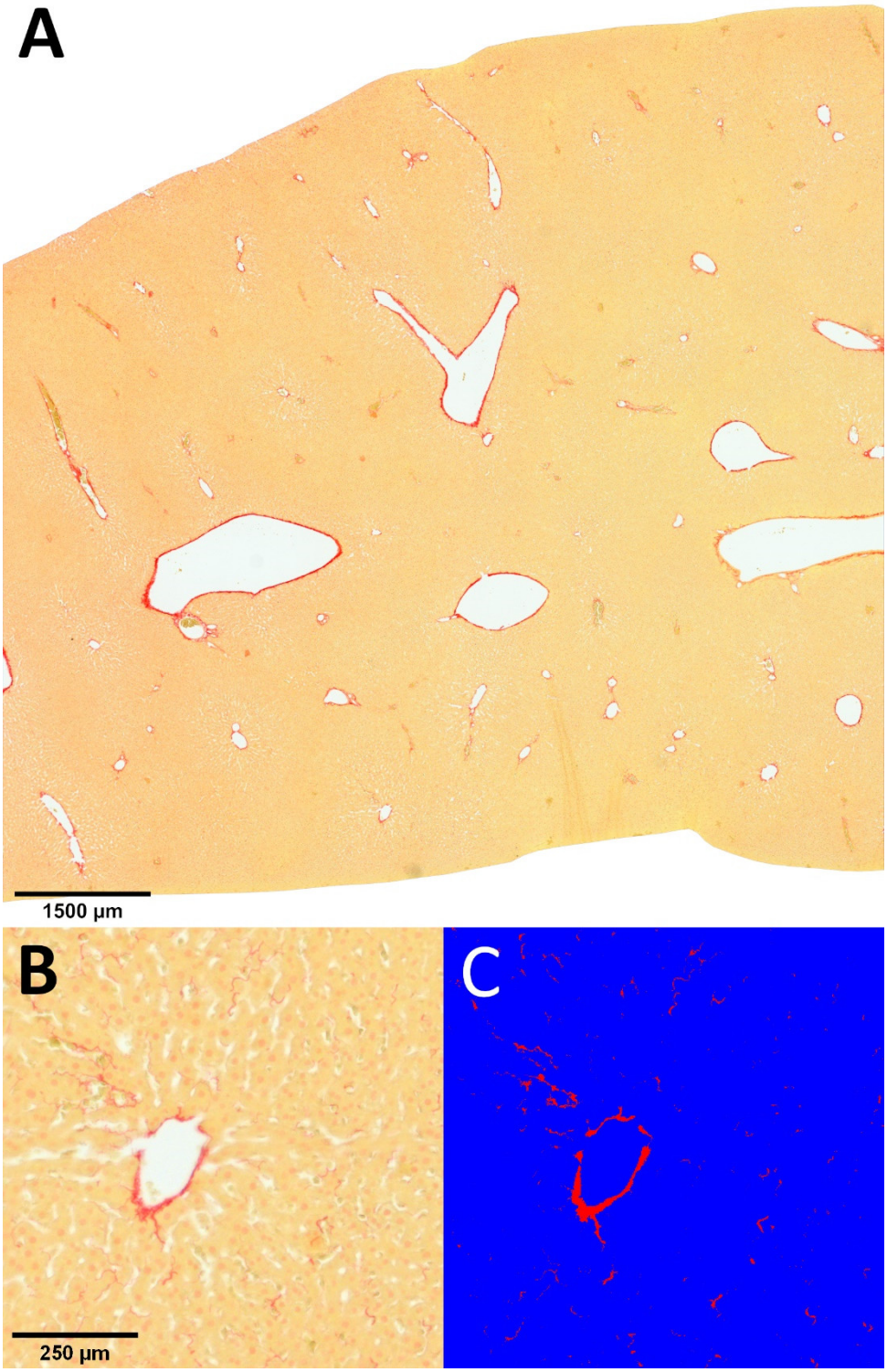
Slika 5.14 Rezultati analize stanica perigonadalnog masnog tkiva. Slika prikazuje prosječne površine adipocita (A), prosječni promjer adipocita (B) i broj adipocita u površini tkiva (C). K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su one-way ANOVA analizom uz Tukey-Kramer *post hoc* test, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

5.4.4 Udio kolagena u tkivu jetre

Na presjecima kroz tkivo jetre računalno su izmjerene površine fotografiranog tkiva i kolagena. Dobivene vrijednosti izražene su kao udio kolagena u ukupnoj površini tkiva jetre. Rezultati su analizirani one-way ANOVA testom (p = 0,513) uz Tukey-Kramer *post hoc* za usporedbu među skupinama. Udio kolagena u tkivu jetre nije se značajno razlikovao među skupinama (Slika 5.15). Na slici 5.16 prikazan je primjer analiziranog preparata jetre i maska pripremljena u programu GIMP.



Slika 5.15 Rezultati analize udjela kolagena u tkivu jetre. K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su ANOVA analizom uz Tukey-Kramer *post hoc* test. Nisu pronađene značajne razlike među skupinama. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.



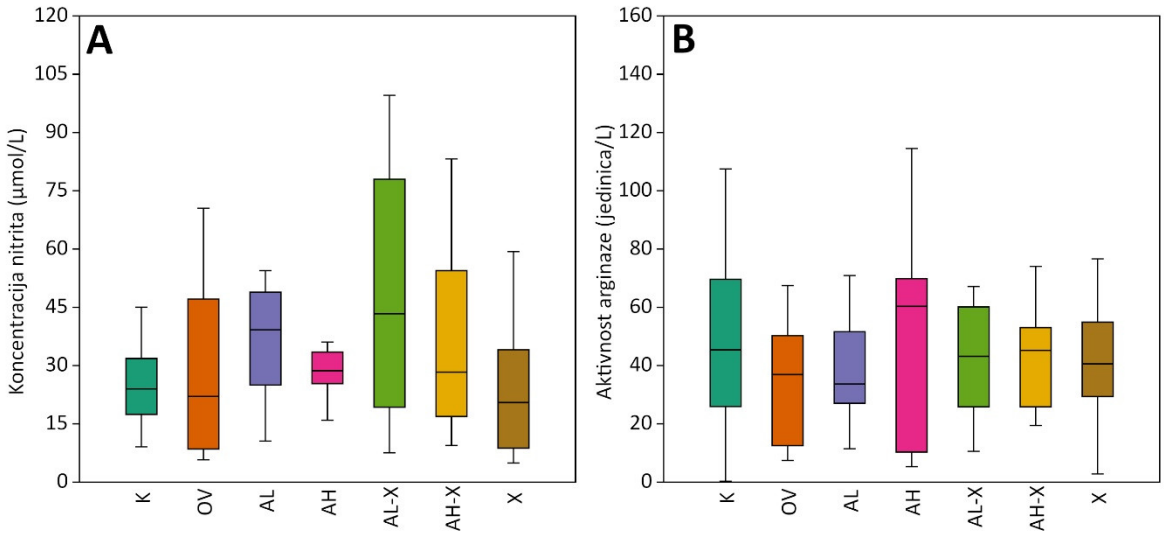
Slika 5.16 Primjer analize histološkog preparata jetre radi dobivanja udjela kolagena u tkivu. Slika prikazuje cijelu površinu analiziranog tkiva (A), povećani detalj tkiva (B) i dio maske iz programa GIMP (C) koji odgovara tkivu na slici (B). Na masci je kolagen obojen crveno, a ostatak preparata plavo. Bojenje pikrosirius crveno, objektiv 20 ×, mjerilo 1500 µm, odnosno 250 µm.

5.5 Oksidativni stres

5.5.1 Dušikov oksid i aktivnost arginaze u serumu

Koncentracija dušikova oksida u serumu mjerena je kroz koncentracije nitrita. Rezultati mjerenja obrađeni su one-way ANOVA statističkim testom (F = 1,137, df = 23,99, p = 0,3713) i Tukey-Kramer *post hoc* testa za usporedbu među skupinama. Koncentracije dušikova oksida nisu se značajno razlikovale između skupina (Slika 5.17 A).

Aktivnost arginaze u serumu izražena je u obliku jedinica arginaze po litri. Dobiveni rezultati analizirani su korištenjem one-way ANOVA testa (p = 0,867) i Tukey-Kramer *post hoc* testa za usporedbu između skupina. Aktivnost arginaze između skupina nije se statistički značajno razlikovala (Slika 5.17 B).

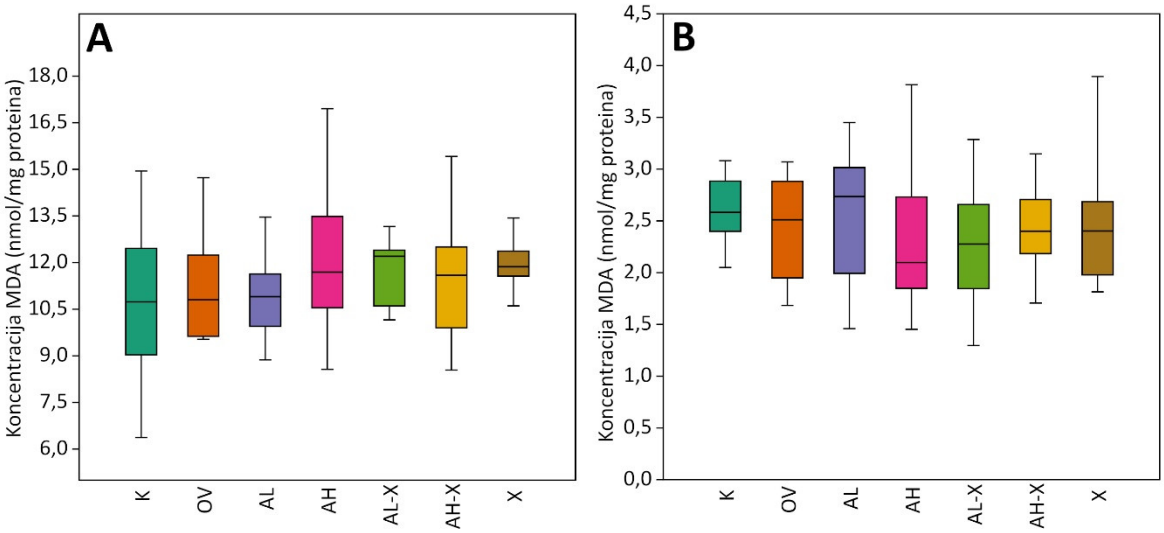


Slika 5.17. Rezultati analize koncentracije nitrita (A) i aktivnost arginaze (B) u serumu. K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su one-way ANOVA analizom uz Tukey-Kramer *post hoc* test. Nisu zabilježene statistički značajne razlike među skupinama. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

5.5.2 Stupanj lipidne peroksidacije

Stupanj lipidne peroksidacije analiziran je mjerenjem količina MDA u tkivu jetre i bubrega. Koncentracije MDA izražene su u obliku nanomola po litri (nmol/L) i normalizirane prema ukupnim proteinima u tkivu (nmol/mg proteina). Rezultati su analizirani korištenjem one-way

ANOVA testa za tkivo jetre (p = 0,595) i bubrega (p = 0,749), a razlike između skupina testirane su Tukey-Kramer *post hoc* testom. Ni u tkivu jetre ni u tkivu bubrega nisu zabilježene značajne razlike u količini prisutnog MDA (Slika 5.18).

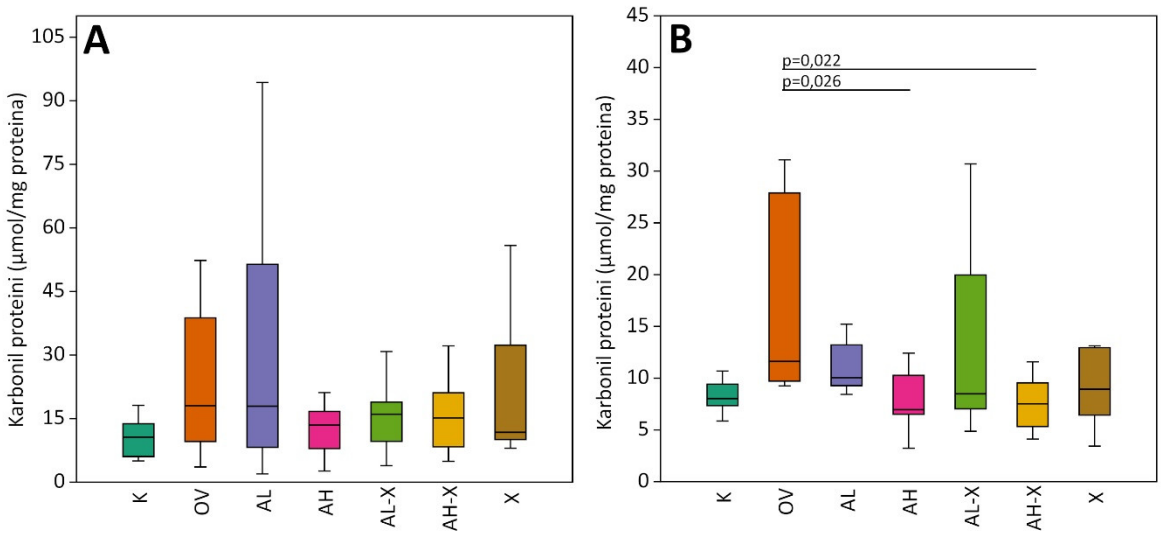


Slika 5.18 Rezultati analize stupnja lipidne peroksidacije mjerenjem koncentracije prisutnog malondialdehida (MDA) u tkivu jetre (A) i bubrega (B). K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su one-way ANOVA analizom uz Tukey-Kramer *post hoc* test. Nisu zabilježene statistički značajne razlike među skupinama. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

5.5.3 Količina karbonil proteina

Količine karbonil proteina analizirane su korištenjem Kruskal-Wallis testa na mjerenjima dobivenim iz uzoraka jetre (χ^2 = 5,781, p = 0,448) i bubrega (χ^2 = 18,76, p = 0,004). Razlike među skupina testirane su Dunnovim *post hoc* testom uz Bonferronijevu korekciju p vrijednosti i prikazani na slici 5.19.

U uzorcima jetre nisu zabilježene značajne razlike u količini karbonil proteina između ispitivanih skupina. Količina karbonil proteina u bubregu bila je značajno povišena u odnosu na obje skupine koje su primale visoku dozu alendronata.

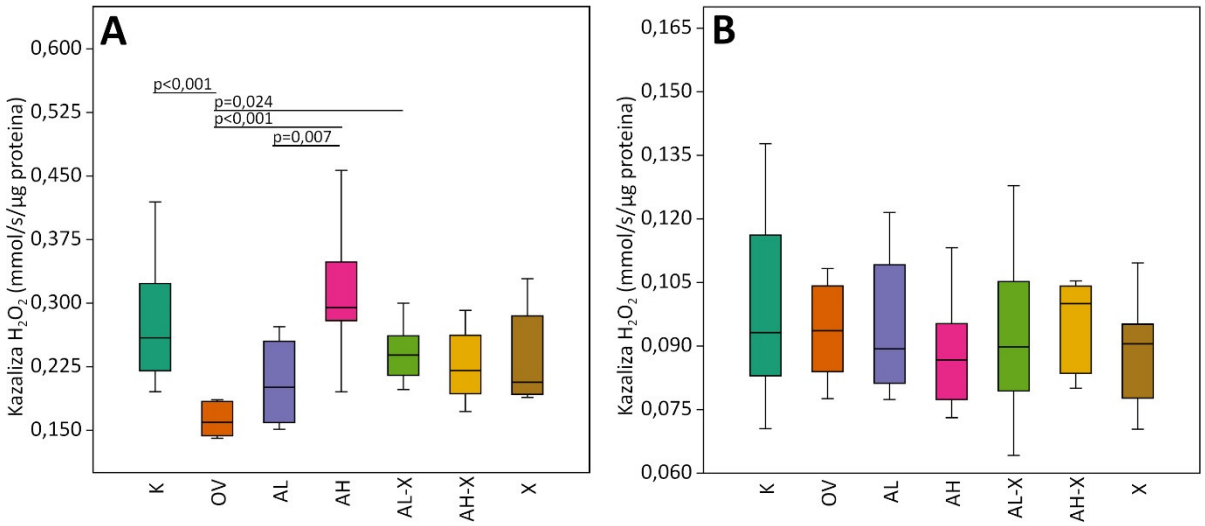


Slika 5.19 Rezultati analize karbonil proteina prisutnih u tkivu jetre (A) i bubrega (B). K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su Kruskal-Wallis testom uz Dunnov *post hoc* test i Bonferronijevu korekciju p vrijednosti, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

5.5.4 Aktivnost katalaze

Aktivnost katalaze dobivena je mjerenjem brzine razgradnje vodikova peroksida i normalizirana prema ukupnim tkivnim proteinima. Statistička analiza rezultata izvršena je korištenjem Kruskal-Wallis testa za vrijednosti izmjerene u tkivu jetre ($\chi^2 = 32,49$, $p = 0,013$) i bubrega ($\chi^2 = 3,456$, $p = 0,75$). Skupine su međusobno uspoređene Dunnovim *post hoc* testom uz Bonferronijevu korekciju p vrijednosti i prikazane na slici 5.20.

Aktivnost katalaze u tkivu jetre (Slika 5.20 A) bila je statistički značajno niža u ovarijektomiranoj netretiranoj skupini životinja spram 3 skupine (K, AH i AL-X). Također je zabilježena niža aktivnost katalaze u skupini koja je primala nisku dozu alendronata u odnosu na skupinu koja je primala visoku dozu alendronata. Aktivnost katalaze u tkivu bubrega (Slika 5.20 B) nije se razlikovala značajno među skupinama.

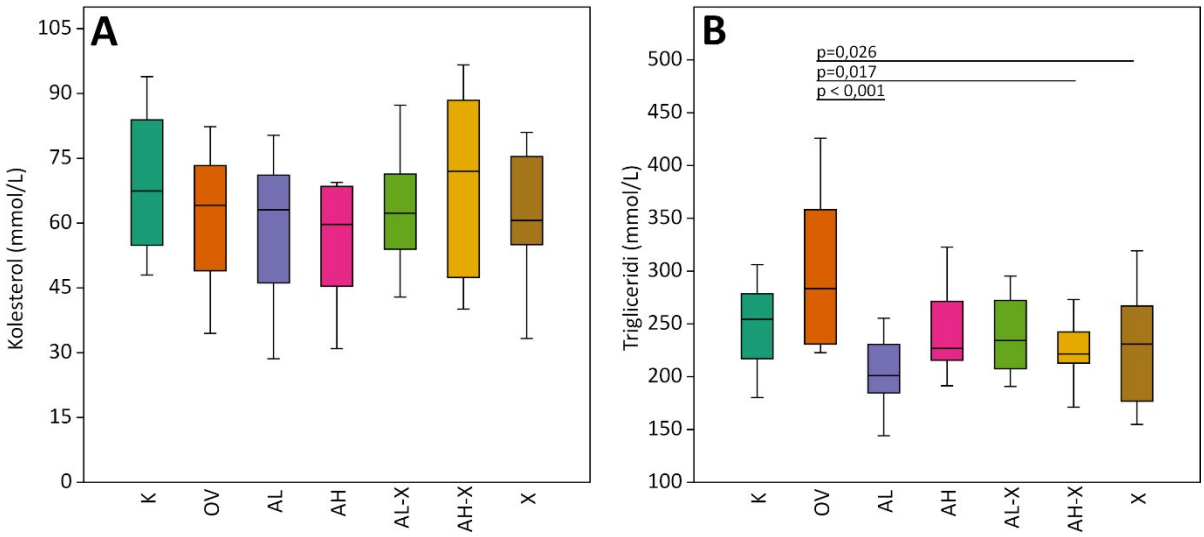


Slika 5.20 Aktivnost katalaze u tkivu jetre (A) i tkivu bubrega (B) mjerena brzinom razgradnje vodikova peroksida i normalizirana prema ukupnim tkivnim proteinima. K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su Kruskal-Wallis testom uz Dunnov *post hoc* test i Bonferronijevu korekciju p vrijednosti, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

5.5.5 Količina kolesterola i triglicerida u tkivu jetre

Rezultati mjerenja koncentracije ukupnog kolesterola ($F = 0,8221$, $df = 26,55$, $p = 0,5629$) i ukupnih triglicerida ($F = 2,696$, $df = 26,62$, $p = 0,03537$) u tkivu jetre analizirani su korištenjem one-way ANOVA testa. Razlike između skupina analizirane su korištenjem Tukey-Kramer *post hoc* testa i prikazane na slici 5.21.

Koncentracija kolesterola u tkivu jetre se nije značajno razlikovala između skupina. Koncentracije triglicerida bile su značajno povišene u ovarijektomiranoj netretiranoj skupini u odnosu na tri skupine (AL, AH-X i X).



Slika 5.21 Koncentracije kolesterola (A) i triglicerida (B) u tkivu jetre. K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja. Razlike među skupinama testirane su one-way ANOVA analizom uz Tukey-Kramer *post hoc* test, a značajne razlike među skupinama prikazane su na slici. Horizontalna linija: medijan; kutija: interkvartilni raspon; vertikalne linije s graničnikom: minimum i maksimum.

5.6 MALDI-TOF masena spektrometrija

5.6.1 Jetra

Značajne promjene u metabolitima aminokiselina u tkivu jetre u odnosu na kontrolnu skupinu i netretiranu ovarijektomiranu skupinu prikazane su u tablici 5.5. Netretirana ovarijektomirana skupina životinja imala je značajno više razine S-adenozilmetioninamina u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. Metaboliti aminokiselina u jetri bili su promijenjeni u većini skupina koje su primale alendronat (AH, AL-X, AH-X) u odnosu na kontrolnu skupinu. Skupine AH, AL-X i AH-X imale su povišene razine L-histidina u odnosu na skupinu K. D-lizopin bio je snižen u skupina AH, AL-X i X u odnosu na skupinu K. β-alanil-N(pi)-metil-L-histidin bio je snižen u skupina AL-X, AH-X i X u odnosu na skupinu K, a u odnosu na skupinu OV bio je snižen osim kod istih skupina i u skupini AL. Razine N-(L-arginino)sukcinata bile su snižene u skupinama AH, AL-X, AH-X i X u odnosu na skupinu K, a u odnosu na skupinu OV u skupinama AH, AL-X i X. 5-S-cisteinil-DOPA povišen je u skupini AL-X u odnosu na skupine K i OV. Količine tiroksina bile su povišene u AL-X u odnosu na skupinu OV. Skupina koja je primala samo ekstrakt hmelja ima znatno snižene količine

prikazanih metabolita aminokiselina u odnosu na ovarijektomiranu netretiranu i kontrolnu skupinu životinja. D-lizopin, β-alanil-N(pi)-metil-L-histidin, N-(L-arginino)sukcinat i tiroksin u skupini X sniženi su u odnosu na skupine K i OV.

Tablica 5.5 Prikaz značajno promijenjenih metabolita aminokiselina u tkivu jetre dobivenih MALDI-TOF-MS analizom i identifikacijom u bazi KEGG.

	Identifikatori			Eksperimentalna skupina (p vrijednost (t-statistika))†					
RS*	KEGG ID	m/z	Naziv	OV	AL	AH	AL-X	AH-X	X
K	C00135	214,1	L-histidin			0,021 (2,672)	0,001 (4,045)	0,027 (2,453)	
	C04020	236,2	D-lizopin			0,026 (-2,601)	0,028 (-2,687)		0,020 (-2,878)
	C01262	258,2	β-alanil-N(pi)-metil-L-histidin				0,036 (-2,394)	0,040 (-2,312)	0,028 (-2,505)
	C03406	308,2	N-(L-arginino)sukcinat			0,001 (-4,413)	0,003 (-4,321)	0,005 (-3,795)	0,003 (-4,002)
	C01137	356,2	S-adenozilmetioninamin	0,049 (2,167)					
	C17935	315,1	5-S-cisteinil-DOPA				0,010 (3,047)		
	C01829	835,7	tiroksin						0,007 (-3,165)
OV	C01262	258,2	β-alanil-N(pi)-metil-L-histidin		0,043 (-2,379)		0,025 (-2,732)	0,026 (-2,692)	0,021 (-2,813)
	C03406	308,2	N-(L-arginino)sukcinat			0,018 (-2,908)	0,028 (-2,742)		0,033 (-2,558)
	C17935	315,1	5-S-cisteinil-DOPA				0,018 (2,655)		
	C01829	835,7	tiroksin				0,037 (2,377)		0,012 (-2,872)

*Kratice: RS – referentna skupina (s kojom su uspoređene ispitivane skupine), K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja.

†Rezultati studentovog t-testa (usporedba eksperimentalnih skupina s referentnim skupinama).†Rezultati studentovog t-testa (usporedba eksperimentalnih skupina s referentnim skupinama).

Značajne promjene u metabolitima masti u tkivu jetre u odnosu na kontrolnu skupinu i netretiranu ovarijektomiranu skupinu prikazane su u tablici 5.6. Zdrava kontrolna skupina i ovarijektomirana netretirana skupina nisu se razlikovale. Metaboliti masti u tkivu jetre značajno su bili sniženi u svih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu osim stearinske kiseline. U odnosu na ovarijektomiranu netretiranu skupinu životinja većina metabolita je bila snižena kod tretiranih skupina osim stearinske kiseline, arahidonske kiseline i 2,3-dinor-8-izo prostaglandina F2α. Razine dekanske kiseline bile su snižene u skupinama AL, AH, AL-X i AH-X u odnosu na skupinu K i skupinama AH i AL-X u odnosu na skupinu OV. Palmitinska

kiselina bila je snižena u skupinama AH, AL-X i AH-X u odnosu na skupine K i OV. Miristinska kiselina bila je snižena u skupini AL-X u odnosu na skupinu OV. Stearinska kiselina bila je povišena u skupini AH u odnosu na skupine K i OV, a arahidonska kiselina i 2,3-dinor-8-izo prostaglandin F2α u skupini AL-X u odnosu na skupinu OV. U skupini AH osim navedenog, L-palmitoil karnitin i eikozenoinska kiselina bili su niži u odnosu na skupine K i OV. Eikozenoinska kiselina je također bila snižena i u skupini AH-X u odnosu na skupinu K. Skupina koja je primala samo ekstrakt hmelja imala je snižene vrijednosti dekanske kiselina, palmitinske kiseline i eikozenoinske kiseline u odnosu na skupine K i OV.

Tablica 5.6 Prikaz značajno promijenjenih metabolita masti u tkivu jetre dobivenih MALDI-TOF-MS analizom i identifikacijom u bazi KEGG.

	Identifikatori			Eksperimentalna skupina (p vrijednost (t-statistika))†					
RS*	KEGG ID	m/z	Naziv	OV	AL	AH	AL-X	AH-X	X
K	C01571	231,2	dekanska kiselina		0,043 (-2,230)	< 0,001 (-7,023)	< 0,001 (-6,085)	0,032 (-2,415)	< 0,001 (-7,023)
	C00249	257,2	palmitinska kiselina			0,023 (-2,576)	0,010 (-3,370)	0,013 (-3,269)	0,007 (-3,559)
	C01530	283,3	stearinska kiselina			< 0,001 (5,862)			
	C16526	309,3	eikozenoinska kiselina			0,012 (-3,251)		0,029 (-2,623)	0,014 (-3,116)
	C02990	434,3	L-palmitoil karnitin			0,047 (-2,308)			
OV	C01571	231,2	dekanska kiselina			0,001 (-5,077)	0,001 (-4,192)		0,001 (-5,077)
	C06424	251,2	miristinska kiselina				0,040 (-2,465)		
	C00249	257,2	palmitinska kiselina			0,017 (-2,687)	0,003 (-4,019)	0,005 (-3,923)	0,002 (-4,267)
	C01530	283,3	stearinska kiselina			< 0,001 (5,862)			
	C06425	293,3	arahidonska kiselina				0,011 (2,920)		
	C14794	307,2	2,3-dinor-8-izo prostaglandin F2α				0,009 (3,335)		
	C16526	309,3	eikozenoinska kiselina			0,036 (-2,470)			0,049 (-2,236)
	C02990	434,3	L-palmitoil karnitin			0,044 (-2,371)			

*Kratice: RS – referentna skupina (s kojom su uspoređene ispitivane skupine), K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja.

†Rezultati studentovog t-testa (usporedba eksperimentalnih skupina s referentnim skupinama).

Značajne promjene u glicerofosfolipidima, glikosfingolipidima i sfingolipidima u tkivu jetre u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu i netretiranu ovarijektomiranu skupinu prikazane su u tablici 5.7. Nisu uočene značajne razlike u sastavu navedenih tvari između ovarijektomirane netretirane skupine i zdrave kontrolne skupine životinja. Količine sfinganina bile su značajno niže u skupini AH u odnosu na skupine K i OV, a u skupini AL-X i AH-X značajno povišene u odnosu na skupinu K. Metabolit glicerofosfolipida 3-(O-geranilgeranil)-sn-glicerol 1-fosfat značajno je snižen u skupini AH u odnosu na skupine K i OV, a metabolit 2,3-bis-O-(geranilgeranil)-sn-glicero-1-fosfo-L-serin bio je niži u skupini AL-X u odnosu na skupinu K. Skupina koja je primala samo ekstrakt hmelja imala je niže razine galaktozil-sfingozina, 2,3-bis-(O-ftanil)-sn-glicerol 1-fosfata u odnosu na skupinu K. U odnosu na skupinu OV, ista skupina imala je snižene razine galaktozil-sfingozina, 3-(O-geranilgeranil)-sn-glicerol 1-fosfata i 2,3-bis-(O-ftanil)-sn-glicerol 1-fosfata.

Tablica 5.7 Prikaz značajno promijenjenih glicerofosfolipida, glikosfingolipida i sfingolipida u tkivu jetre dobivenih MALDI-TOF-MS analizom i identifikacijom u bazi KEGG.

	Identifikatori			Eksperimentalna skupina (p vrijednost (t-statistika))†					
RS*	KEGG ID	m/z	Naziv	OV	AL	AH	AL-X	AH-X	X
K	C00836	360,3	sfinganin			< 0,001 (-5,518)	0,021 (2,819)	0,018 (2,879)	
	C01747	444,3	galaktozil-sfingozin						< 0,001 (-5,460)
	C04590	445,3	3-(O-geranilgeranil)-sn-glicerol 1-fosfat			< 0,001 (-4,498)			
	C20518	791,7	2,3-bis-(O-ftanil)-sn-glicerol 1-fosfat			0,022 (-2,553)		0,042 (-2,230)	< 0,001 (-5,577)
	C20466	821,6	2,3-bis-O-(geranilgeranil)-sn-glicero-1-fosfo-L-serin				0,033 (-2,469)		
OV	C00836	360,3	sfinganin			0,003 (-4,230)			
	C01747	444,3	galaktozil-sfingozin						0,004 (-4,191)
	C04590	445,3	3-(O-geranilgeranil)-sn-glicerol 1-fosfat			0,012 (-2,851)			0,040 (-2,333)
	C20518	791,7	2,3-bis-(O-ftanil)-sn-glicerol 1-fosfat						0,001 (-4,011)

*Kratice: RS – referentna skupina (s kojom su uspoređene ispitivane skupine), K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja.

†Rezultati studentovog t-testa (usporedba eksperimentalnih skupina s referentnim skupinama).

Značajne promjene u steroidima i njihovim direktnim metabolitima u tkivu jetre u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu i netretiranu ovarijektomiranu skupinu prikazane su u tablici 5.8. Nisu uočene značajne razlike između netretirane ovarijektomirane skupine i zdrave kontrolne skupine životinja. Skupina AL-X imala je značajno niže razine androstan-3α,17β-diola i estron 3-sulfata u odnosu na skupine K i OV. U odnosu na skupinu OV, razine estron 3-sulfata bile su snižene u skupinama AL, AH, AL-X i AH-X. Estron glukuronid bio je snižen u skupinama AH i AL-X u odnosu na skupinu OV, a 4α-karboksi-stigmasta-7,24(24(1))-dien-3β-ol u skupini AH u odnosu na skupinu OV. Skupina koja je primala samo ekstrakt hmelja imala je niže razine estron 3-sulfata i estron glukuronida u odnosu na skupinu OV.

Tablica 5.8 Prikaz značajno promijenjenih steroida i njihovih direktnih metabolita u tkivu jetre dobivenih MALDI-TOF-MS analizom i identifikacijom u bazi KEGG.

	Identifikatori			Eksperimentalna skupina (p vrijednost (t-statistika))†					
RS*	KEGG ID	m/z	Naziv	OV	AL	AH	AL-X	AH-X	X
K	C03852	310,3	androstan-3α,17β-diol				0,019 (-2,780)		
	C02538	368,2	estron 3-sulfat				0,024 (-2,805)		
OV	C03852	310,3	androstan-3α,17β-diol				0,029 (-2,593)		
	C02538	368,2	estron 3-sulfat		0,035 (-2,463)	0,028 (-2,604)	0,012 (-3,309)	0,011 (-3,395)	0,020 (-2,855)
	C11133	469,2	estron glukuronid			0,003 (-4,379)	0,020 (-2,732)		0,004 (-3,842)
	C22120	515,4	4α-karboksi-stigmasta-7,24(24(1))-dien-3β-ol			0,032 (-2,458)			

*Kratice: RS – referentna skupina (s kojom su uspoređene ispitivane skupine), K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja.

†Rezultati studentovog t-testa (usporedba eksperimentalnih skupina s referentnim skupinama).

Značajne promjene u biljezima oksidativnog stresa u tkivu jetre u odnosu na kontrolnu skupinu i netretiranu ovarijektomiranu skupinu prikazane su u tablici 5.9. Nisu uočene značajne razlike između netretirane ovarijektomirane skupine i zdrave kontrolne skupine životinja. Količine γ-L-glutamil-L-2-aminobutirilglicina snižene su u skupina AH i AL-X u odnosu na skupine K i OV. Razine istog biljega snižene su u skupini AH-X u odnosu na skupinu K, a u skupini koja je primala samo ekstrakt hmelja bile su niže u odnosu na skupine K i OV.

Tablica 5.9 Prikaz značajno promijenjenih biljega oksidativnog stresa u tkivu jetre dobivenih MALDI-TOF-MS analizom i identifikacijom u bazi KEGG.

	Identifikatori			Eksperimentalna skupina (p vrijednost (t-statistika))†					
RS*	KEGG ID	m/z	Naziv	OV	AL	AH	AL-X	AH-X	X
K	C21016	307,2	γ-L-glutamil-L-2-aminobutirilglicin			0,003 (-4,062)	0,004 (-4,050)	0,009 (-3,374)	0,004 (-3,909)
OV	C21016	307,2	γ-L-glutamil-L-2-aminobutirilglicin			0,027 (-2,686)	0,032 (-2,628)		0,034 (-2,548)

*Kratice: RS – referentna skupina (s kojom su uspoređene ispitivane skupine), K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja.
†Rezultati studentovog t-testa (usporedba eksperimentalnih skupina s referentnim skupinama).

5.6.2 Perigonadalno masno tkivo

Značajne promjene u metabolitima aminokiselina u perigonadalnom masnom tkivu u odnosu na kontrolnu skupinu i netretiranu ovarijektomiranu skupinu prikazane su u tablici 5.10. Nisu uočene značajne razlike između netretirane ovarijektomirane skupine i kontrolne skupine životinja. N6-(L-1,3-dikarboksipropil)-L-lizin bio je povišen u skupini AL-X u odnosu na skupinu K, a tiroksin u skupini AH u odnosu na skupine K i OV. Tiroksin je također snižen u skupini AH-X u odnosu na skupinu OV. Skupina koja je primala samo ekstrakt hmelja imala je povišene razine D-lizopina i snižene razine tiroksina u odnosu na skupine K i OV.

Tablica 5.10 Prikaz značajno promijenjenih metabolita aminokiselina u perigonadalnom masnom tkivu dobivenih MALDI-TOF-MS analizom i identifikacijom u KEGG bazi.

	Identifikatori			Eksperimentalna skupina (p vrijednost (t-statistika))†					
RS*	KEGG ID	m/z	Naziv	OV	AL	AH	AL-X	AH-X	X
K	C04020	236,2	D-lizopin						0,011 (3,140)
	C00449	294,2	N6-(L-1,3-dikarboksipropil)-L-lizin				0,011 (3,168)		
	C01829	759,7	tiroksin			0,012 (-3,110)			0,012 (-3,110)
OV	C04020	236,2	D-lizopin						0,011 (3,140)
	C01829	759,7	tiroksin			0,024 (-2,706)		0,027 (-2,624)	0,024 (-2,706)

*Kratice: RS – referentna skupina (s kojom su uspoređene ispitivane skupine), K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja.

†Rezultati studentovog t-testa (usporedba eksperimentalnih skupina s referentnim skupinama).

Značajne promjene u metabolitima masti u perigonadalnom masnom tkivu u odnosu na kontrolnu skupinu i netretiranu ovarijektomiranu skupinu prikazane su u tablici 5.11. Netretirana ovarijektomirana skupina životinja imala je značajno više razine palmitaldehida i 2,3-dinor-8-izo prostaglandina F2α, a snižene razine eikozanoidne kiseline u odnosu na kontrolnu skupinu. Miristinska kiselina bila je snižena u skupini AL u odnosu na skupinu OV. Razine palmitaldehida bile su snižene kod AH i AL-X skupina u odnosu na skupine K i OV. U skupini AH, dekanska kiselina bila je snižena u odnosu na skupinu OV. Eikozanoidna kiselina povišena je u skupini AH i AL-X u odnosu na skupinu K. 2,3-dinor-8-izo prostaglandin F2α snižen je u skupini AH-X u odnosu na skupinu OV. Dok (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-ikozapentaenoinska kiselina je bila snižena u skupinama AH i AH-X u odnosu na skupinu OV, a (15Z)-tetrakozaenoinska kiselina povišena u skupinama AL i AH u odnosu na skupinu K. Razine L-palmitoil karnitina bile su povišene u skupinama AH i AL-X u odnosu na skupine K i OV, a leukotrien D4 bio je povišen u istim skupinama samo u odnosu na skupinu K. Skupina koja je primala samo ekstrakt hmelja imala je povišene razine miristinske kiseline, L-palmitoil karnitina i leukotriena D4 u odnosu na skupine K i OV, a snižene razine eikozanoidne kiseline, 7Z,10Z,13Z,16Z-dokozatetraenoinske kiseline i (15Z)-tetrakozaenoinske kiseline u odnosu na skupinu K. Ista skupina imala je snižene razine dekanske kiseline u odnosu na skupinu OV.

Tablica 5.11 Prikaz značajno promijenjenih metabolita masti u perigonadalnom masnom tkivu dobivenih MALDI-TOF-MS analizom i identifikacijom u KEGG bazi.

	Identifikatori			Eksperimentalna skupina (p vrijednost (t-statistika))†					
RS*	KEGG ID	m/z	Naziv	OV	AL	AH	AL-X	AH-X	X
K	C06424	211,2	miristinska kiselina						0,011 (3,160)
	C00517	221,2	palmitaldehid	0,017 (2,904)		0,005 (-3,654)	0,048 (-2,273)		
	C16525	291,3	eikozanoidna kiselina	0,013 (-2,914)		0,027 (2,633)	0,035 (2,475)		0,008 (-3,323)
	C14794	307,2	2,3-dinor-8-izo prostaglandin F2α	0,040 (2,385)					
	C16527	313,3	7Z,10Z,13Z,16Z-dokozatetraenoinska kiselina						< 0,001 (-5,837)
	C08323	389,3	(15Z)-tetrakozaenoinska kiselina		0,002 (3,844)	0,008 (3,204)			0,001 (-3,970)
	C02990	422,3	L-palmitoil karnitin			0,000 (5,782)	0,007 (3,411)		0,015 (2,977)
	C05951	497,3	leukotrien D4			0,041 (2,368)	0,007 (3,390)		0,013 (3,057)
OV	C06424	211,2	miristinska kiselina		0,010 (-2,872)				0,011 (3,160)
	C00517	221,2	palmitaldehid			0,049 (-2,152)	0,038 (-2,374)		
	C01571	231,2	dekanska kiselina			0,020 (-2,818)			0,020 (-2,818)
	C14794	307,2	2,3-dinor-8-izo prostaglandin F2α					0,044 (-2,335)	
	C06428	320,3	(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-ikozapentaenoinska kiselina			0,008 (-3,222)		0,030 (-2,515)	
	C02990	422,3	L-palmitoil karnitin			0,000 (5,782)	0,007 (3,411)		0,015 (2,977)
	C05951	497,3	leukotrien D4						0,013 (3,057)

*Kratice: RS – referentna skupina (s kojom su uspoređene ispitivane skupine), K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja.

†Rezultati studentovog t-testa (usporedba eksperimentalnih skupina s referentnim skupinama).

Značajne promjene u glicerofosfolipidima, glikosfingolipidima i sfingolipidima u perigonadalnom masnom tkivu u odnosu na kontrolnu skupinu i netretiranu ovarijektomiranu

skupinu prikazane su u tablici 5.12. Netretirana ovarijektomirana skupina životinja imala je značajno niže razine diacetilheptaprenilglicerola u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Razine sfinganin 1-fosfata bile su povišene u skupini AH u odnosu na skupine K i OV, a u skupini AH-X samo u odnosu na skupinu K. Dok razine 3-(O-geranilgeranil)-sn-glicerol 1-fosfata bile su povišene u skupini AH u odnosu na skupine K i OV. U skupini AH su razine diacetilheptaprenilglicerola bile snižene u odnosu na skupine K i OV, a isti metabolit glicerofosfolipida bio je snižen u skupini AL-X samo u odnosu na skupinu K. Skupina AL i AH imale su snižene količine galaktozil-sfingozina u odnosu na skupinu OV. Skupina koja je primala samo ekstrakt hmelja imala je značajno povišene količine fitosfingozina u odnosu na skupine K i OV. Količine sfinganin 1-fosfata bile su povišene u istoj skupini u odnosu na skupine K i OV, a sfingozin 1-fosfaza u odnosu na skupinu K. U istoj skupini, količine diacetilheptapernilglicerola bile su niže u odnosu na skupinu K, a galaktozil-sfingozina niže u odnosu na skupinu OV.

Tablica 5.12 Prikaz značajno promijenjenih glicerofosfolipida, glikosfingolipida i sfingolipida u perigonadalnom masnom tkivu dobivenih MALDI-TOF-MS analizom i identifikacijom u KEGG bazi.

	Identifikatori			Eksperimentalna skupina (p vrijednost (t-statistika))†					
RS*	KEGG ID	m/z	Naziv	OV	AL	AH	AL-X	AH-X	X
K	C12144	318,3	fitosfingozin						0,042 (2,363)
	C01120	364,3	sfinganin 1-fosfat			0,001 (4,747)		0,037 (2,418)	0,004 (3,704)
	C06124	380,3	sfingozin1-fosfat						0,027 (2,622)
	C04590	427,3	3-(O-geranilgeranil)-sn-glicerol 1-fosfat			0,021 (2,770)			
	C22342	651,5	diacetilheptaprenilglicerol	0,026 (-2,523)		0,004 (-3,660)	0,004 (-3,728)		0,045 (-2,146)
OV	C12144	318,3	fitosfingozin						0,044 (2,325)
	C01120	364,3	sfinganin 1-fosfat			0,001 (4,747)			0,004 (3,704)
	C04590	427,3	3-(O-geranilgeranil)-sn-glicerol 1-fosfat			0,021 (2,770)			
	C03640	483,4	sfingozil-fosfokolin						0,034 (-2,412)
	C01747	520,3	galaktozil-sfingozin		0,034 (-2,299)	0,048 (-2,115)			0,014 (-2,777)

*Kratice: RS – referentna skupina (s kojom su uspoređene ispitivane skupine), K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja.

†Rezultati studentovog t-testa (usporedba eksperimentalnih skupina s referentnim skupinama).

Značajne promjene u steroidima i njihovim direktnim metabolitima u perigonadalnom masnom tkivu u odnosu na kontrolnu skupinu i netretiranu ovarijektomiranu skupinu prikazane su u tablici 5.13. Nisu uočene značajne razlike između netretirane ovarijektomirane skupine i kontrolne skupine životinja. U skupini AL-X bile su povišene količine 2-hidroksi-6-oksonona-2,4-dien-1,9-dioata u odnosu na skupinu K. Skupine AH i AL-X imale su niže količine androstan-3α,17β-diola u odnosu na skupinu OV. Količine alotetrahidrokortikosterona povišene su u skupini AH u odnosu na skupine K i OV. Skupine AL, AH i AH-X imale su niže količine 3α,7α-dihidroksi-5β-kolestana u odnosu na skupinu K. Skupina AH imala je povišene količine 4α-karboksi-stigmasta-7,24(24(1))-dien-3β-ola u odnosu na skupine K i OV i povišene količine 4α-karboksi-5α-kolesta-8,24-dien-3β-ola u odnosu na skupinu OV. Količine 24-metilen-cikloartanola bile su snižene u skupini AL-X i cikloeukalenona u skupini AH u odnosu na skupinu OV. Razine estron glukuronida bile su povišene u skupini AH u odnosu na skupine K i OV, a razine glikokenodeoksikolata snižene u odnosu na skupinu OV. Skupina AL-X imala je povišene razine 2-metoksiestron 3-glukuronida i 2-metoksi-estradiol-17β 3-glukuronida u odnosu na skupinu K. Skupina AH imala je povišene razine 3β-hidroksi-4β,14α-dimetil-9β,19-ciklo-5α-ergost-24(24(1))-en-4α-karboksilata u odnosu na skupine K i OV. Skupina koja je primala samo ekstrakt hmelja imala je povišene razine 2-hidroksi-6-oksonona-2,4-dien-1,9-dioata, alotetrahidrokortikosterona, kortola i cikloeukalenona u odnosu na skupinu K. Također, je u odnosu na skupinu OV imala povišene razine estrona, alotetrahidrokortikosterona, kortola, 4α-karboksi-5α-kolesta-8,24-dien-3β-ola i cikloeukalenona, a snižene razine androstan-3α,17β-diola, 24-metilen-cikloartanola, 24,25-dihidrolanosterola i glikokenodeoksikolata.

Značajne promjene u biljezima oksidativnog stresa u perigonadalnom masnom tkivu u odnosu na kontrolnu skupinu i netretiranu ovarijektomiranu skupinu prikazane su u tablici 5.14. Netretirana ovarijektomirana skupina životinja imala je povišene količine oba identificirana biljega u odnosu na kontrolnu skupinu. U skupini AH (R)-S-laktoilglutation bio je povišen u odnosu na skupinu K, a isti biljeg je u skupinama AL-X i AH-X bio snižen u odnosu na skupinu OV. Biljeg oksidativnog stresa γ-L-glutamil-L-2-aminobutirilglicin bio je povišen u skupini X u odnosu na skupinu K.

Tablica 5.13 Prikaz značajno promijenjenih steroida i direktnih metabolita steroida u perigonadalnom masnom tkivu dobivenih MALDI-TOF-MS analizom i identifikacijom u KEGG bazi.

	Identifikatori			Eksperimentalna skupina (p vrijednost (t-statistika))†					
RS*	KEGG ID	m/z	Naziv	OV	AL	AH	AL-X	AH-X	X
K	C04479	273,1	2-hidroksi-6-oksonona-2,4-dien-1,9-dioat				0,030 (2,561)		0,011 (3,157)
	C13713	352,3	alotetrahidrokortikosteron			0,010 (3,210)			0,012 (3,087)
	C05482	369,3	kortol						0,028 (2,614)
	C05452	405,4	3α,7α-dihidroksi-5β-kolestan		0,001 (-3,628)	< 0,001 (-4,756)		0,011 (-2,873)	
	C22121	447,4	cikloeukalenon						0,010 (3,222)
	C22120	457,4	4α-karboksi-stigmasta-7,24(24(1))-dien-3β-ol			0,005 (3,639)			
	C11133	469,2	estron glukuronid			0,001 (4,385)			
	C22116	509,3	3β-hidroksi-4β,14α-dimetil-9β,19-ciklo-5α-ergost-24(24(1))-en-4α-karboksilat			0,007 (3,405)			
	C11132	535,2	2-metoksiestron 3-glukuronid			0,006 (3,417)	0,006 (3,533)		
	C11131	537,2	2-metoksi-estradiol-17β 3-glukuronid				0,024 (2,647)		
OV	C03852	273,2	androstan-3α,17β-diol			0,028 (-2,601)	0,049 (-2,238)		0,033 (-2,485)
	C00468	288,2	estron						0,044 (2,334)
	C13713	352,3	alotetrahidrokortikosteron			0,010 (3,210)			0,012 (3,087)
	C05482	369,3	kortol						0,028 (2,614)
	C22112	429,3	4α-karboksi-5α-kolesta-8,24-dien-3β-ol			0,038 (2,397)			0,012 (3,012)
	C08830	441,4	24-metilen-cikloartanol				0,017 (-2,884)		0,036 (-2,371)
	C22121	447,4	cikloeukalenon			0,024 (-2,641)			0,013 (3,061)
	C22120	457,4	4α-karboksi-stigmasta-7,24(24(1))-dien-3β-ol			0,005 (3,565)			
	C05109	467,4	24,25-dihidrolanosterol						0,045 (-2,247)
	C11133	469,2	estron glukuronid			0,001 (4,385)			
	C05466	484,3	glikokenodeoksikolat			0,035 (-2,463)			0,036 (-2,441)
	C22116	509,3	3β-hidroksi-4β,14α-dimetil-9β,19-ciklo-5α-ergost-24(24(1))-en-4α-karboksilat			0,043 (2,272)			

*Kratice: RS – referentna skupina (s kojom su uspoređene ispitivane skupine), K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja.

†Rezultati studentovog t-testa (usporedba eksperimentalnih skupina s referentnim skupinama).

Tablica 5.14 Prikaz značajno promijenjenih biljega oksidativnog stresa u perigonadalnom masnom tkivu dobivenih MALDI-TOF-MS analizom i identifikacijom u KEGG bazi.

	Identifikatori			Eksperimentalna skupina (p vrijednost (t-statistika))†					
RS*	KEGG ID	m/z	Naziv	OV	AL	AH	AL-X	AH-X	X
K	C21016	307,2	γ-L-glutamil-L-2-aminobutirilglicin	0,038 (2,398)					0,041 (2,299)
	C03451	362,1	(R)-S-laktoilglutation	0,010 (3,129)		0,013 (3,048)			
OV	C21016	307,2	γ-L-glutamil-L-2-aminobutirilglicin						
	C03451	362,1	(R)-S-laktoilglutation				0,037 (-2,268)	0,037 (-2,253)	

*Kratice: RS – referentna skupina (s kojom su uspoređene ispitivane skupine), K – zdrava kontrolna skupina (placebo operacija), OV – ovarijektomirane netretirane životinje, AL – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata, AH – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata, AL-X – ovarijektomirane životinje koje su primale nisku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, AH-X – ovarijektomirane životinje koja su primale visoku dozu alendronata i ekstrakt hmelja, X – ovarijektomirane životinje koje su primale ekstrakt hmelja.

†Rezultati studentovog t-testa (usporedba eksperimentalnih skupina s referentnim skupinama).

6. **RASPRAVA**

S obzirom da je osteoporoza u većini slučajeva bolest starije životne dobi, porastom očekivanog životnog vijeka raste i prevalencija osteoporoze u svijetu, a najviša je u Europi i Africi (6, 210). S obzirom na veliko opterećenje koje osteoporoza vrši na zdravstveni sustav mnogih zemalja u svijetu, i dalje se intenzivno radi na stvaranju i poboljšavanju infrastrukture za liječenje oboljelih od te bolesti, kao i na zdravstvenim politikama o prevenciji i metodama liječenja osteoporoze te smanjenju rizika od prijeloma i smrti (6, 211).

Premda je liječenje bisfosfonatima, kao što je alendronat, dosta uspješno i često se koristi kao prva linija liječenja, očita je potreba za razvojem novih lijekova protiv osteoporoze. U novije vrijeme istražuju se novi terapijski pristupi, od kojih se neki uključuju u terapiju kao druga ili treća linija, a neki su još u ranijim fazama istraživanja, zbog čega nedostaju podaci o učincima njihove dugoročne primjene (190). Osim toga, stvaraju se i nove formulacije već korištenih lijekova kako bi se smanjile nuspojave u probavnom sustavu i olakšalo način uzimanja lijeka (npr. puferirani alendronat u obliku šumećih tableta) (212). Kao što je već spomenuto, brojni fitoestrogeni imaju protektivan učinak na kvalitetu kosti. Za 8PN te ekstrakt hmelja koji sadrži 8PN i spojeve koji se metaboliziraju u 8PN, jedan od najpotentnijih fitoestrogena, *in vitro* i *in vivo* pokusi ukazuju da sprečavaju gubitak koštane mase i resorpciju kosti te da imaju povoljan učinak na stvaranje kosti (149, 161, 162). S obzirom da neka istraživanja pokazuju da pripravci poput ekstrakta hmelja ili pročišćenog 8PN-a imaju manje štetnih učinaka nego drugi lijekovi protiv osteoporoze koji su trenutno u upotrebi, nije neobično što se mogućnosti njihovog korištenja u liječenju osteoporoze intenzivno istražuju (149, 162). S druge strane, primjena fitoestrogena iz hmelja i drugih izvora još uvijek se istražuje te još nisu do kraja poznati učinci njihovog dugoročnog korištenja ni svi mogući zdravstveni rizici njihove primjene u ljudi (144).

Za razliku od drugih izvora fitoestrogena, ekstrakti hmelja i 8PN relativno su novo područje istraživanja, no s obzirom na potentnost 8PN-a rezultati dosadašnjih ispitivanja su obećavajući (129, 144, 149, 161, 162) Do sada nije istraživana kombinirana primjena ekstrakta hmelja i bisfosfonata te nije poznato bi li se pripravci fitoestrogena iz hmelja mogli koristiti kao dopunska terapija antiresorptivnim lijekovima poput alendronata, s obzirom da osim antiresorptivnog učinka imaju i anaboličko djelovanje. U ovom radu ispitana je primjena alendronata u niskoj i visokoj dozi, standardiziranog ekstrakta hmelja i njihove kombinacije na ovarijektomijskom modelu osteoporoze u štakora. Posebna pažnja obratila se na odrednice

kvalitete i pregradnje kosti, ali i učinak na tkiva ovisna o estrogenu (maternica i perigonadalno masno tkivo) te organe podložne djelovanju oksidativnog stresa i djelovanju ksenobiotika (jetra i bubreg). Ispitani su i rutinski hematološki i biokemijski pokazatelji u krvi i serumu te je analiziran lipidni sastav tkiva jetre i perigonadalnog masnog tkiva masenom spektrometrijom.

6.1 Hematološke i biokemijske odrednice

6.1.1. Hematološki pokazatelji

Poznato je da hematopoetske matične stanice imaju ERα te da estrogen potiče diobe tih stanica (213). Estrogen utječe na regulaciju eritropoeze te štiti od pretjerane eritropoeze u bolesnika s kroničnom planinskom bolesti (214). Stoga je u ovom istraživanju bilo logično pratiti hematološke pokazatelje u ispitivanih skupina.

Broj eritrocita bio je veći u svih ovarijektomiranih skupina u odnosu na kontrolu, no to povećanje bilo je značajno samo u dvije skupine koje su primale nisku dozu alendronata. Bez obzira na značajnost, broj crvenih krvnih stanica ni u jednoj skupini nije bio veći od granica referentnog raspona za štakore, što ukazuje na to da ni alendronat, ni ekstrakt hmelja ni njihova kombinacija nemaju značajan učinak na broj crvenih krvnih stanica. Slično je zapaženo i u vrijednostima hematokrita i hemoglobina. Poznato je da se ERα nalazi i na zrelim eritrocitima i to pretežno na membrani u žena prije menopauze, dok se u muškaraca pretežno nalazi u citoplazmi. Osim toga estrogen potiče premještanje ERα i ERβ receptora iz citoplazme na staničnu membranu (i u muškaraca i žena neovisno o menopauzi) te utječe na unutarstaničnu signalizaciju eritrocita, što može biti važno u kontekstu terapijske primjene fitoestrogena kao selektivnih modulatora ERα (215).

Broj leukocita bio je veći u svih ovarijektomiranih skupina, a značajno veći samo u skupini AH-X. Povećanje broja leukocita u skladu je s poznatim rezultatima drugih istraživanja i u ljudi i u životinja. Naime, povišen broj leukocita zabilježen je u ovarijektomiranih miševa, u žena kojima su operativnim putem odstranjeni jajnici i u ljudi oboljelih od osteoporoze (216, 217). Slično kao i kod broja eritrocita, ove promjene u broju leukocita i dalje su bile unutar referentnog raspona za štakore te im se u ovom kontekstu ne može pridati veći klinički značaj. Ipak, s obzirom da je u potmenopauzalnih žena i u ovarijektomiranih životinja zabilježena pojava blage sistemske upale i aktivacije imunosnih stanica (218, 219), moguće je da su i ove promjene broja leukocita u krvi djelomično odraz navedenog. U starijih osoba također je zapaženo povećanje razine upalnih citokina i broja bijelih krvnih stanica u krvi (220). S druge strane, proliferacija, samoobnavljanje i diferencijacija hematopoetskih stanica regulirane su

estrogenom, tako da bi zapažene promjene u krvi ispitivanih životinja mogle biti i odraz promjena u koštanoj srži (221, 222). Također, primjena alendronata u štakora uzrokovala je povećanje broja leukocita (monocita i neutrofila) u krvi (106). Zbog navedenog, u budućim istraživanjima tvari korištenih u ovom radu trebalo bi ispitati promjene u hematopoetskim stanicama koštane srži, a osim samog broja leukocita trebalo bi istražiti i eventualne promjene diferencijalne krvne slike.

Broj trombocita bio je smanjen u svih ovarijektomiranih skupina, a osobito u skupina koje su primale alendronat (značajno u skupinama AH, AL-X i AH-X). Unatoč tome, vrijednosti su i dalje bile unutar referentnog raspona za štakore. Smanjenje broja trombocita u skladu je s istraživanjima koja pokazuju da je nakon menopauze smanjen broj trombocita u krvi (223). Neka istraživanja navode veći broj trombocita u osoba s osteopenijom i osteoporozom nego u onih s normalnim BMD-om (224, 225), no ima i suprotnih rezultata, gdje je broj trombocita bio manji u osoba s nižim BMD-om (226). Trombociti i njihovi prethodnici, megakariociti, imaju estrogenske receptore, međutim, utjecaj estrogena na stvaranje i funkciju trombocita još nije jasan (227).

Premda u ovom istraživanju nije uočen ozbiljan utjecaj ispitivanih tvari na hematološke parametre u smislu odstupanja od referentnih vrijednosti, svakako je potrebno prikupiti podatke o utjecaju dugoročne primjene na odrednice krvne slike i hematopoetske stanice.

6.1.2. Biokemijski pokazatelji

Analizirani su i biokemijski pokazatelji u serumu ispitivanih životinja. Nisu pronađene statistički značajne razlike u razinama većine mjerenih iona (natrij, kalij, fosfor), osim kalcija, čija razina je općenito bila nešto niža u svih ovarijektomiranih skupina, ali jedino značajno u skupine tretirane visokom dozom alendronata. To je u skladu s poznatom pojavom da bisfosfonati, uključujući alendronat, uzrokuju prolaznu hipokalcijemiju u serumu pacijenata, no ona je rijetko klinički značajna (228), što je u skladu s njihovim utjecajem na osteoklaste i resorpciju kosti (229). Razina natrija bila je na donjoj granici referentnog intervala ili blago ispod nje u svih skupina, što može biti eksperimentalni artefakt.

Razina glukoze nije se značajno razlikovala među skupinama, što može ukazivati na to da metabolizam glukoze nije narušen, no s obzirom da se takvi poremećaji mogu očitovati na razne načine, to se bez dodatnih istraživanja ne može potvrditi, tim više što je poznato da ovarijektomija može utjecati na razinu glikogena u jetri (230). Razine ALT-a dosta su se razlikovale među skupinama, s tim da su skupine AH i X imale najniže, a OV najvišu razinu

ALT-a u serumu, s tim da je u OV skupini ona bila iznad gornje granice referentnog raspona. Istraživanja koja su nastojala povezati razine jetrenih enzima s osteoporozom su donekle proturječna, tako da je teško tumačiti ovaj rezultat u kontekstu do sada poznatih podataka (231, 232). Što se tiče primjene alendronata, on rijetko uzrokuje oštećenje jetre (233). Razina ukupnog bilirubina kao još jedan pokazatelj jetrene funkcije nije se značajno razlikovala među skupinama. S obzirom da nije bilo značajne razlike u razini ureje ni kreatinina u serumu, ispitivane tvari nisu narušile bubrežnu funkciju u razdoblju primjene. To je u skladu i s istraživanjima koja pokazuju da alendronat dugoročno ne narušava bubrežnu funkciju u bolesnika (234). Povećana razina alkalne fosfataze u serumu nakon ovarijektomije je poznat fenomen, a terapija estrogenom ne smanjuje značajno njenu razinu u ovarijektomiranih ovaca (235). To je u skladu s ovim istraživanjem, jer su najviše razine ALP uočene u skupinama OV i X. U sve 4 skupine koje su primale alendronat razina je bila bliže kontroli, što je u skladu sa zabilježenim smanjenjem razine ALP u pacijenata koji primaju alendronat (236). Razina amilaze kao pokazatelj egzokrine funkcije gušterače nije se značajno razlikovala u ispitivanih skupina.

Ukupni proteini i albumini bili su na gornjoj granici referentnog intervala ili blago iznad nje u svih skupina i jedino su u skupinama koje su primale visoke doze alendronata bile značajno niže od kontrole, dok se razina globulina nije značajno razlikovala. Iako su neka istraživanja pokazala da bolesnici s osteoporozom imaju sniženu razinu albumina (237), u ovom istraživanju to nije zapaženo, što može ukazivati na različitu uzročno-posljedičnu povezanost.

Nakon 2-tjednog tretmana ispitivanim tvarima, odnosno njihovom kombinacijom, nisu zapaženi pokazatelji štetnih učinaka na biokemijska obilježja seruma, no trebalo bi istražiti i učinke dugoročne primjene. Osim toga, ovo ispitivanje nije se detaljno bavilo promjenama jetrene i bubrežne strukture i funkcije te u tom području ima još prostora za daljnja istraživanja.

6.1.3. Kolesterol i trigliceridi u serumu

U ovom istraživanju razina triglicerida u serumu nije se značajno razlikovala u ispitivanih skupina, no vrijednosti ukupnog kolesterola u serumu životinja koje su primale ekstrakt hmelja bile su značajno više od kontrole i ovarijektomiranih netretiranih životinja (djelomično i u odnosu na AH skupinu). Referentne vrijednosti lipida u serumu štakora razlikuju se u literaturi ovisno o godini publikacije, soju i starosti te drugim obilježjima životinja (238–241). Stoga je u štakora teže procijeniti jesu li izmjerene vrijednosti unutar fiziološkog raspona, no sudeći

prema dostupnim podacima, izmjerene razine ukupnog kolesterola su ili u prihvatljivim granicama ili malo iznad njih u životinja koje su primale ekstrakt hmelja.

Poznato je da estrogen snižava razinu kolesterola (i LDL-a i HDL-a) u štakora (242). U jednom istraživanju primijećeno je da je razina kolesterola u plazmi povećana u ovarijektomiranih štakora hranjenih standardnom hranom, ali i u štakora na visokomasnoj prehrani bez obzira na ovarijektomiju (243). U našem istraživanju nije zabilježen takav učinak ovarijektomije na razinu ukupnog kolesterola. Razna istraživanja pokazuju pozitivne učinke fitoestrogena na lipidogram, npr. jedno istraživanje pokazalo je da fitoestrogeni iz soje i crvene djeteline imaju pozitivan učinak na lipidogram u žena u postmenopauzi u smislu smanjenja razine triglicerida, ukupnog kolesterola i LDL-a te povećanja razine HDL-a u serumu (244). Prema drugim istraživanjima, ekstrakti hmelja imaju povoljne učinke na razinu HDL-a u serumu i razine lipida u tkivu jetre, a snižavaju i razinu LDL-a i triglicerida u serumu (245–247). Slične povoljne učinke na razine lipida u serumu imala je i primjena čistog 8PN-a (248). Prema jednom istraživanju, protektivni učinak 8PN-a na lipidogram bio je snažniji od primjene samog estrogena u štakora (249). Nejasno je zbog čega je u ovom istraživanju najviša razina ukupnog kolesterola zabilježena baš u životinja koje su primale ekstrakt hmelja, ali je taj fenomen teško tumačiti bez podataka o razini HDL-a i LDL-a u ispitivanih životinja. S obzirom da ekstrakt hmelja može povisiti razinu HDL-a u serumu, moguće je da je veća razina ukupnog kolesterola u životinja koje su primale ekstrakt hmelja odraz toga.

Postoje naznake da alendronat i još neki bisfosfonati imaju povoljan utjecaj na lipidogram te se čak smatra da bi, osim povoljnog učinka na osteoporozu mogli pomoći i u poboljšanju razine lipida i smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti (250, 251). U ovom istraživanju nije zabilježen značajan utjecaj alendronata ni na razinu kolesterola ni triglicerida.

Povišene razine triglicerida i ukupnog kolesterola povezuju se s povećanim rizikom od osteoporoze, dok su rezultati ispitivanja povezanosti HDL-a i LDL-a s osteoporozom proturječni (252). Neki od mogućih razloga povećanog rizika od osteoporoze kod viših razina serumskih lipida su aktivacija PPAR-γ metabolitima lipida, što usporava stvaranje kosti i uzrokuje gubitak koštane mase, zatim, porast lipida u serumu je povezan s povećanim oksidativnim stresom što također djeluje na stvaranje kosti, a pri većoj razini triglicerida u serumu zapaženo je više masnog tkiva u koštanoj srži, što je povezano s manjim BMD-om spužvaste kosti (252). U skladu s tim, dokazano je da lijekovi koji snižavaju razinu lipida u serumu (statini) povećavaju mineralizaciju kosti u glodavaca i ljudi (253). S druge strane,

povećan indeks tjelesne mase povezan je s većim BMD-om, a smatra se da je to posljedica povećanog opterećenja tjelesne mase na kosti (254), međutim, pretilost sa sobom nosi dodatne čimbenike koji mogu smanjiti kvalitetu kosti (255), a zbog stila života, konstitucije i drugih razloga, pretile osobe imaju veći rizik od određenih vrsta prijeloma (256). Osim navedenog, na kvalitetu kosti utječu i dodatni čimbenici, kao što su prehrana, lučenje adipokina u masnom tkivu i metabolički poremećaji (257). Spomenuti podaci ukazuju na ulogu poremećenih razina lipida u serumu na nastanak osteoporoze, tako da se rezultati raznih istraživanja u vezi odnosa razine lipida u serumu s osteoporozom trebaju pažljivo tumačiti u smislu uzročno-posljedične povezanosti.

Prema dobivenim rezultatima, ispitivane tvari nemaju značajan utjecaj na razinu triglicerida, dok je porast razine ukupnog kolesterola u životinja koje su primale ekstrakt hmelja upitnog kliničkog značaja s obzirom na dostupne referentne vrijednosti za štakore. Ipak, spomenuti fenomen potrebno je dodatno istražiti, počevši od mjerenja HDL-a i LDL-a u serumu nakon kratkoročne i dugoročne primjene. Također bi bilo korisno istražiti postoje li razlike u primjeni ekstrakta hmelja i čistog 8PN-a. Takve informacije bile bi vrlo vrijedne u procjeni koristi i rizika povezanih s korištenjem ekstrakta hmelja u liječenju osteoporoze i drugih postmenopauzalnih tegoba, tim više što je dislipidemija poznat rizičan čimbenik za razvoj kardiovaskularnih bolesti.

6.2 Kvaliteta i pregradnja koštanog tkiva

Glavni pokazatelj utjecaja alendronata i ekstrakta hmelja na osteoporozu su rezultati analize kvalitete kosti. Utjecaj alendronata na koštani metabolizam je opće poznat i temelji se na toksičnom djelovanju na osteoklaste te usporavanju resorpcije kosti (86, 93, 104). Djelovanje estrogena na homeostazu kosti je kompleksan mehanizam koji još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Zasada je poznato da estrogen direktno potiče apoptozu osteoklasta, smanjuje nastanak RANKL-a u koštanim T i B-limfocitima koji je nužan za diferencijaciju osteoklasta te potiče produkciju osteoprotegrina, koji dodatno smanjuje količinu dostupnog RANKL-a. Estrogen također smanjuje proizvodnju citokina koji potiču resorpciju kosti (IL-1, IL-6, TNF-α, M-CSF i prostaglandini). Utjecaj estrogena na osteoblaste očituje se u smanjenju apoptoze i produljenju životnog vijeka aktivacijom Src/Shc/ERK signalnog puta i utišavanjem JNK signalnog puta (75, 258, 259). Osim toga, estrogen je važan antioksidans u organizmu i ima veliku ulogu u homeostazi kalcija, te manjak estrogena rezultira negativnom ravnotežom kalcija i gubitkom koštane mase u štakora i žena u postmenopauzi (83, 106, 178). ROS nastao

starenjem ili nedostatkom estrogena smanjuje dostupne količine β-katenina i utišava Wnt/β-katenin signalni put koji je jedan od glavnih pokretača diferencijace osteoblasta, a također dovodi i do povećane aktivnosti osteoklasta (75, 106, 260). To rezultira promjenama u kvaliteti koštanog matriksa, koje se ispoljavaju na razini kompaktne ili spužvaste kosti.

Dosadašnja istraživanja pokazuju da je utjecaj ekstrakta hmelja na spužvastu kost istovjetan estradiolu, a istraživanje čistog 8PN pokazalo je njegov pozitivan utjecaj na mineralnu gustoću kostiju (149, 162). U ovom istraživanju ekstrakt hmelja je pozitivno djelovao na količinu koštanog tkiva unutar mjerenog segmenta distalne epifize bedrene kosti jednako učinkovito kao visoka doza alendronata, tako da su i kod primjene visoke doze alendronata i ekstrakta hmelja mjere količine koštanog tkiva (volumen koštanog tkiva i udio volumena koštanog tkiva u volumenu kosti) bile na razini kontrolne skupine. Kombinacija niže doze alendronata i ekstrakta hmelja imala je približno istu učinkovitost u očuvanju koštane mase kao i tretman AH i X skupine, međutim, kombinacija visoke doze alendronata i ekstrakta hmelja rezultirala je nižom koštanom masom, gotovo na razini ovarijektomirane netretirane skupine.

Prema opsegu periosta i endosta vidljivo je da ekstrakt hmelja, visoka doza alendronata te kombinacija niske doze alendronata i ekstrakta hmelja potiču apoziciju kosti u endostu, a nemaju značajnog utjecaja na rast kosti u širinu. Dosadašnja istraživanja pokazuju da estrogen potiče apoziciju kosti ispod endosta, no ne potiče rast kosti u širinu u ženki glodavaca (261). Iako u nekim istraživanjima nije uočen značajan utjecaj ekstrakta hmelja na debljinu i kvalitetu kompaktne kosti (149), u ovom istraživanju njegova primjena dovela je do veće debljine kompaktne kosti i njezine površine u odnosu na ovarijektomijski model. Primjena ekstrakta hmelja održala je površinu kompaktne kosti istovjetnu kontrolnoj skupini, kao i visoka doza alendronata i niska doza alendronata u kombinaciji s ekstraktom hmelja. Kombinacija visoke doze alendronata i ekstrakta hmelja nije bila učinkovita, jer je količina kompaktne kosti u skupini AH-X bila na razini OV skupine. Ekstrakt hmelja je jednako učinkovit u održavanju debljine koštanih gredica kao i visoke doze alendronata, što je u skladu s prijašnjim istraživanjima utjecaja ekstrakta hmelja na spužvastu kost (149). Isti učinak imala je i kombinacija niske doze alendronata i ekstrakta hmelja. I u ovom pogledu u skupini AH-X kvaliteta kosti bila je znatno lošija, na razini OV skupine.

Rezultati ovog istraživanja u skupini X u skladu su s već opisanim povoljnim djelovanjem fitoestrogena iz hmelja na kvalitetu kosti. Međutim, nije poznato zašto pri kombiniranoj primjeni visoke doze alendronata i ekstrakta hmelja ne dolazi do pozitivnih učinaka zabilježenih

nakon monoterapije alendronatom ili ekstraktom hmelja. Mogući razlog je izostanak poticaja na stvaranje osteoblasta zbog smanjenog broja i aktivnosti osteoklasta. Iako alendronat djeluje toksično na osteoklaste (izaziva apoptozu), razgradnja kosti je još uvijek prisutna, a prilikom nje dolazi do otpuštanja citokina i čimbenika unutar koštanog matriksa koji potiču aktivnost i diferencijaciju osteoblasta (TGFβ, IGF1, IGF2 i koštani morfogenetski protein). Navedeni citokini i čimbenici matriksa uz direktnu jukstakrinu i parakrinu regulaciju osteoklastima, nužni su za aktivaciju osteoblasta (37, 75). Vezanjem na ERα osteoklasta, estrogen (primjenjivo i na fitoestrogene) potiče njihovu apoptozu i smanjuje njihovu diferencijaciju kao što je prethodno opisano. Moguće je da, s obzirom da alendronat i ekstrakt hmelja utječu na osteoklaste različitim putevima, dolazi do zbrojnog učinka koji u tolikoj mjeri utječe na aktivnost osteoklasta da ometa i signalizaciju prema osteoblastima, što u konačnici rezultira smanjenom aktivnošću osteoblasta. Osim toga, moguće je da ispitivane tvari uzrokuju dodatne promjene u metabolizmu kosti koje još nisu poznate, što bi se moglo istražiti pomoću kokulture ili 3D kulture svih koštanih stanica. Postoji i mogućnost interakcije metabolita ispitivanih tvari na za sada nepoznat način. Iako je ovaj rezultat u određenoj mjeri neočekivan, konzistentno se javljao u svim odrednicama kvalitete kosti koje su ispitivane i stoga zaslužuje daljnje istraživanje kako bi se rasvijetlio mehanizam njegova nastanka. Ipak, u kontekstu terapije osteoporoze, ovaj rezultat vjerojatno nije zabrinjavajući, jer doza primjenjivana u skupini AH i AH-X znatno premašuje doze alendronata koje odgovaraju onima za liječenje osteoporoze. Činjenica da je kombinacija niske doze alendronata i ekstrakta hmelja u ovom istraživanju imala jednaku učinkovitost kao i visoka doza alendronata na kvalitetu kompaktne i spužvaste kosti ukazuje na mogućnost korištenja ekstrakta hmelja kao dodatka u terapiji osteoporoze alendronatom, što je potrebno potvrditi budućim istraživanjima.

Prema rezultatima western blot analize biljega koštane pregradnje, pokazano je da razine P1NP značajno rastu u AH skupini u odnosu na AL, AL-X, OV i K. To ukazuje na anabolički utjecaj alendronata. Štoviše, taj utjecaj je ovisan o dozi i pojavljuje se samo pri velikim dozama alendronata. Anabolički utjecaj alendronata pri visokim dozama je poznat iz prethodnih istraživanja i temelji se na poticanju diferencijacije osteoblasta kroz mezenhimske zametne stanice (262). Količine CTX1, biljega razgradnje kosti, nisu bile značajno promijenjene u niti jednoj skupini iako bi se moglo očekivati povišene vrijednosti CTX1 u ovarijektomiranih skupina. Prema istraživanjima, količine CTX1 variraju ovisno o cirkadijanom ritmu, o uzimanju hrane prije uzimanja uzorka i mnogim drugim čimbenicima (263). Osim toga, s obzirom da je istraživanje rađeno na životinjama 30 dana nakon ovarijektomije, kad je model

već bio uspješno uspostavljen, moguće je da su količine CTX1 u skupinama životinja bile povišene tijekom razvoja modela, ali su se stabilizirale kroz spomenutih 30 dana. U tom slučaju, jednolika količina CTX1 u svim skupinama pokazuje da nije došlo do dodatne resorpcije kosti uzrokovane alendronatom, ekstraktom hmelja, a ni njihovom kombinacijom. Prema istraživanju Songa i sur., nakon sličnog vremena poslije ovarijektomije, razine CTX1 su bile stabilne na višoj razini od kontrole, a razine P1NP-a na nižoj od kontrole, no to istraživanje rađeno je na miševima, a mjerenja su izvršena metodom ELISA, a ne western blotom (264). Kombinacija ekstrakta crvene djeteline i hmelja (u visokoj dozi) u jednom je istraživanju smanjila razinu CTX1 u serumu (265), dok su u drugom istraživanju autori zabilježili smanjenje i P1NP-a i CTX1 nakon primjene izoflavona iz soje (266). Međutim, u ovom istraživanju taj učinak nije zabilježen. Kako bi se dodatno razjasnila dinamika spomenutih biljega u ispitivanim skupinama, bilo bi korisno pratiti razinu biljega CTX1 i P1NP u serumu u pravilnim intervalima od ovarijektomije do uspješnog uspostavljanja modela i nakon toga, prilikom dugoročne primjene ispitivanih tvari.

6.3 Utjecaj ispitivanih tvari na ostale organe

Težine maternica u kontrolnoj skupini su očekivano bile značajno veće spram ovarijektomirane skupine, ali i svih ostalih skupina, tako da je već prilikom uzorkovanja bilo jasno vidljivo da su ovarijektomirane životinje imale znatno manje maternice. To pokazuje da je ovarijektomijski model uspješno postavljen jer se nedostatak estrogena u organizmu izravno odrazio na morfologiju maternice. Osim toga, s obzirom da nije bilo značajnih razlika u težini maternice između ovarijektomiranih skupina, može se zaključiti da ni jedna ispitivana tvar, odnosno njihova kombinacija, nisu imale značajan proliferativan utjecaj na maternicu. To je potvrđeno i analizom histoloških rezova maternice, gdje je uočen znatno deblji endometrij, odnosno znatno veći udio endometrija u cijeloj površini poprečnog presjeka kroz maternicu u kontrolnih životinja. Dobiveni rezultati slažu se s prijašnjim istraživanjima utjecaja ekstrakta hmelja na tkivo maternice u sličnim dozama (149, 267). Također, ukazuju na sigurnost primjene ispitivanih tvari u kontekstu proliferativnog djelovanja na maternicu. Zbog djelovanja na ER, fitoestrogeni imaju teoretski potencijal uzrokovanja istih nuspojava u maternici kao i nadomjesna hormonska terapija, no 8PN se pokazao selektivnim u svom djelovanju te u više ispitivanja nije imao utjecaj na organe ovisne o estrogenu, kao što je maternica (149, 162). Međutim, u istraživanju u kojem je korištena znatno veća doza čistog 8PN pokazano je da 8PN potiče proliferaciju maternice, stoga je potreban oprez pri razvoju mogućih strategija korištenja

ekstrakta hmelja i tvari izoliranih iz njega u liječenju osteoporoze (268). Sigurnost pojedinih doza tek se treba ustanoviti.

Još jedan doprinos ovog istraživanja je razvoj i korištenje nove poluautomatske metode mjerenja, koja se u ovom slučaju koristila za mjerenje maternice, no može se koristiti i za analize prosječne debljine drugih cjevastih ili približno okruglih organa. Metoda je detaljno objašnjena u potpoglavlju 4.6.1 i publicirana u časopisu (199). Ta nova metoda povećava nepristranost pri mjerenju i točnost prikupljenih podataka korištenjem makronaredbe.

Iako su maternice u ovarijektomiranih skupina znatno manje, pomoću biljega proliferacije stanica Ki67 dodatno se ispitalo postoji li ipak određeni poticaj na proliferaciju u pojedinim tkivima maternice prilikom primjene ispitivanih tvari. Rezultati ukazuju da su životinje u placebo operiranoj skupini (kontroli) sve bile u stadiju proestrusa prema radu Marusak i sur. (269). Iako nije bilo utjecaja u ekspresiji Ki67 u uterinim žlijezdama, zapažene su neke razlike na ostalim tkivima. Općenito je izražaj Ki67 bio manji u svih skupina u odnosu na kontrolu, no ne uvijek značajno. Skupine tretirane alendronatom mjestimično su imale dodatno smanjenu ekspresiju Ki67 u odnosu na kontrolu, više nego bez primjene alendronata, ali promjene nisu bile značajne u odnosu na netretiranu skupinu ovarijektomiranih životinja (za detalje vidjeti potpoglavlje 5.4.2.). Prema istraživanjima, alendronat nema utjecaj na morfologiju maternice (270), što je uočeno i u ovom istraživanju. S druge strane, u literaturi nema podataka o utjecaju alendronata na proliferaciju tkiva maternice. Kod ovarijektomiranih životinja, utjecaj estrogena na proliferaciju maternice prvenstveno se odražava na hipertrofiju i hiperplaziju epitela lumena (271). Prema rezultatima ovog istraživanja, epitel lumena u niti jednoj od ovarijektomiranih skupina tretiranih alendronatom, ekstraktom hmelja ili njihovom kombinacijom nije bio potaknut na proliferaciju.

Jedna od nuspojava ovarijektomije je debljanje štakora, osobito povećanje količine visceralnog masnog tkiva (187, 272). Nedostatak proizvodnje estrogena u menopauzi potiče povećanje ekspresije aromataze u masnom tkivu i periferno lučenje estrogena (57). U ovom istraživanju pokazalo se da je ekstrakt hmelja doveo do smanjenja u prosječnoj površini adipocita perigonadalnog masnog tkiva. Sukladno tome, povećava se i njihov broj po površini tkiva. No, bez podataka o ukupnoj težini masnog tkiva životinje i diobene aktivnosti adipocita, teško je zaključiti dolazi li do proliferacije masnog tkiva ili samo do smanjenja masne kapljice unutar već prisutnih adipocita, stoga bi s obzirom na dobivene rezultate bilo poželjno dodatno istražiti tu pojavu. Pokazano je da ovarijektomija potiče lipogenezu, oksidaciju masnih kiselina

i stvara proupalno stanje u visceralnom masnom tkivu te dovodi do adipoznosti, hiperleptinemije i smanjene osjetljivosti na inzulin (273). Nadomjestak estradiola smanjuje navedene promjene, a također je zanimljivo da i KH ima potencijalnu ulogu u prevenciji pretilosti kroz inhibiciju adipogeneze i poticanje apoptoze adipocita (246, 273). Prema literaturnim navodima taj antiadipogeni učinak flavonoida nazočnih u hmelju temelji se na regulaciji nekoliko putova kao što su indukcija apoptoze, supresija ključnih adipogenih čimbenika transkripcije, aktivacija putova AMPK i Wnt/β-katenin, inhibicija klonske ekspanzije i zaustavljanje staničnog ciklusa (274, 275). Put Wnt/β-katenin je vrlo važan u liječenju osteoporoze zbog njegove uloge u pregradnji kosti. Točnije, on na kost utječe putem nekoliko različitih mehanizama: (1) oslobađa osteoblaste iz mezenhimskih matičnih stanica; (2) potiče diferencijaciju osteoblasta, proliferaciju i smanjenje apoptoze osteoblasta; (3) prekomjerni izražaj Wnt-a povećava koštanu masu i povećava otpornost od hormonski uzrokovani gubitak koštane mase; (4) suprimira osteoklastogenezu povećanjem omjera OPG/RANKL prema β-kateninu (276, 277). Nadalje, treba istaknuti da jedan od puteva antiadipogenog djelovanja jest i inhibicija diferencijacije adipocita smanjenjem stvaranja ROS-a (147, 278).

Negativni utjecaj i oštećenja jetre dovode do povećane produkcije ROS-a u Kupfferovim stanicama jetre što dovodi do aktivacije Itovih stanica jetre i nastanka fibroze (279). Prema rezultatima ovog istraživanja, nije došlo do značajnih histomorfoloških promjena u građi tkiva jetre koja su se mogla zapaziti na korištenom bojenju, prvenstveno u smislu nakupljanja vezivnog tkiva u obliku fibroze. Iako nije uočena fibroza ni u jednoj ispitivanoj skupini, valja zapaziti da uspostava modela fibroze u štakora obično traje znatno dulje nego što je trajao tretman životinja u ovom ispitivanju (280). Stoga se samo na temelju ovog istraživanja ne može izvoditi definitivne zaključke o mogućem nastanku fibroze kao posljedice primjene ispitivanih tvari. Osim utjecaja dugoročne primjene na stvaranje fibroze, bilo bi zanimljivo na histološkim preparatima istražiti i moguće razlike u količini glikogena, masnih kapljica te brojnosti Kuppferovih i Itovih stanica u tikovu jetre ispitivanih skupina. Za razliku od količine kolesterola u serumu, ukupni kolesterol u tkivu jetre nije bio značajno promijenjen niti u jednoj skupini životinja. Rezultati mjerenja ukupnih triglicerida u jetri ukazuju na promijene u metabolizmu triglicerida i njihovo nakupljanje u hepatocitima u netretiranoj ovarijektomiranoj skupini, koje je bilo značajno u odnosu na skupine AL, AH-X i X. Takav rezultat je u skladu s prijašnjim istraživanjima u kojima su opisane promjene u homeostazi i metabolizmu glukoze i lipida u ovarijektomiranih miševa koje, između ostalog, dovode do pojave masne jetre i

simptoma metaboličkog sindroma, a nakupljanje masti u jetri prethodilo je promjenama razine serumskih lipida (230, 272). Zabilježeno je da davanje ekstrakta hmelja ili pročišćenih izohumulona iz hmelja dovodi do značajnog smanjenja količine kolesterola i triglicerida u jetri životinja koje su hranjene masnom hranom, barem djelomično indukcijom ekspresije nekoliko jetrenih enzima i prijenosnih proteina (247). I u ovom istraživanju primjena ekstrakta hmelja dovela je do manjih vrijednosti triglicerida u jetri, što ukazuje na sličan protektivan učinak ekstrakta hmelja. Alendronat može uzrokovati blage promjene ultrastrukture stanica jetre (281), no nejasnog kliničkog značaja. S druge strane, alendronat protektivno djeluje na tkivo jetre u slučaju eksperimentalno izazvane hiperlipidemije u štakora (282). Navedena zapažanja u skladu su sa smanjenjem razine triglicerida u tkivu jetre opaženim u ovom istraživanju u skupinama koje su primale alendronat, od toga u dvije značajnim smanjenjem. Kombinacija alendronata i ekstrakta hmelja imala je sličan učinak kao i monoterapija tim tvarima. Osim utjecaja dugoročne primjene ispitivanih tvari na stvaranje fibroze i masnih promjena u jetri, bilo bi zanimljivo na histološkim preparatima istražiti i moguće razlike u količini glikogena te brojnosti Kuppferovih i Itovih stanica u tikvu jetre ispitivanih skupina.

6.4 Oksidativni stres

Osim nedostatka estrogena koji ima važnu ulogu u homeostazi kalcija, oksidativni stres je jedan od važnih čimbenika koji utječu na promjene u koštanom metabolizmu i razvoj osteoporoze (83, 181, 191, 283, 284). Čini se da nedostatak estrogena općenito rezultira promjenama u metabolizmu tkiva i promjenama antioksidativne/oksidativne ravnoteže. Povećani oksidativni stres zabilježen je u postmenopauzalnih žena i ovarijektomiranih štakora, što je u skladu s poznatim antioksidativnim djelovanjem estrogena koji nedostaje u postmenopauzi i njenim modelima (285, 286). Nadalje, dokazano je da ovarijektomija dovodi do većeg oksidativnog stresa i smanjene antioksidativne aktivnosti u samoj kosti štakora (287) ROS potiču diferencijaciju i aktivnost osteoklasta, a nužni su i za njihovu funkciju (175). Uz to, smanjuju količinu dostupnog β-katenina i utišavaju signalni put Wnt/β-katenin koji je jedan od glavnih signala za diferencijaciju osteoblasta (260). Nakupljanje ROS-a, upala koju uzrokuju i smanjenje antioksidativnog kapaciteta osim na koštani sustav utječe i na cijeli organizam (jetra, bubreg, kardiovaskularni sustav) u obliku oštećenja lipida, DNA i proteina (106, 178, 288, 289).

U našem istraživanju pratili smo pokazatelje oksidativnog stresa u jetri, bubregu i krvi. Serumske razine dušikova oksida i aktivnost arginaze, nisu se značajno razlikovale između svih

skupina životinja. Arginaza i dušik oksid sintaza (enzim koji proizvodi dušikov oksid u krvi) su u direktnoj kompeticiji za supstrat L-arginin i aktivnost arginaze regulira količine dušikova oksida (290). Osim toga, dosadašnja istraživanja pokazala su da prilikom povećane produkcije superoksidnog aniona (jedan od najučestalijih ROS-ova) dolazi do smanjenja u količini prisutnog dušikova oksida koji služi i kao antioksidans (291, 292). Također, istražen je i direktan utjecaj dušikova oksida na osteoblaste i pokazano da nedostatak dušikova oksida uzrokuje smanjenje u diferencijaciji osteoblasta (293).

Pritisak oksidativnog stresa očituje se i na oštećenju lipida. Lipidna peroksidacija je proces u kojem reakcijom ROS-a s nezasićenim lipidima dolazi do nastanka raznih produkata oksidacije među kojima MDA služi kao najčešći biljeg za procjenu oštećenja (294). Uz svaku terapiju bisfosfonatima kao nuspojava navodi se smanjenje bubrežne funkcije i oštećenje bubrega (295). No novija istraživanja ne ukazuju da dolazi do promjena u funkciji i radu bubrega prilikom terapije bisfosfonatima i alendronatom (234), uz to alendronat rijetko oštećuje jetru (233). U našem istraživanju količine MDA u jetri i u bubregu nisu bile značajno promijenjene što ukazuje na to da ni alendronat, ni ekstrakt hmelja, ni njihova kombinacija nisu imali negativan utjecaj na funkciju jetre i bubrega. Utjecaj estrogena (stoga potencijalno i fitoestrogena) na jetru u dosadašnjim istraživanjima se opisuje kao pozitivan jer je pokazano da nadomjestak estrogena u menopauzi smanjuje rizik nastanka masne promjene jetre (296). Također, za bubreg je pokazano da signalni putevi aktivirani estrogenom imaju protektivni učinak u određenim poremećajima bubrega (akutno zatajenje bubrega, dijabetička nefropatija, lupusni nefritis) (297).

Utjecajem ROS-a dolazi i do oksidacije proteina koja utječe na brojne stanične procese uključujući odgovore na stres, starenje i razvoj različitih bolesti. (298). Proteini mogu biti modificirani preko različitih oksidativnih reakcija, od kojih je jedan oksidacija proteina u karbonile proteina koji se vrlo često koriste kao biljezi oksidativnog stresa zbog njihove stabilnosti u serumu (299). Fizikalno-kemijske promjene koje nastaju kod karboniliranih aminokiselina predstavljaju najštetniji oblik oksidativnog oštećenja proteina, uzrokuju ireverzibilne promjene, i gubitak identiteta aminokiselinskog bočnog lanca. Karbonilirani proteini gube svoju strukturu, ali i enzimatsku aktivnost vodeći poremećaju staničnih funkcija (300). Uz MDA i količine glutationa (106, 177, 181), karbonil proteini su dobar pokazatelj pritiska oksidativnog stresa na organe ili na cijeli organizam. U našem istraživanju, razine karbonil proteina nisu bile značajno različite unutar tkiva jetre. Netretirana skupina ovarijektomiranih životinja je imala značajno povišene razine karbonil proteina u odnosu na

obje skupine ovarijektomiranih životinja koje su primale visoke doze alendronata (AH i AH-X). Razine karbonil proteina u AH i AH-X su blago niže spram kontrolne skupine koja se nije razlikovala od ostalih skupina (AL, AL-X i X). Karbonilirani agregati, posebice velike molekulske mase, mogu postati citotoksični te uzrokovati različite vrste poremećaja vezanih uz starenje, uključujući Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest te rak (301). Tako posljedice ovarijektomije i nastanak oksidacijskog stresa ne samo da dovode do osteoporoze nego mogu prouzročiti i brojne druge bolesti. Primjena antioksidansa poput flavonoidnih sastavnica hmelja vjerojatno može usporiti ili spriječiti takve posljedice. S obzirom na nedavne informacije koje pokazuju da nema dokaza da alendronat utječe negativno na bubreg (234, 295) i rezultatima dobivenim u ovom istraživanju, potrebno je dodatno ispitati stvaran utjecaj alendronata na oksidativni stres u bubregu te utjecaja na bubrežnu funkciju.

Katalaza je enzim koji vrši razgradnju vodikova peroksida i najaktivnija je u jetri, bubregu i eritrocitima, ali prisutna je u preoksisomima svih organa (302). Vodikov peroksid je još jedan od čestih ROS-ova, stoga katalaza čini važan dio antioksidativnog kapaciteta stanica. Aktivnost katalaze u bubregu nije bila značajno promijenjena u našem istraživanju. To je još jedan pokazatelj da ispitivane tvari u obliku monoterapije ili kombinacijske terapije nisu potakle oksidativni stres u tkivu bubrega. U jetri netretiranih skupina ovarijektomiranih životinja zabilježena je niža aktivnost katalaze spram svih skupina, a znatno niža spram kontrolne skupine životinja, AH skupine i AL-X. Skupina koja je primala niske doze alendronata imala je značajno nižu aktivnost katalaze spram skupine koja je primala visoku dozu alendronata. Mehanizam kako alendronat u visokim dozama pozitivno djeluje na aktivnost i količinu katalaze u jetri je zasada nepoznat, ali u prijašnjim istraživanjima je također dobiveno da alendronat podiže razinu katalaze no u njihovom slučaju u tkivu bubrega (178).

Općenito, oksidativna šteta na ispitivanim organima i serumu je bila nepostojeća ili niska prema rezultatima ovoga istraživanja. Prikazani povišeni oksidativni stres kod netretiranih ovarijektomiranih životinja podupire zaključke dosadašnjih istraživanja da nedostatak estrogena uzrokuje rast količine ROS-a i oksidativnog oštećenja (181, 191, 283, 284). Premda prema rezultatima ovog istraživanja nije došlo do izrazitog oksidativnog stresa, to možemo dijelom objasniti brojnim mehanizmima brze prilagodbe (adaptacije) stanica na okolišne uvjete (303, 304). Točnije, adaptacijski mehanizmi mogu se temeljiti na atrofiji, hipertrofiji, hiperplaziji, metaplaziji i displaziji stanica kao odgovor na stanični okolišni podražaj (305). Potencijalno zbog dužine pokusa nisu vidljive jasne promjene u povećanju oksidativnog stresa osim u razini karbonil proteina u tkivu bubrega ovarijektomiranih netretiranih životinja. Takav

navod potvrđuje istraživanje koje pokazuje da bi terapijsko nadomještanje estrogena povoljno utjecalo na razinu oksidativnog stresa u ovarijektomiranih životinja, potrebno je s nadomještanjem započeti rano nakon ovarijektomije, jer kasno nakon ovarijektomije nadomjestak estrogena nema učinka na oksidativni stres (306).

Ipak dio dobivenih rezultata podudara se s literaturnim podacima koji sugeriraju da flavonoidne sastavnice hmelja mogu smanjiti oštećenje tkiva putem poboljšanja oksidativnog statusa specifičnih tkiva i smanjiti proizvodnju proupalnih citokina, što u konačnici potiče rast i proliferaciju osteoblasta štakora i povećava razinu odrednica koje pokazuju kvalitetu kostiju i taloženje minerala u kostima (139, 149, 150, 152). Nadalje, čini se da sastavnice hmelja mogu povećati apsorpciju kalcija, odgoditi gubitak koštane mase, poboljšati interakcije između imunološkog sustava i kostiju, te spriječiti pojavu osteoporoze (144, 149, 307). Jedan od mehanizama koji može doprinijeti povećanoj apsorpciji kalcija i fosfora može biti djelovanje flavonoida hmelja kao prebiotika na crijevnu mikrobiotu. Mehanizmi kojima prebiotici hmelja potiču apsorpciju kalcija i fosfora su opisani (308) kao: (1) povećanje topivosti minerala u crijevima zahvaljujući bakterijskoj proizvodnji kratkolančanih masnih kiselina; (2) povećanje apsorpcijske površine zbog stimulacije proliferacije enterocita; (3) stabilizacija crijevne flore potaknuta povećanjem korisnih prebiotika u crijevima čiji neprobavljivi oligosaharidi djeluju kao fitoestrogeni, imaju osteogene i zaštitne karakteristike, stimuliraju aktivnost osteoblasta preko estrogenskih receptora ili povećanjem proizvodnje drugih osteoblastičnih čimbenika uključujući IGF-1; (4) prebiotička razgradnja fitinske kiseline i formiranja mineralnih kompleksa; i (5) povećanje ekspresije proteina koji vežu kalcij. Dodatno, prebiotici poboljšavaju zdravlje kostiju: (1) otpuštanjem čimbenika modulacije kostiju; (2) modulacijom čimbenika rasta; i (3) smanjenjem stope resorpcije kosti u odnosu na stopu stvaranja kosti, zbog antioksidativnog kapaciteta i antiupalne aktivnosti populacije crijevnih bakterija, kao što su *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* (309).

6.5 MALDI-TOF-MS analiza metabolita i lipida

Rezultati analize MALDI-TOF-MS-om ukazuju na promjene u metabolizmu aminokiselina, masti, glicerofosfolipida, glikosfingolipida, sfingolipida i steroida, te promjene u prepoznatim biljezima oksidativnog stresa u jetri i perigonadalnom masnom tkivu. Za opis i raspravu metaboličkih puteva kojima identificirani metaboliti pripadaju, korištena je baza KEGG (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; dostupno na: https://www.genome.jp/kegg/).

6.5.1 Utjecaj na jetru

Prvo je potrebno raspraviti utjecaj same ovarijektomije u OV skupini životinja na ispitivane metaboličke puteve. U tkivu jetre zabilježeno je nakupljanje S-adenozilmetioninamina koji je produkt razgradnje primarnog metabolita metionina S-adenozilmetionina. Povišene razine S-adenozilmetioninamina mogle bi ukazivati na pretjeranu metilaciju DNA u jetri koja je povezana s razvojem nealkoholne masne promjene jetre (310).

Zabilježeno je nakupljanje L-histidina u skupina AH, AL-X i AH-X u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Histidin je esencijalna aminokiselina koja ima važnu ulogu u pravilnom funkcioniranju mišića te sintezi histamina i posljedično intenzitetu imunološkog odgovora makrofaga (311). Dobivene rezultate podupiru prijašnja istraživanja gdje je pronađeno da ovarijektomija, odnosno gubitak estrogena, smanjuje aktivnost histidaze koja je katabolički enzim za histidin (312). No kako nije bilo razlike u količini histidina između kontrolne skupine i netretirane ovarijektomirane skupine, nakupljanje histidina može biti rezultat primjene alendronata ili kombinacije alendronata i ekstrakta hmelja. Moguće je da velika doza alendronata ili kombinacija alendronata i ekstrakta hmelja imaju negativan utjecaj na tkivo jetre metaboličkim opterećenjem, a istovremeno izostaje estrogeni poticaj na razgradnju histidina kroz enzim histidazu. Zanimljivo je da je jedan od produkata razgradnje histidina, β-alanil-N(pi)-metil-L-histidin (anserin) snižen u svim skupinama koje su primale ekstrakt hmelja (AL-X, AH-X i X) u odnosu na kontrolnu skupinu i netretiranu ovarijektomiranu skupinu, a također je bio snižen i u skupini koja je primala niske doze alendronata u odnosu na netretiranu ovarijektomiranu skupinu. Karnozin, koji je prekursor anserina, je aktivni antioksidans koji štiti tkiva od ROS-a (313). Smanjene razine oksidativnog stresa ne uzrokuju trošenje zaliha karnozina što ukazuje na drugi mogući razlog nakupljanja histidina i snižene razine anserina jer ne dolazi do sinteze karnozina niti njegove razgradnje. Još jedan od rezultata promjena u metabolizmu aminokiselina je snižena razina D-lizopina u skupinama AH, AL-X i X u odnosu na kontrolnu skupinu. D-lizopin je produkt razgradnje aminokiseline lizin, a snižene razine lizina u jetri znak su smanjene razgradnje proteina u organizmu (314). Osim smanjene razgradnje tkivnih proteina, niske razine D-lizopina mogu ukazivati na to da se rezerve lizina i hranom unesen lizin koriste u izgradnji kosti gdje je važan dio posttranslacijskih modifikacija kolagena (315). Povećanu izgradnju kosti u istim skupinama potvrđuju i rezultati koje smo dobili putem mikro CT analize. Osim histidina, značajan je i pad N-(L-arginino)sukcinata koji je jedan od metabolita ciklusa ureje. Pad razine uočen je u skupina AH, AL-X, AH-X i X u odnosu na kontrolnu skupinu i u skupina AH, AL-X i X u odnosu na netretiranu

ovarijektomiranu skupinu. To bi moglo ukazivati ili na smanjenje u deaminaciji aminokiselina ili povećanu potrošnju zbog sinteze aminokiseline arginina iz citrulina (316). Promjene razina dušikova oksida u serumu nisu bile statistički značajne što ukazuje na to da nije došlo do povećane potrebe za sintezom arginina i stvaranjem dušikova oksida. Istraživanja potvrđuju da smanjena aktivnost argininosukcinat sintaze (enzima koji proizvodi N-(L-arginino)sukcinat) smanjuju sintezu dušikova oksida i količinu oksidativnog stresa u alkoholnoj bolesti jetre (317). 5-S-cisteinil-DOPA bio je povišen u skupini AL-X u odnosu na K i OV skupinu. Navedeni spoj je produkt metabolizma tirozina, a služi kao serumski biljeg melanoma (318), no njegov značaj u tkivu jetre do sada nije istražen. U ovom su istraživanju zabilježene i niske razine tiroksina u jetri u skupini koja je primala samo ekstrakt hmelja u odnosu na skupine K i OV, te povišenu razinu u skupini AL-X u odnosu na skupinu OV. Deaktivacija i razgradnja tiroksina primarno se odvija u jetri (319). Također je pokazano da pod utjecajem estrogena jetra održava količine serumskog tiroksina bez dodatne aktivacije štitne žlijezde (320). Ovaj rezultat može značiti da ekstrakt hmelja fitoestrogenim utjecajem smanjuje unos tiroksina u jetru i njegovu razgradnju. Općenito, promjene u metabolizmu aminokiselina i hormona tiroksina pokazuju da nije došlo do štete uzrokovane oksidativnim stresom u jetri niti pod utjecajem alendronata niti ekstrakta hmelja, a ni njihovom kombinacijom i da ekstrakt hmelja smanjuje uklanjanje tiroksina iz krvi slično kao i estrogen.

U tkivu jetre nedostatak estrogena uzrokuje smanjenu beta oksidaciju masnih kiselina i posljedično smanjenu proizvodnju energetskih molekula (296). Količine palmitinske kiseline smanjene su u skupina AH, AL-X, AH-X i X u odnosu na skupine K i OV. Također su smanjene količine metabolita palmitinske kiseline L-palmitoil karnitina u skupini AH u odnosu na skupinu K i OV. Sukladno tome, povišene su razine stearinske kiseline u istoj skupini što može ukazivati na elongaciju palmitinske kiseline u stearinsku (321). Smanjene količine drugih masnih kiselina u tkivu jetre u odnosu na skupine K i OV upućuju na to da je smanjen unos masnih kiselina u jetru te da se one preusmjeravaju drugdje. Dio masnih kiselina je vjerojatno preusmjeren u masno tkivo, dok se dio masnih kiselina može unositi u osteoblaste (322) ili metabolizirati drugdje. Zanimljivo je da je u skupina u kojima je smanjena količina masnih kiselina u tkivu jetre uglavnom bila povećana razina kolesterola u serumu, a razina triglicerida nije se značajno promijenila. Potrebno je dodatno istražiti koji metabolički putevi su pod utjecajem ispitivanih tvari. Potencijalno zabrinjavajući dio promjena u metabolizmu masti su povišene razine arahidonske kiseline i njezinog metabolita (2,3-dinor-8-izo prostaglandin F2α) u skupini AL-X u odnosu na skupinu OV jer je pokazano da je arahidonska kiselina rani

pokazatelj nastanka upale u nealkoholnoj masnoj promjeni jetre (323). No ta razlika je zabilježena samo u odnosu na skupinu OV, ali ne i skupinu K što zahtijeva dodatno istraživanje, tim više što ovarijektomija i u ljudi i životinja zapravo pogoduje razvoju nealkoholne bolesti jetre i masnih promjena u jetri općenito, a nadomjestak estrogena, fitoestrogeni, pa čak i alendronat djeluju protektivno na jetru, kao što je objašnjeno u potpoglavlju 6.3 (324–326).

Dva pokazatelja metabolizma sfingolipida u jetri (sfinganin i galaktozil-sfingozin) su izmijenjeni u odnosu na skupine K i OV. Sfinganin je značajno snižen u skupini AH u odnosu na skupine K i OV, a u skupini X sfinganin i galakzotil-sfingozin su sniženi u odnosu na skupine K i OV. Galaktozil-sfingozin je povišen u jetri i slezeni kod Gaucherove bolesti (327). U skupinama AL-X i AH-X sfinganin je povišen u odnosu na skupinu K. Sfinganin je prekursor za nastanak niza sfingolipida (ceramida, fosfoetanolamina, sfingomijelina i galaktozil-sfingozina) stoga je teško zaključivati o značajnosti njegove promjene. Smanjeni metaboliti glicerofosfolipida (3-(O-geranilgeranil)-sn-glicerol-1-fosfat, 2,3-bis-(O-ftanil)-sn-glicerol-1-fosfat, 2,3-bis-O-(geranilgeranil)-sn-glicero-1-fosfo-L-serin) su svi dio istog metaboličkog lanca. Mogući razlog njihovog smanjenja je smanjena razgradnja triglicerida u jetri u ovarijektomiranih životinja koje su primale ispitivane tvari, što je vidljivo iz smanjene količine prisutnih masnih kiselina u jetri. To je u skladu i s rezultatima mjerenja količine triglicerida u tkivu jetre, mada je nejasno zbog čega nije zabilježena ista razlika metaboliti glicerofosfolipida i količine triglicerida kad se usporede skupine K i OV.

Direktni metaboliti steroida estrona (estron 3-sulfat i estron glukuronid) bili su sniženi u svih skupina koje su primale alendronat ili ekstrakt hmelja ili njihovu kombinaciju u odnosu na skupinu OV, a u skupini AL-X i u odnosu na skupinu K. Estron je dominantan estrogen u postmenopauzi, jer se njegove razine ne smanjuju toliko kao estradiola (59), no uklanjanje jajnika u postmenopauzi ne utječe značajno na njegovu razinu u serumu (328, 329). Poznato je da fitoestrogeni inhibiraju aktivnost aromataze i drugih enzima uključenih u sintezu spolnih hormona, što može biti jedan od razloga niže razine metabolita estrona, a osim toga djeluju i na razine globulina za koje se vežu estrogeni u krvi (110). S obzirom na navedeno i da estron-3-sulfat nastaje pretvorbom estrona te može služiti kao zaliha estrona u krvi i tkivima (330), bez dodatnih analiza ne može se s sigurnošću imenovati uzrok spomenute promjene. Nije opisano kako alendronat djeluje na razine estrona u organizmu. Androstan-3α,17β-diol je metabolit dihidrotestosterona i neposredni prekursor androsterona. Snižene razine u AL-X skupini ukazuju na snižene razine ili sniženi metabolizam testosterona i dihidrotestosterona. Mogući razlog sniženog metabolizma testosterona je povećana sinteza globulina koji vežu

spolne hormone (331) što održava količinu testosterona i estrona u krvi. 4α-karboksi-stigmasta-7,24(24(1))-dien-3β-ol je vjerojatno egzogenog podrijetla stoga se ne može koristiti za procjenu utjecaja ispitivanih tvari.

γ-L-glutamil-L-2-aminobutirilglicin ili oftalmat je endogeni analog glutationa koji se sintetizira u jetri kada su zalihe glutationa potrošene, a dostupnost cisteina je snižena (332). Razine oftalmata bile su snižene u gotovo svih skupina koje su primale ekstrakt hmelja u odnosu na skupinu K (AL-X, AH-X i X) i skupinu OV (AL-X i X), što može ukazivati na manje oksidativnog oštećenja jetre u tim skupinama, no to nije potvrđeno rezultatima izvršenih analiza oksidativnog stresa, stoga je moguće da postoji neki drugi uzrok. Zanimljivo je da je visoka doza alendronata također uzrokovala snižene razine oftalamata u odnosu na skupine K i OV. Alendronat smanjuje oksidativni stres u adipocitima (333), moguće je da ima sličan utjecaj i na jetru.

6.5.2 Utjecaj na perigonadalno masno tkivo

MALDI-TOF-MS analizom zapažene su različite promjene u pokazateljima metabolizma masti, glicerofosfolipida i biljezima oksidativnog stresa u ovarijektomiranoj netretiranoj skupini. U toj su skupini zabilježene povišene razine palmitaldehida, što ukazuje na povećan metabolizam masti u toj skupini. Nakupljanje metabolita palmitinske kiseline u masnim stanicama u skladu je s istraživanjima koja povezuju ovarijektomiju s debljanjem u štakora (187). S druge strane, snižene su količine eikozanoidne kiseline koja nastaje elongacijom palmitinske kiseline što vjerojatno znači da palmitinska kiselina umjesto u elongaciju ili β-oksidaciju odlazi u razgradnju, odnosno nakupljanje palmitaldehida. Također je bila povišena i razina metabolita arahidonske kiseline 2,3-dinor-8-izo-prostaglandina F2α koji se smatra pokazateljem lipidne peroksidacije (334). Takav rezultat se podudara s visokim razinama γ-L-glutamil-L-2-aminobutirilglicina koji je ekvivalent glutationa i (R)-S-laktoilglutationa koji može poslužiti kao prekursor glutationa u mitohondrijima (332, 335). Također su zabilježene i snižene količine metabolita diacetilheptaprenilglicerola koji je završni korak u razgradnji glicerofosfolipida, što ukazuje na sniženu stopu razgradnje triglicerida. Steroidi, njihovi metaboliti, metabolizam aminokiselina i metabolizam glikosfingolipida i sfingolipida u masnim stanicama nisu bili značajno promijenjeni utjecajem ovarijektomije.

Metaboliti aminokiselina u perigonadalnom masnom tkivu su promijenjeni u tretiranih skupina. Količine D-lizopina (metabolit aminokiseline lizin) su povišene u skupini koja je primala ekstrakt hmelja u odnosu na skupine K i OV. To ukazuje na povećanje u metabolizmu

te aminokiseline u perigonadalnom masnom tkivu. Isti metabolit je snižen u jetri u istoj skupini što može navesti na zaključak da se, osim što se lizin vjerojatno koristi za posttranslacijske modifikacije kolagena (315), također pojačano razgrađuje u masnom tkivu u toj skupini. Osim D-lizopina, povišene su i količine N6-(L-1,3-dikarboksipropil)-L-lizina, koji je isto pokazatelj razgradnje lizina, u skupini AL-X u odnosu na skupinu K. Smanjene razine tiroksina u skupinama AH i X u odnosu na skupine K i OV i skupini AH-X u odnosu na skupinu OV ukazuju na smanjenu količinu dostupnog tiroksina. U kontekstu ranije spomenutih rezultata promjene količine tiroksina u jetri, postoji mogućnost da je aktivnost štitne žlijezde smanjena i da to uzrokuje smanjene količine tiroksina u krvi osim prethodno spomenute mogućnosti da jetra održava količine tiroksina u krvi kroz poticaj estrogena (i fitoestrogena) (320). Na temelju dostupnih podataka ne možemo donositi zaključke o aktivnosti štitne žlijezde, no, pošto rezultati pokazuju znatne promjene u metabolizmu masti, bilo bi zanimljivo u budućim istraživanjima uključiti i analizu funkcije štitne žlijezde ovisno o primjeni ispitivanih tvari.

Od značajnijih metabolita masti, smanjene su količine palmitaldehida u skupinama AH i AL-X u odnosu na skupine K i OV što korelira s rastom količina L-palmitoil karnitina. L-palmitoil karnitin je početni korak u ulasku palmitinske kiseline u β-oksidaciju masnih kiselina. Ovaj rezultat upućuje na smanjenje razgradnje palmitinske kiseline putem palmitaldehida i usmjeravanje u β-oksidaciju masnih kiselina te moguće povećanje metaboličke aktivnosti adipocita. Količine L-palmitoil karnitina su također povišene u skupini X u odnosu na skupine K i OV što upućuje na isti zaključak. Usporedno tome, zamijećeno je smanjenje adipocita u skupini X histološkom analizom perigonadalnog masnog tkiva. Uočeno je i povećanje u količini leukotriena D4 u skupini AH i AL-X u odnosu na skupinu K, a u skupini X u odnosu na skupine K i OV. Leukotrien D4 je proupalni čimbenik kojeg luče adipociti, a povezuje se s inzulinskom rezistencijom, pretilosti i upalom u masnom tkivu (336). Taj rezultat ukazuje na moguć negativni utjecaj primjenjivanih tvari, međutim, to nije vjerojatno jer brojna istraživanja pokazuju na povezanost nedostatka estrogena s povišenim upalnim odgovorom u masnom tkivu i na protektivni učinak raznih fitoestrogena u eksperimentalnim uvjetima (337). Također, i alendronat ima protektivan učinak na masno tkivo smanjivanjem oksidativnog stresa i upale (333). Međutim, svakako bi trebalo dodatno istražiti upalni status perigonadalnog masnog tkiva (histološka analiza makrofaga ili biokemijska analiza ostalih proupalnih citokina) prilikom primjene kombinacije alendronata i ekstrakta hmelja, da bi se moglo pažljivije zaključivati o stanju upale u perigonadalnom masnom tkivu.

Primijećen je i rast u produktima razgradnje sfinganina (fitosfingozina, sfinganin 1-fosfata) i sfingonina (sfingozin 1-fosfata) u skupinama AH, AH-X i X u odnosu na skupine K i OV. Također, zabilježen je i pad u toksičnim produktima metabolizma glikosfingolipida (galaktozil-sfingozina) u skupini X u odnosu na skupinu OV. Uočena je snižena količina diacetilheptaprenilglicerola u skupinama AH, AL-X i X u odnosu na skupinu K koji je završni korak u razgradnji glicerofosfolipida što može ukazivati na sniženu stopu razgradnje ili nakupljanja triglicerida u perigonadalnom masnom tkivu (246, 333).

Od značajnih steroida i njihovih metabolita, bitne su promijene u estronu i njegovim derivatima. Količine estrona bile su povišene u skupini X u odnosu na skupinu OV, a njegovog direktnog metabolita estron glukuronida u skupini AH u odnosu na skupine K i OV. To ukazuje na poveću aktivnost estrona u tim skupinama.

Uočene su promijene γ-L-glutamil-L-2-aminobutirilglicina (oftalmata) koji je ekvivalent glutationa i (R)-S-laktoilglutationa koji može poslužiti kao prekursor glutationa u mitohondrijima (332, 335). Oftalmat je povišen u skupini X u odnosu na skupinu K, a (R)-S-laktoilglutation je povišen u skupini AH u odnosu na skupinu K, a snižen u skupini AL-X i AH-X u odnosu na skupinu OV. Povećanje u skupini X korelira s količinama leukotriena D4 što opet ukazuje na mogućnost upalnog procesa u perigonadalnom masnom tkivu te skupine životinja. Laktoilglutation ukazuje na antioksidativnu aktivnost komponenti ekstrakta hmelja u kombinaciji s alendronatom, ali neobično je što koncentracije oftalmata ne prate zabilježene količine laktoilglutationa. Zbog toga nije moguće samo na temelju ovih rezultata zaključivati o nastanku oksidativnog stresa u spomenutih skupina. Sveukupno gledano, promjene zabilježene MALDI-TOF-MS analizom dobra su polazišna točka za nova istraživanja u budućnosti, koja svakako treba povezati ne samo s laboratorijskim i morfološkim promjenama ispitivanih životinja, već i s kliničkim aspektima osteoporoze, metaboličkog sindroma i drugih posljedica oksidativnog stresa i upale.

6.6. Implikacije dobivenih rezultata i mogućnosti daljnjih istraživanja

Ovim istraživanjem prikupljeni su vrijedni podaci o utjecaju visoke i niske doze alendronata, ekstrakta hmelja i njihove kombinacije na kvalitetu i pregradnju kosti te na razinu oksidativnog stresa, morfološka obilježja organa osjetljivih na estrogen i oksidativni stres te dodatna obilježja eksperimentalnih životinja kao što su hematološke i biokemijske odrednice krvi korištenjem ovarijektomijskog modela osteoporoze u štakora.

Potvrđeni su otprije poznati povoljni učinci alendronata i ekstrakta hmelja, no po prvi put su dobiveni podaci nakon primjene kombinacije visoke ili niske doze alendronata s ekstraktom hmelja. S obzirom da je kombinacija niske doze alendronata s ekstraktom hmelja imala jednako snažan učinak kao i monoterapija visokom dozom alendronata, odnosno ekstraktom hmelja, svakako je opravdano nastaviti istraživanja primjene nižih doza alendronata u kombinaciji s ekstraktom hmelja radi mogućeg smanjenja učestalosti i jačine štetnih učinaka povezanih s primjenom alendronata. Slično istraživanje moglo bi se provesti i s kombinacijom ekstrakta hmelja i drugih bisfosfonata. Ekstrakt hmelja je sam za sebe pokazao istovjetan ili čak malo bolji učinak na ispitivane parametre kosti, što dodatno opravdava buduća istraživanja korištenja ekstrakta hmelja u liječenju osteoporoze (tim više što je 8PN jedan od najpotentnijih do sad otkrivenih fitoestrogena). Osim moguće terapeutske primjene 8PN-a u oboljelih od osteoporoze, dobro je razmotriti i mogućnost i korištenja te molekule kao osnove za razvoj još potentnijih molekula u terapijske svrhe, kao u slučaju SERM-ova koji se već uspješno primjenjuju u terapiji osteoporoze i karcinoma (raloksifen, tamoksifen i toremifen) (122).

S obzirom da kombinacija visoke doze alendronata i ekstrakta hmelja nije imala povoljan utjecaj na kvalitetu kosti, već su se učinci visoke doze alendronata i ekstrakta hmelja međusobno poništili, potrebno je dodatno istražiti ovaj fenomen i podležeće molekularne mehanizme, jer bi razumijevanje te pojave moglo doprinijeti budućem planiranju kombinirane terapije, određivanje prihvatljivog raspona doza te možda i razvoj sasvim novih metoda liječenja osteoporoze. Promjene različitih metabolita u tkivu jetre i perigonadalnog masnog tkiva mogle bi biti „odskočna daska“ za nova istraživanja utjecaja ispitivanih tvari na metabolizam i stanične procese. Također, kako je navedeno u pojedinim potpoglavljima rasprave, pojedine ispitivane odrednice bilo bi dobro ispitati nakon dugoročne terapije te u različitim vremenskim točkama tijekom same primjene, jer bi se time moglo još bolje pratiti biljege pregradnje kosti, oksidativnog stresa i metabolizma.

Općenito uzevši, ovo je istraživanje pokazalo da je na životinjskom modelu primjena ispitivanih tvari i njihovih kombinacija sigurna jer, između ostalog, nije uzrokovala proliferaciju tkiva maternice koja se povezuje s povećanim rizikom maligne alteracije kod primjene nadomjesne terapije estrogenom niti druga morfološka oštećenja organa, bitne promjene hematoloških i biokemijskih odrednica krvi, odnosno seruma, ni povećani oksidativni stres.

Ovo istraživanje moglo bi biti važna polazna točka za daljnje ispitivanje mogućnosti uključivanja ekstrakta hmelja u obliku monoterapije ili kombinirane terapije u liječenje osteoporoze i drugih postmenopauzalnih tegoba povezanih s manjkom estrogena i povećanom razinom oksidativnog stresa u organizmu. Osim toga, s obzirom da se ekstrakt hmelja uz odgovarajuću tehnologiju može dobiti iz nusproizvoda u prehrambenoj industriji i proizvodnji piva, moglo bi se raditi i na proizvodnji funkcionalne hrane s ekstraktom hmelja za ljudsku primjenu.

7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Primjena visoke doze alendronata, ekstrakta hmelja i kombinacije niske doze alendronata s ekstraktom hmelja dovodi do značajnog poboljšanja kvalitete kosti ovarijektomiranih štakora. Ekstrakt hmelja i kombinacija niske doze alendronata s ekstraktom hmelja imale su jednako snažan učinak kao i monoterapija visokom dozom alendronata, dok kombinacija visoke doze alendronata i ekstrakta hmelja nije imala povoljan utjecaj. Razine pokazatelja pregradnje kosti nisu se značajno razlikovale, osim povišene razine P1NP-a u skupini koja je primala visoku dozu alendronata.
- Primjena ispitivanih tvari nije uzrokovala značajan oksidativni stres niti u jednoj eksperimentalnoj skupini.
- Niti jedna od ispitivanih tvari, odnosno njihovih kombinacija, nije imala utjecaj na histomorfološka obilježja maternice u ovarijektomiranih životinja, proliferaciju stanica u endometriju maternice, niti na nakupljanje veziva u tkivu jetre. Skupina tretirana ekstraktom hmelja imala je manje adipocite u perigonadalnom masnom tkivu.
- Ispitivane tvari u određenoj mjeri utječu na hematološka i biokemijske pokazatelje krvi štakora, ali ne dovode do značajnih odstupanja od referentnih vrijednosti. Razine kolesterola u krvi povišene su u skupinama koje su primala ekstrakt hmelja, a razina triglicerida je niža u tkivu jetre svih ovarijektomiranih skupina u odnosu na netretiranu ovarijektomiranu skupinu.
- Primjenjivane tvari su utjecale na metabolizam aminokiselina, masnih kiselina, steroida, glicerofosfolipida i sfingolipida u jetri i perigonadalnom masnom tkivu.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja. Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj alendronata, ekstrakta hmelja i njihove kombinacije na kvalitetu kosti, oksidativno oštećenje i histološku građu organa životinja te promijene u metaboličkim, hematološkim i biokemijskim odrednicama ovarijektomiranih štakora kao modela osteoporoze.

Nacrt studije. Studija je ustrojena kao randomizirani kontrolirani pokus proveden na ovarijektomijskom modelu osteoporoze štakora.

Materijali i metode. Istraživanje je izvedeno na štakoricama soja Wistar starosti 6 mjeseci. U 10 životinja provedene je placebo operacija (kontrolna skupina), a u ostalih 60 bilateralna ovarijektomija. Ovarijektomirane životinje raspoređene su u 6 skupina od kojih je jedna bila netretirana, a ostalih 5 je primalo niske doze alendronata, visoke doze alendronata, ekstrakt hmelja ili kombinacije niske/visoke doze alendronata i ekstrakta hmelja. Provedene su analize hematoloških i biokemijskih odrednica krvi, kvalitete kosti (mikro CT, western blot serumskih biljega pregradnje), histološka analiza organa, biljezi oksidativnog stresa i MALDI-TOF-MS analiza masnog tkiva i jetre.

Rezultati. Primjena visoke doze alendronata, ekstrakta hmelja i kombinacija niske doze alendronata i ekstrakta hmelja značajno je poboljšala kvalitetu kosti u ovarijektomiranih životinja. Razine pokazatelja pregradnje kosti nisu se značajno razlikovale, osim povišene razine P1NP-a u skupini koja je primala visoku dozu alendronata. Pokazatelji oksidativnog oštećenja nisu se značajno razlikovali u ispitivanih skupina. Ispitivane tvari nisu uzrokovale nakupljanje vezivnog tkiva u jetri, morfološke promjene maternica ovarijektomiranih životinja, niti proliferaciju stanica endometrija. Adipociti su bili manji u skupini koja je primala samo ekstrakt hmelja. Ispitivane tvari su u određenoj mjeri utjecale na hematološka i biokemijska obilježja životinja, ali nije uočen štetni učinak. Kolesterol u serumu bio je povišen u skupinama koje su primale ekstrakt hmelja, a razine triglicerida u jetri bile su snižene u svih ovarijektomiranih skupina u odnosu na netretiranu ovarijektomiranu skupinu. MALDI-TOF-MS analiza ukazala je na promijene u metabolizmu jetre i perigonadalnog masnog tkiva u svih eksperimentalnih skupina.

Zaključak. Terapija visokom dozom alendronata, ekstraktom hmelja i kombinacijom niske doze alendronata i ekstrakta hmelja povoljno utječe na kvalitetu kosti u ovarijektomiranih životinja bez značajnih štetnih učinaka.

Ključne riječi: koštano tkivo; osteoporoza; *Humulus lupulus*; fitoestrogeni; alendronat; ovarijektomija

9. SUMMARY

Title. Therapeutic effect of phytoestrogens from hop extract in combination with alendronate on the female Wistar rat model of osteoporosis

Study objective. The objective of this research was to evaluate the efficacy of alendronate, hops extract and their combination on bone tissue quality, oxidative stress damage, organ histomorphology, changes in metabolism, hematological parameters, and biochemical parameters in a rat model of osteoporosis.

Study design. The study was designed as a randomized controlled experiment on the rat ovariectomy model of osteoporosis.

Materials and methods. The study was performed on 6 months old female Wistar rats. A sham operation was done on 10 animals, and bilateral ovariectomy on 60 animals. Ovariectomized animals were divided into 6 groups from which one was not treated while the rest was treated with a low dose of alendronate, high dose of alendronate, hops extract, or a combination of low/high dose of alendronate and hops extract. Analyses of hematological and biochemical blood parameters, bone tissue quality (micro CT, western blot of serum bone turnover markers), organ histomorphology, oxidative stress markers, and MALDI-TOF-MS analysis of adipose tissue and liver were performed.

Results. Administration of a high dose of alendronate, hop extract, or combination of low dose alendronate and hop extract significantly improved bone quality in ovariectomized animals. The levels of bone remodeling indicators did not differ significantly, except for the increased level of P1NP in the group that received a high dose of alendronate. Indicators of oxidative damage did not differ significantly in the examined groups. The tested substances did not cause accumulation of connective tissue in the liver, morphological changes in the uteri of ovariectomized animals, or proliferation of endometrial cells. Adipocytes were smaller in the group that received only hop extract. The tested substances affected the hematological and biochemical characteristics of the animals to a certain extent, but no adverse effect was observed. Serum cholesterol was elevated in the treated with hops extract, and liver triglyceride levels were decreased in all ovariectomized groups compared to the untreated ovariectomized group. MALDI-TOF-MS analysis indicated changes in the metabolism of the liver and perigonadal adipose tissue in all experimental groups.

Conclusion. Therapy with a high dose of alendronate, hops extract or a combination of a low dose of alendronate and hop extract favorably affects bone quality in ovariectomized animals without significant adverse effects.

Keywords: bone tissue; osteoporosis; *Humulus lupulus*; phytoestrogens; alendronate; ovariectomy

10. **LITERATURA**

1. Rossini M, Adami S, Bertoldo F, Diacinti D, Gatti D, Giannini S, i sur. Guidelines for the diagnosis, prevention and management of osteoporosis. Reumatismo. 2016;68(1):1–39.
2. Akkawi I, Zmerly H. Osteoporosis: Current Concepts. Joints. 2018;6(2):122–7.
3. Stein E, Shane E. Secondary osteoporosis. Endocrinol Metab Clin North Am. 2003;32(1):115–34.
4. Sozen T, Ozisik L, Calik Basaran N. An overview and management of osteoporosis. Eur J Rheumatol. 2017;4(1):46–56.
5. Kanis JA (u ime WHOSG). Assessment of osteoporosis at the primary health-care level. Technical Report on behalf of the World Health Organization Scientific Group. Sheffield; 2007.
6. Salari N, Ghasemi H, Mohammadi L, Behzadi MH, Rabieenia E, Shohaimi S, i sur. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis. J Orthop Surg Res. 2021;16(1):609.
7. Kanis JA, Borgström F, Compston J, Dreinhöfer K, Nolte E, Jonsson L, i sur. SCOPE: a scorecard for osteoporosis in Europe. Arch Osteoporos. 2013;8(1–2):144.
8. Kanis JA, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, i sur. SCOPE 2021: a new scorecard for osteoporosis in Europe. Arch Osteoporos. 2021;16(1):1–82.
9. Willers C, Norton N, Harvey NC, Jacobson T, Johansson H, Lorentzon M, i sur. Osteoporosis in Europe: a compendium of country-specific reports. Arch Osteoporos. 2022;17(1):23.
10. Melton LJ, Achenbach SJ, Atkinson EJ, Therneau TM, Amin S. Long-term mortality following fractures at different skeletal sites: a population-based cohort study. Osteoporos Int. 2013;24(5):1689–96.
11. Melton LJ. Adverse Outcomes of Osteoporotic Fractures in the General Population. J Bone Miner Res. 2003;18(6):1139–41.

12. Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. Osteoporos Int. 2006;17(12):1726–33.

13. Rashki Kemmak A, Rezapour A, Jahangiri R, Nikjoo S, Farabi H, Soleimanpour S. Economic burden of osteoporosis in the world: A systematic review. Med J Islam Repub Iran. 2020;34(1):154.

14. Gutiérrez L, Roskell N, Castellsague J, Beard S, Rycroft C, Abeysinghe S, i sur. Study of the incremental cost and clinical burden of hip fractures in postmenopausal women in the United Kingdom. J Med Econ. 2011;14(1):99–107.

15. Stavnichuk M, Mikolajewicz N, Corlett T, Morris M, Komarova S V. A systematic review and meta-analysis of bone loss in space travelers. NPJ microgravity. 2020;6(1):13.

16. Dittmer DK, Teasell R. Complications of immobilization and bed rest. Part 1: Musculoskeletal and cardiovascular complications. Can Fam Physician. 1993;39:1428–32, 1435–7.

17. Matikainen N, Pekkarinen T, Ryhänen EM, Schalin-Jäntti C. Physiology of Calcium Homeostasis: An Overview. Endocrinol Metab Clin North Am. 2021;50(4):575–90.

18. Zhu K, Prince RL. Lifestyle and Osteoporosis. Curr Osteoporos Rep. 2015;13(1):52–9.

19. Feng X. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. Curr Chem Biol. 2009;3(2):189–96.

20. Morgan S, Poundarik AA, Vashishth D. Do Non-collagenous Proteins Affect Skeletal Mechanical Properties? Calcif Tissue Int. 2015;97(3):281–91.

21. Duvall CL, Taylor WR, Weiss D, Wojtowicz AM, Guldberg RE. Impaired Angiogenesis, Early Callus Formation, and Late Stage Remodeling in Fracture Healing of Osteopontin-Deficient Mice. J Bone Miner Res. 2006;22(2):286–97.

22. Hu L, Yin C, Zhao F, Ali A, Ma J, Qian A. Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. Int J Mol Sci. 2018;19(2):360.

23. Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. Differentiation. 2016;92(1–2):41–51.

24. Hu R, Ling W, Xu W, Han D. Fibroblast-Like Cells Differentiated from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Vocal Fold Wound Healing. Zhou Z, editor. PLoS One. 2014;9(3):e92676.

25. Tong Z, Sant S, Khademhosseini A, Jia X. Controlling the Fibroblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Via the Combination of Fibrous Scaffolds and Connective Tissue Growth Factor. Tissue Eng Part A. 2011;17(21–22):2773–85.

26. Shalhoub V, Gerstenfeld LC, Collart D, Lian JB, Stein GS. Down-regulation of cell growth and cell cycle regulated genes during chick osteoblast differentiation with the reciprocal expression of histone gene variants. Biochemistry. 1989;28(13):5318–22.

27. Stein SG, Lian BJ, Gerstenfeld GL, Victoria S, Michael A, Thomas O, i sur. The Onset and Progression of Osteoblast Differentiation is Functionally Related to Cellular Proliferation. Connect Tissue Res. 1989;20(1–4):3–13.

28. Larrouture QC, Nelson DJ, Robinson LJ, Liu L, Tourkova I, Schlesinger PH, i sur. Chloride-hydrogen antiporters ClC-3 and ClC-5 drive osteoblast mineralization and regulate fine-structure bone patterning in vitro. Physiol Rep. 2015;3(11):e12607.

29. Rasmussen H, Bordier P. The Cellular Basis of Metabolic Bone Disease. N Engl J Med. 1973;289(1):25–32.

30. Walker DG. Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells. Science. 1975;190(4216):784–5.

31. Walker DG. Osteopetrosis Cured by Temporary Parabiosis. Science. 1973;180(4088):875–875.

32. Teitelbaum SL. Osteoclasts: What Do They Do and How Do They Do It? Am J Pathol. 2007;170(2):427–35.

33. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, i sur. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. Endocrinology. 1988;122(4):1373–82.

34. Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. Endocr Rev. 1992;13(1):66–80.

35. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, i sur. Commitment and Differentiation of Osteoclast Precursor Cells by the Sequential Expression of C-Fms and Receptor Activator of Nuclear Factor κb (Rank) Receptors. J Exp Med. 1999;190(12):1741–54.

36. Novack D, Teitelbaum S. The osteoclast: Friend or foe? Annu Rev Pathol Mech Dis. 2008;3(1):457–84.

37. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast–osteoclast interactions. Connect Tissue Res. 2018;59(2):99–107.

38. Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. Proc Natl Acad Sci. 2008;105(52):20764–9.

39. Allen MR, Burr DB. Bone Modeling and Remodeling. Basic and Applied Bone Biology. Elsevier; 2014. 75–90.

40. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. Bonekey Rep. 2014;3:481.

41. Arthur A, Gronthos S. Eph-Ephrin Signaling Mediates Cross-Talk Within the Bone Microenvironment. Front Cell Dev Biol. 2021;9.

42. Matsuoka K, Park K, Ito M, Ikeda K, Takeshita S. Osteoclast-Derived Complement Component 3a Stimulates Osteoblast Differentiation. J Bone Miner Res. 2014;29(7):1522–30.

43. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, i sur. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(9):3324–9.

44. Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, Park K ae, Aburatani H, Kato S, i sur. Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation. J Clin Invest. 2013;123(9):3914–24.

45. Ishii M, Egen JG, Klauschen F, Meier-Schellersheim M, Saeki Y, Vacher J, i sur. Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. Nature. 2009;458(7237):524–8.

46. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor-β1: Tale of a strained relationship. Matrix Biol. 2015;47:54–65.

47. Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, i sur. TGF-β1–induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. Nat Med. 2009;15(7):757–65.

48. Bautista CM, Mohan S, Baylink DJ. Insulin-like growth factors I and II are present in the skeletal tissues of ten vertebrates. Metabolism. 1990;39(1):96–100.

49. Li H, Xiao Z, Quarles LD, Li W. Osteoporosis: Mechanism, Molecular Target and Current Status on Drug Development. Curr Med Chem. 2021;28(8):1489–507.

50. Babić Leko M, Pleić N, Gunjača I, Zemunik T. Environmental Factors That Affect Parathyroid Hormone and Calcitonin Levels. Int J Mol Sci. 2021;23(1):44.

51. Bidlingmaier M, Strasburger CJ. Growth Hormone. Handbook of experimental pharmacology. Handb Exp Pharmacol; 2009. 187–200.

52. Yanagi S, Sato T, Kangawa K, Nakazato M. The Homeostatic Force of Ghrelin. Cell Metab. 2018;27(4):786–804.

53. Olney RC. Regulation of bone mass by growth hormone. Med Pediatr Oncol. 2003;41(3):228–34.

54. Laurent MR, Dedeyne L, Dupont J, Mellaerts B, Dejaeger M, Gielen E. Age-related bone loss and sarcopenia in men. Maturitas. 2019;122:51–6.

55. Khosla S, Monroe DG. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. Cold Spring Harb Perspect Med. 2018;8(1):a031211.

56. Narla RR, Ott SM. Bones and the sex hormones. Kidney Int. 2018;94(2):239–42.

57. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. J Am Acad Dermatol. 2001;45(3):S116–24.

58. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. Adv Protein Chem Struct Biol. 2019;116:135–70.

59. Denver N, Khan S, Homer NZM, MacLean MR, Andrew R. Current strategies for quantification of estrogens in clinical research. J Steroid Biochem Mol Biol. 2019;192:105373.

60. Blakemore J, Naftolin F. Aromatase: Contributions to physiology and disease in women and men. Physiology. 2016;31(4):258–69.

61. Jensen E V., Suzuki T, Kawashima T, Stumpf WE, Jungblut PW, DeSombre ER. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. Proc Natl Acad Sci. 1968;59(2):632–8.

62. Jensen E V., DeSombre ER, Kawashima T, Suzuki T, Kyser K, Jungblut PW. Estrogen-Binding Substances of Target Tissues. Science. 1967;158(3800):529–30.

63. Pettersson K, Gustafsson JÅ. Role of Estrogen Receptor Beta in Estrogen Action. Annu Rev Physiol. 2001;63(1):165–92.

64. Luo J, Liu D. Does GPER Really Function as a G Protein-Coupled Estrogen Receptor in vivo? Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:148.

65. Barton M, Filardo EJ, Lolait SJ, Thomas P, Maggiolini M, Prossnitz ER. Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. J Steroid Biochem Mol Biol. 2018;176:4–15.

66. Gonzalez de Valdivia E, Sandén C, Kahn R, Olde B, Leeb-Lundberg LMF. Human G protein-coupled receptor 30 is N -glycosylated and N-terminal domain asparagine 44 is required for receptor structure and activity. Biosci Rep. 2019;39(2).

67. Gao S, Chen S, Han D, Wang Z, Li M, Han W, i sur. Chromatin binding of FOXA1 is promoted by LSD1-mediated demethylation in prostate cancer. Nat Genet. 2020;52(10):1011–7.

68. Hewitt SC, Li L, Grimm SA, Winuthayanon W, Hamilton KJ, Pockette B, i sur. Novel DNA Motif Binding Activity Observed In Vivo With an Estrogen Receptor α Mutant Mouse. Mol Endocrinol. 2014;28(6):899–911.

69. Ahlbory-Dieker DL, Stride BD, Leder G, Schkoldow J, Trölenberg S, Seidel H, i sur. DNA Binding by Estrogen Receptor-α Is Essential for the Transcriptional Response to Estrogen in the Liver and the Uterus. Mol Endocrinol. 2009;23(10):1544–55.

70. Xiao Z, Yang X, Zhang K, Liu Z, Shao Z, Song C, i sur. Estrogen receptor α/prolactin receptor bilateral crosstalk promotes bromocriptine resistance in prolactinomas. Int J Med Sci. 2020;17(18):3174–89.

71. Majumdar S, Rinaldi JC, Malhotra NR, Xie L, Hu DP, Gauntner TD, i sur. Differential Actions of Estrogen Receptor α and β via Nongenomic Signaling in Human Prostate Stem and Progenitor Cells. Endocrinology. 2019;160(11):2692–708.

72. Hewitt SC, Winuthayanon W, Lierz SL, Hamilton KJ, Donoghue LJ, Ramsey JT, i sur. Role of ERα in Mediating Female Uterine Transcriptional Responses to IGF1. Endocrinology. 2017;158(8):2427–35.

73. Hoffmann DB, Griesel MH, Brockhusen B, Tezval M, Komrakova M, Menger B, i sur. Effects of 8-Prenylnaringenin and Whole-Body Vibration Therapy on a Rat Model of Osteopenia. J Nutr Metab. 2016;2016:6893137.

74. Albright F. Post-menopausal osteoporosis. Trans Assoc Am Physicians. 1940;55:298–305.

75. Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. Trends Endocrinol Metab. 2012;23(11):576–81.

76. Noirrit-Esclassan E, Valera MC, Tremollieres F, Arnal JF, Lenfant F, Fontaine C, i sur. Critical Role of Estrogens on Bone Homeostasis in Both Male and Female: From Physiology to Medical Implications. Int J Mol Sci. 2021;22(4):1568.

77. Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. lancet Diabetes Endocrinol. 2017;5(11):898–907.

78. Kohn GE, Rodriguez KM, Hotaling J, Pastuszak AW. The History of Estrogen Therapy. Sex Med Rev. 2019;7(3):416–21.

79. Prentice RL, Anderson GL. The Women's Health Initiative: Lessons Learned. Annu Rev Public Health. 2008;29(1):131–50.

80. Liang J, Shang Y. Estrogen and Cancer. Annu Rev Physiol. 2013;75(1):225–40.

81. Jiao L, Machuki JO, Wu Q, Shi M, Fu L, Adekunle AO, i sur. Estrogen and calcium handling proteins: new discoveries and mechanisms in cardiovascular diseases. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2020;318(4):H820–9.

82. Dick IM, Devine A, Beilby J, Prince RL. Effects of endogenous estrogen on renal calcium and phosphate handling in elderly women. Am J Physiol Metab. 2005;288(2):E430–5.

83. Nie X, Jin H, Wen G, Xu J, An J, Liu X, i sur. Estrogen Regulates Duodenal Calcium Absorption Through Differential Role of Estrogen Receptor on Calcium Transport Proteins. Dig Dis Sci. 2020;65(12):3502–13.

84. Ensrud KE, Crandall CJ. Osteoporosis. Ann Intern Med. 2017;167(3):17–32.

85. LeBoff MS, Greenspan SL, Insogna KL, Lewiecki EM, Saag KG, Singer AJ, i sur. The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. Osteoporos Int. 2022;1–54.

86. Langdahl BL. Overview of treatment approaches to osteoporosis. Br J Pharmacol. 2021;178(9):1891–906.

87. Hattersley G, Dean T, Corbin BA, Bahar H, Gardella TJ. Binding Selectivity of Abaloparatide for PTH-Type-1-Receptor Conformations and Effects on Downstream Signaling. Endocrinology. 2016;157(1):141–9.

88. An KC. Selective Estrogen Receptor Modulators. Asian Spine J. 2016;10(4):787–91.

89. Nagai N, Ogata F, Otake H, Nakazawa Y, Kawasaki N. Design of a transdermal formulation containing raloxifene nanoparticles for osteoporosis treatment. Int J Nanomedicine. 2018;13:5215–29.

90. Kobza AO, Papaioannou A, Lau AN, Adachi JD. Romosozumab in the treatment of osteoporosis. Immunotherapy. 2020;12(13):965–81.

91. Cummings SR, Santora AC, Black DM, Russell RGG. History of alendronate. Bone. 2020;137:115411.

92. Porras AG, Holland SD, Gertz BJ. Pharmacokinetics of Alendronate. Clin Pharmacokinet. 1999;36(5):315–28.

93. Cremers S, Drake MT, Ebetino FH, Bilezikian JP, Russell RGG. Pharmacology of bisphosphonates. Br J Clin Pharmacol. 2019;85(6):1052–62.

94. Savino S, Toscano A, Purgatorio R, Profilo E, Laghezza A, Tortorella P, i sur. Novel bisphosphonates with antiresorptive effect in bone mineralization and osteoclastogenesis. Eur J Med Chem. 2018;158:184–200.

95. Bigi A, Boanini E. Calcium Phosphates as Delivery Systems for Bisphosphonates. J Funct Biomater. 2018;9(1):6.

96. Roij van Zuijdewijn C, Dorp W, Florquin S, Roelofs J, Verburgh K. Bisphosphonate nephropathy: A case series and review of the literature. Br J Clin Pharmacol. 2021;87(9):3485–91.

97. Barrionuevo P, Kapoor E, Asi N, Alahdab F, Mohammed K, Benkhadra K, i sur. Efficacy of Pharmacological Therapies for the Prevention of Fractures in Postmenopausal Women: A Network Meta-Analysis. J Clin Endocrinol Metab. 2019;104(5):1623–30.

98. Bauer DC, Abrahamsen B. Bisphosphonate Drug Holidays in Primary Care: When and What to Do Next? Curr Osteoporos Rep. 2021;19(2):182–8.

99. Zameer S, Najmi AK, Vohora D, Akhtar M. Bisphosphonates: Future perspective for neurological disorders. Pharmacol Reports. 2018;70(5):900–7.

100. Teixeira S, Santos MM, Fernandes MH, Costa-Rodrigues J, Branco LC. Alendronic Acid as Ionic Liquid: New Perspective on Osteosarcoma. Pharmaceutics. 2020;12(3):293.

101. Buranrat B, Bootha S. Antiproliferative and antimigratory activities of bisphosphonates in human breast cancer cell line MCF-7. Oncol Lett. 2019;18(2):1246.

102. Singh M, Gonegandla GS. Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws (BIONJ). J Maxillofac Oral Surg. 2020;19(2):162–7.

103. Park JH, Ko HJ. The Association between Treatment with Bisphosphonates and the Risk of Atrial Fibrillation: A Meta-Analysis of Observational Studies. Korean J Fam Med. 2022;43(1):69–76.

104. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. Mayo Clin Proc. 2008;83(9):1032–45.

105. Aki S, Eskiyurt N, Akarirmak U, Tüzün F, Eryavuz M, Alper S, i sur. Gastrointestinal side effect profile due to the use of alendronate in the treatment of osteoporosis. Yonsei Med J. 2003;44(6):961–7.

106. Oršolić N, Nemrava J, Jeleč Ž, Kukolj M, Odeh D, Jakopović B, i sur. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activities of Chrysin and Naringenin in a Drug-Induced Bone Loss Model in Rats. Int J Mol Sci. 2022;23(5):2872.

107. Ottaway ZV, Hammond C, Merritt S. Chemical injury caused by acute alendronic acid aspiration. Case Reports. 2014;2014(apr30 1).

108. Medsafe. Alendronate and Inflammatory Adverse Reactions. Dostupno na:https://www.medsafe.govt.nz/profs/puarticles/alendinflam.htm. Datum pristupa: 27.1.2023.

109. Bauer DC, Black D, Ensrud K, Thompson D, Hochberg M, Nevitt M, i sur. Upper gastrointestinal tract safety profile of alendronate: the fracture intervention trial. Arch Intern Med. 2000;160(4):517–25.

110. Domínguez-López I, Yago-Aragón M, Salas-Huetos A, Tresserra-Rimbau A, Hurtado-Barroso S. Effects of Dietary Phytoestrogens on Hormones throughout a Human Lifespan: A Review. Nutrients. 2020;12(8):2456.

111. Viggiani MT, Polimeno L, Di Leo A, Barone M. Phytoestrogens: Dietary Intake, Bioavailability, and Protective Mechanisms against Colorectal Neoproliferative Lesions. Nutrients. 2019;11(8):1709.

112. Desmawati D, Sulastri D. Phytoestrogens and Their Health Effect. Open access Maced J Med Sci. 2019;7(3):495–9.

113. Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, Kašparovský T. Isoflavones. Molecules. 2019;24(6):1076.

114. Rizzo G, Baroni L. Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets. Nutrients. 2018;10(1):43.

115. Thangavel P, Puga-Olguín A, Rodríguez-Landa JF, Zepeda RC. Genistein as Potential Therapeutic Candidate for Menopausal Symptoms and Other Related Diseases. Molecules. 2019;24(21):3892.

116. Tu Y, Yang Y, Li Y, He C. Naturally occurring coumestans from plants, their biological activities and therapeutic effects on human diseases. Pharmacol Res. 2021;169:105615.

117. Kuang W, Hu W, Ren H, Shao Y, Liu B. Plant derived coumestrol phytochemical targets human skin carcinoma cells by inducing mitochondrial-mediated apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of cell migration and invasion and modulation of m-TOR/PI3K/AKT signalling pathway. Saudi J Biol Sci. 2021;28(5):2739–46.

118. Kim SN, Ahn SY, Song HD, Kwon HJ, Saha A, Son Y, i sur. Antiobesity effects of coumestrol through expansion and activation of brown adipose tissue metabolism. J Nutr Biochem. 2020;76:108300.

119. Montero G, Arriagada F, Günther G, Bollo S, Mura F, Berríos E, i sur. Phytoestrogen coumestrol: Antioxidant capacity and its loading in albumin nanoparticles. Int J Pharm. 2019;562:86–95.

120. Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C, Toledo E, Delgado-Rodríguez M, Gaforio J. Naturally Lignan-Rich Foods: A Dietary Tool for Health Promotion? Molecules. 2019;24(5):917.

121. Pasquariello R, Verdile N, Brevini TAL, Gandolfi F, Boiti C, Zerani M, i sur. The Role of Resveratrol in Mammalian Reproduction. Molecules. 2020;25(19):4554.

122. Pecyna P, Wargula J, Murias M, Kucinska M. More Than Resveratrol: New Insights into Stilbene-Based Compounds. Biomolecules. 2020;10(8):1111.

123. Shi S, Li J, Zhao X, Liu Q, Song SJ. A comprehensive review: Biological activity, modification and synthetic methodologies of prenylated flavonoids. Phytochemistry. 2021;191:112895.

124. Wen L, Zhou T, Jiang Y, Chang SK, Yang B. Prenylated flavonoids in foods and their applications on cancer prevention. Crit Rev Food Sci Nutr. 2022;62(18):5067–80.

125. Bohr G, Gerhäuser C, Knauft J, Zapp J, Becker H. Anti-inflammatory acylphloroglucinol derivatives from Hops (Humulus lupulus). J Nat Prod. 2005;68(10):1545–8.

126. Zanoli P, Zavatti M. Pharmacognostic and pharmacological profile of Humulus lupulus L. J Ethnopharmacol. 2008;116(3):383–96.

127. Słupski W, Jawień P, Nowak B. Botanicals in Postmenopausal Osteoporosis. Nutrients. 2021;13(5):1609.

128. Bolton JL, Dunlap TL, Hajirahimkhan A, Mbachu O, Chen SN, Chadwick L, i sur. The Multiple Biological Targets of Hops and Bioactive Compounds. Chem Res Toxicol. 2019;32(2):222–33.

129. Ban YH, Yon JM, Cha Y, Choi J, An ES, Guo H, i sur. A Hop Extract Lifenol® Improves Postmenopausal Overweight, Osteoporosis, and Hot Flash in Ovariectomized Rats. Evidence-Based Complement Altern Med. 2018;2018:1–9.

130. Dietz BM, Hajirahimkhan A, Dunlap TL, Bolton JL. Botanicals and Their Bioactive Phytochemicals for Women's Health. Barker E, editor. Pharmacol Rev. 2016;68(4):1026–73.

131. European Medicines Agency. Assessment report on Humulus lupulus L., flos. Vol. 44. 2014.

132. Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR. The pharmacognosy of Humulus lupulus L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. Phytomedicine. 2006;13(1–2):119–31.

133. Knez Hrnčič M, Španinger E, Košir I, Knez Ž, Bren U. Hop Compounds: Extraction Techniques, Chemical Analyses, Antioxidative, Antimicrobial, and Anticarcinogenic Effects. Nutrients. 2019;11(2):257.

134. Krause E, Yuan Y, Hajirahimkhan A, Dong H, Dietz BM, Nikolic D, i sur. Biological and chemical standardization of a hop (Humulus lupulus) botanical dietary supplement. Biomed Chromatogr. 2014;28(6):729–34.

135. van Breemen RB, Yuan Y, Banuvar S, Shulman LP, Qiu X, Alvarenga RFR, i sur. Pharmacokinetics of prenylated hop phenols in women following oral administration of a standardized extract of hops. Mol Nutr Food Res. 2014;58(10):1962–9.

136. Weiskirchen R, Mahli A, Weiskirchen S, Hellerbrand C. The hop constituent xanthohumol exhibits hepatoprotective effects and inhibits the activation of hepatic stellate cells at different levels. Front Physiol. 2015;6(MAY):140.

137. Krajnović T, Kaluđerović GN, Wessjohann LA, Mijatović S, Maksimović-Ivanić D. Versatile antitumor potential of isoxanthohumol: Enhancement of paclitaxel activity in vivo. Pharmacol Res. 2016;105:62–73.

138. Krajnović T, Pantelić NĐ, Wolf K, Eichhorn T, Maksimović-Ivanić D, Mijatović S, i sur. Anticancer Potential of Xanthohumol and Isoxanthohumol Loaded into SBA-15 Mesoporous Silica Particles against B16F10 Melanoma Cells. Materials (Basel). 2022;15(14):5028.

139. Yamashita M, Fukizawa S, Nonaka Y. Hop-derived prenylflavonoid isoxanthohumol suppresses insulin resistance by changing the intestinal microbiota and suppressing chronic inflammation in high fat diet-fed mice. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2020;24(3):1537–47.

140. Fukizawa S, Yamashita M, Wakabayashi KI, Fujisaka S, Tobe K, Nonaka Y, i sur. Anti-obesity effect of a hop-derived prenylflavonoid isoxanthohumol in a high-fat diet-induced obese mouse model. Biosci microbiota, food Heal. 2020;39(3):175–82.

141. Possemiers S, Bolca S, Grootaert C, Heyerick A, Decroos K, Dhooge W, i sur. The Prenylflavonoid Isoxanthohumol from Hops (Humulus lupulus L.) Is Activated into the Potent Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin In Vitro and in the Human Intestine. J Nutr. 2006;136(7):1862–7.

142. Nikolic D, Li Y, Chadwick LR, van Breemen RB. In vitro studies of intestinal permeability and hepatic and intestinal metabolism of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (Humulus lupulus L.). Pharm Res. 2006;23(5):864–72.

143. Nikolic D, Li Y, Chadwick LR, Grubjesic S, Schwab P, Metz P, i sur. Metabolism of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (Humulus lupulus), by human liver microsomes. Drug Metab Dispos. 2004;32(2):272–9.

144. Štulíková K, Karabín M, Nešpor J, Dostálek P. Therapeutic Perspectives of 8-Prenylnaringenin, a Potent Phytoestrogen from Hops. Molecules. 2018;23(3):660.

145. Pohjanvirta R, Nasri A. The Potent Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin: A Friend or a Foe? Int J Mol Sci. 2022;23(6):3168.

146. Milligan S, Kalita J, Pocock V, Heyerick A, De Cooman L, Rong H, i sur. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. Reproduction. 2002;123(2):235–42.

147. Stevens JF, Page JE. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! Phytochemistry. 2004;65(10):1317–30.

148. Komrakova M, Rechholtz C, Pohlmann N, Lehmann W, Schilling AF, Wigger R, i sur. Effect of alendronate or 8-prenylnaringenin applied as a single therapy or in combination with vibration on muscle structure and bone healing in ovariectomized rats. Bone Reports. 2019;11:100224.

149. Keiler AM, Helle J, Bader MI, Ehrhardt T, Nestler K, Kretzschmar G, i sur. A standardized Humulus lupulus (L.) ethanol extract partially prevents ovariectomy-induced bone loss in the rat without induction of adverse effects in the uterus. Phytomedicine. 2017;34:50–8.

150. Schaefer O, Hümpel M, Fritzemeier KH, Bohlmann R, Schleuning WD. 8-Prenyl naringenin is a potent ERα selective phytoestrogen present in hops and beer. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003;84(2–3):359–60.

151. Park S, Sim KS, Hwangbo Y, Park SJ, Kim YJ, Kim JH. Naringenin and Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin Protect against Islet Dysfunction and Inhibit Apoptotic Signaling in Insulin-Deficient Diabetic Mice. Molecules. 2022;27(13):4227.

152. Luís C, Costa R, Rodrigues I, Castela Â, Coelho P, Guerreiro S, i sur. Xanthohumol and 8-prenylnaringenin reduce type 2 diabetes-associated oxidative stress by downregulating galectin-3. Porto Biomed J. 2019;4(1):e23.

153. Seliger JM, Misuri L, Maser E, Hintzpeter J. The hop-derived compounds xanthohumol, isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin are tight-binding inhibitors of human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10. J Enzyme Inhib Med Chem. 2018;33(1):607–14.

154. Koosha S, Mohamed Z, Sinniah A, Ibrahim ZA, Seyedan A, Alshawsh MA. Antiproliferative and apoptotic activities of 8-prenylnaringenin against human colon cancer cells. Life Sci. 2019;232:116633.

155. Ambrož M, Lněničková K, Matoušková P, Skálová L, Boušová I. Antiproliferative Effects of Hop-derived Prenylflavonoids and Their Influence on the Efficacy of Oxaliplatine, 5-fluorouracil and Irinotecan in Human ColorectalC Cells. Nutrients. 2019;11(4):879.

156. Bartmańska A, Tronina T, Popłoński J, Milczarek M, Filip-Psurska B, Wietrzyk J. Highly Cancer Selective Antiproliferative Activity of Natural Prenylated Flavonoids. Molecules. 2018;23(11):2922.

157. Venturelli S, Niessner H, Sinnberg T, Berger A, Burkard M, Urmann C, i sur. 6- and 8-Prenylnaringenin, Novel Natural Histone Deacetylase Inhibitors Found in Hops, Exert Antitumor Activity on Melanoma Cells. Cell Physiol Biochem. 2018;51(2):543–56.

158. Keiler AM, Macejova D, Dietz BM, Bolton JL, Pauli GF, Chen SN, i sur. Evaluation of estrogenic potency of a standardized hops extract on mammary gland biology and on MNU-induced mammary tumor growth in rats. J Steroid Biochem Mol Biol. 2017;174:234–41.

159. Hanada A, Morimoto R, Horio Y, Shichiri M, Nakashima A, Ogawa T, i sur. Influenza virus entry and replication inhibited by 8-prenylnaringenin from Citrullus lanatus var. citroides (wild watermelon). Food Sci Nutr. 2022;10(3):926–35.

160. Bartmańska A, Wałecka-Zacharska E, Tronina T, Popłoński J, Sordon S, Brzezowska E, i sur. Antimicrobial Properties of Spent Hops Extracts, Flavonoids Isolated Therefrom, and Their Derivatives. Molecules. 2018;23(8):2059.

161. Ming LG, Lv X, Ma XN, Ge BF, Zhen P, Song P, i sur. The prenyl group contributes to activities of phytoestrogen 8-prenynaringenin in enhancing bone formation and inhibiting bone resorption in vitro. Endocrinology. 2013;154(3):1202–14.

162. Hümpel M, Isaksson P, Schaefer O, Kaufmann U, Ciana P, Maggi A, i sur. Tissue specificity of 8-prenylnaringenin: protection from ovariectomy induced bone loss with minimal trophic effects on the uterus. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005;97(3):299–305.

163. Tronina T, Popłoński J, Bartmańska A. Flavonoids as Phytoestrogenic Components of Hops and Beer. Molecules. 2020;25(18):4201.

164. Benkherouf AY, Logrén N, Somborac T, Kortesniemi M, Soini SL, Yang B, i sur. Hops compounds modulatory effects and 6-prenylnaringenin dual mode of action on GABAA receptors. Eur J Pharmacol. 2020;873:172962.

165. Teisseyre A, Palko-Labuz A, Uryga A, Michalak K. The Influence of 6-Prenylnaringenin and Selected Non-prenylated Flavonoids on the Activity of Kv1.3 Channels in Human Jurkat T Cells. J Membr Biol. 2018;251(5–6):695–704.

166. Sekiguchi F, Fujita T, Deguchi T, Yamaoka S, Tomochika K, Tsubota M, i sur. Blockade of T-type calcium channels by 6-prenylnaringenin, a hop component, alleviates neuropathic and visceral pain in mice. Neuropharmacology. 2018;138:232–44.

167. Faienza MF, Ventura A, Marzano F, Cavallo L. Postmenopausal osteoporosis: the role of immune system cells. Clin Dev Immunol. 2013;2013:575936.

168. Martinez SE, Davies NM. Stereospecific quantitation of 6-prenylnaringenin in commercially available H. lupulus-containing natural health products and dietary supplements. Res Pharm Sci. 2015;10(3):182–91.

169. Effenberger KE, Johnsen SA, Monroe DG, Spelsberg TC, Westendorf JJ. Regulation of osteoblastic phenotype and gene expression by hop-derived phytoestrogens. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005;96(5):387–99.

170. Zanardi MV, Gastiazoro MP, Kretzschmar G, Wober J, Vollmer G, Varayoud J, i sur. AHR agonistic effects of 6-PN contribute to potential beneficial effects of Hops extract. Mol Cell Endocrinol. 2022;543:111540.

171. Sheppard AJ, Barfield AM, Barton S, Dong Y. Understanding Reactive Oxygen Species in Bone Regeneration: A Glance at Potential Therapeutics and Bioengineering Applications. Front Bioeng Biotechnol. 2022;10:836764.

172. Zhou T, Yan Y, Zhao C, Xu Y, Wang Q, Xu N. Resveratrol improves osteogenic differentiation of senescent bone mesenchymal stem cells through inhibiting endogenous reactive oxygen species production via AMPK activation. Redox Rep. 2019;24(1):62–9.

173. Ren X, Liu H, Wu X, Weng W, Wang X, Su J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Responsive Biomaterials for the Treatment of Bone-Related Diseases. Front Bioeng Biotechnol. 2021;9:820468.

174. Schröder K. NADPH oxidases in bone homeostasis and osteoporosis. Free Radic Biol Med. 2019;132:67–72.

175. Agidigbi TS, Kim C. Reactive Oxygen Species in Osteoclast Differentiation and Possible Pharmaceutical Targets of ROS-Mediated Osteoclast Diseases. Int J Mol Sci. 2019;20(14).

176. Saxena Y, Routh S, Mukhopadhaya A. Immunoporosis: Role of Innate Immune Cells in Osteoporosis. Front Immunol. 2021;12:687037.

177. Zhao F, Guo L, Wang X, Zhang Y. Correlation of oxidative stress-related biomarkers with postmenopausal osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. Arch Osteoporos. 2021;16(1):4.

178. Oršolić N, Nemrava J, Jeleč Ž, Kukolj M, Odeh D, Terzić S, i sur. The Beneficial Effect of Proanthocyanidins and Icariin on Biochemical Markers of Bone Turnover in Rats. Int J Mol Sci. 2018;19(9):2746.

179. Chen L, Wang G, Wang Q, Liu Q, Sun Q, Chen L. N-acetylcysteine prevents orchiectomy-induced osteoporosis by inhibiting oxidative stress and osteocyte senescence. Am J Transl Res. 2019;11(7):4337–47.

180. Komori T. Animal models for osteoporosis. Eur J Pharmacol. 2015;759:287–94.

181. Oršolić N, Goluža E, Đikić D, Lisičić D, Sašilo K, Rođak E, i sur. Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contents in the retinoic acid-induced bone loss model of rat. Eur J Nutr. 2014;53(5):1217–27.

182. Yang J, Wu N, Peng J, Yang X, Guo J, Yin S, i sur. Prevention of retinoic acid-induced osteoporosis in mice by isoflavone-enriched soy protein. J Sci Food Agric. 2016;96(1):331–8.

183. Bergen DJM, Kague E, Hammond CL. Zebrafish as an Emerging Model for Osteoporosis: A Primary Testing Platform for Screening New Osteo-Active Compounds. Front Endocrinol (Lausanne). 2019;10:6.

184. Permuy M, López-Peña M, Muñoz F, González-Cantalapiedra A. Rabbit as model for osteoporosis research. J Bone Miner Metab. 2019;37(4):573–83.

185. Wood CL, Soucek O, Wong SC, Zaman F, Farquharson C, Savendahl L, i sur. Animal models to explore the effects of glucocorticoids on skeletal growth and structure. J Endocrinol. 2018;236(1):69–91.

186. Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, Ghasemi A. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide. EXCLI J. 2020;19:89.

187. Fang J, Yang L, Zhang R, Zhu X, Wang P. Are there differences between Sprague-Dawley and Wistar rats in long-term effects of ovariectomy as a model for postmenopausal osteoporosis? Int J Clin Exp Pathol. 2015;8(2):1491–502.

188. Bădilă AE, Rădulescu DM, Ilie A, Niculescu AG, Grumezescu AM, Rădulescu AR. Bone Regeneration and Oxidative Stress: An Updated Overview. Antioxidants. 2022;11(2):318.

189. Bernhardt A, Skottke J, von Witzleben M, Gelinsky M. Triple Culture of Primary Human Osteoblasts, Osteoclasts and Osteocytes as an In Vitro Bone Model. Int J Mol Sci. 2021;22(14):7316.

190. Chan CKY, Mason A, Cooper C, Dennison E. Novel advances in the treatment of osteoporosis. Br Med Bull. 2016;119(1):129–42.

191. Manolagas SC. From Estrogen-Centric to Aging and Oxidative Stress: A Revised Perspective of the Pathogenesis of Osteoporosis. Endocr Rev. 2010;31(3):266–300.

192. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011.

193. Ronneberger O, Fischer P, Brox T. U-net: Convolutional networks for biomedical image segmentation. Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics). Springer Verlag; 2015. 234–41.

194. Buie HR, Campbell GM, Klinck RJ, MacNeil JA, Boyd SK. Automatic segmentation of cortical and trabecular compartments based on a dual threshold technique for in vivo micro-CT bone analysis. Bone. 2007;41(4):505–15.

195. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. J Bone Miner Res. 2010;25(7):1468–86.

196. Shetty S, Kapoor N, Bondu JD, Thomas N, Paul TV. Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. Indian J Endocrinol Metab. 2016;20(6):846–52.

197. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, i sur. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods. 2012;9(7):676–82.

198. Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. Bioinformatics. 2009;25(11):1463–5.

199. Rođak E, Oršolić N, Grgac R, Rajc J, Bakula M, Bijelić N. Analysis of Uterine Morphology in Ovariectomized Rats Treated With Alendronate and Hop Extract Using Open-Source Software. Image Anal Stereol. 2022;41(3):193–202.

200. Kinra P, Malik A. Ki 67: Are we counting it right? Indian J Pathol Microbiol. 2020;63(1):98–9.

201. Galarraga M, Campión J, Munõz-Barrutia A, Boqué N, Moreno H, Martínez JA, i sur. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. J Lipid Res. 2012;53(12):2791.

202. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979;95(2):351–8.

203. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Bradford Assay for Determining Protein Concentration. Cold Spring Harb Protoc. 2020;2020(4):102269.

204. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AGG, i sur. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 1990;186(C):464–78.

205. Sinha AK. Colorimetric assay of catalase. Anal Biochem. 1972;47(2):389–94.

206. ROSE HG, OKLANDER M. IMPROVED PROCEDURE FOR THE EXTRACTION OF LIPIDS FROM HUMAN ERYTHROCYTES. J Lipid Res. 1965;6:428–31.

207. Bligh EG, Dyer WJ. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. Can J Biochem Physiol. 1959;37(8):911–7.

208. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020.

209. Hammer DAT, Ryan PD, Hammer Ø, Harper DAT. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontol Electron. 2001;4(1):178.

210. Park SB, Kim J, Jeong JH, Lee JK, Chin DK, Chung CK, i sur. Prevalence and Incidence of Osteoporosis and Osteoporotic Vertebral Fracture in Korea. Spine (Phila Pa 1976). 2016;41(4):328–36.

211. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, i sur. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). Arch Osteoporos. 2013;8(1–2):136.

212. Fuggle N, Al-Daghri N, Bock O, Branco J, Bruyère O, Casado E, i sur. Novel formulations of oral bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. Aging Clin Exp Res. 2022;34(11):2625–34.

213. Nakada D, Oguro H, Levi BP, Ryan N, Kitano A, Saitoh Y, i sur. Oestrogen increases haematopoietic stem-cell self-renewal in females and during pregnancy. Nature. 2014;505(7484):555–8.

214. Azad P, Villafuerte FC, Bermudez D, Patel G, Haddad GG. Protective role of estrogen against excessive erythrocytosis in Monge's disease. Exp Mol Med. 2021;53(1):125–35.

215. Vona R, Gambardella L, Ortona E, Santulli M, Malorni W, Carè A, i sur. Functional Estrogen Receptors of Red Blood Cells. Do They Influence Intracellular Signaling? Cell Physiol Biochem. 2019;53(1):186–99.

216. Kuhn G, Hardegg W, Noack S, Trunk H. Long-term effects of hysterectomy and bilateral oophorectomy on lymphoid tissue in female Lewis rats. Vet Immunol Immunopathol. 1991;29(3–4):353–63.

217. Li Y, Hao W, Guan J, Li B, Meng L, Sun S, i sur. Relationship between indices of circulating blood cells and bone homeostasis in osteoporosis. Front Endocrinol (Lausanne). 2022;13:2163.

218. Cline-Smith A, Axelbaum A, Shashkova E, Chakraborty M, Sanford J, Panesar P, i sur. Ovariectomy Activates Chronic Low-Grade Inflammation Mediated by Memory T Cells, Which Promotes Osteoporosis in Mice. J Bone Miner Res. 2020;35(6):1174–87.

219. Abu-Taha M, Rius C, Hermenegildo C, Noguera I, Cerda-Nicolas JM, Issekutz AC, i sur. Menopause and Ovariectomy Cause a Low Grade of Systemic Inflammation that May Be Prevented by Chronic Treatment with Low Doses of Estrogen or Losartan. J Immunol. 2009;183(2):1393–402.

220. Soysal P, Stubbs B, Lucato P, Luchini C, Solmi M, Peluso R, i sur. Inflammation and frailty in the elderly: A systematic review and meta-analysis. Ageing Res Rev. 2016;31:1–8.

221. Sánchez-Aguilera A, Arranz L, Martín-Pérez D, García-García A, Stavropoulou V, Kubovcakova L, i sur. Estrogen Signaling Selectively Induces Apoptosis of Hematopoietic Progenitors and Myeloid Neoplasms without Harming Steady-State Hematopoiesis. Cell Stem Cell. 2014;15(6):791–804.

222. Roma A, Spagnuolo PA. Estrogen Receptors Alpha and Beta in Acute Myeloid Leukemia. Cancers (Basel). 2020;12(4):907.

223. Butkiewicz AM, Kemona H, Dymicka-Piekarska V, Matowicka-Karna J. Does menopause affect thrombocytopoiesis and platelet activation? Przegl Lek. 2006;63(12):1291–3.

224. Kim J, Kim HS, Lee HS, Kwon YJ. The relationship between platelet count and bone mineral density: results from two independent population-based studies. Arch Osteoporos. 2020;15(1):43.

225. Kristjansdottir HL, Mellström D, Johansson P, Karlsson M, Vandenput L, Lorentzon M, i sur. High platelet count is associated with low bone mineral density: The MrOS Sweden cohort. Osteoporos Int. 2021;32(5):865–71.

226. Kim HL, Cho HY, Park IY, Choi JM, Kim M, Jang HJ, i sur. The Positive Association between Peripheral Blood Cell Counts and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women. Yonsei Med J. 2011;52(5):739.

227. Dupuis M, Severin S, Noirrit-Esclassan E, Arnal JF, Payrastre B, Valéra MC. Effects of Estrogens on Platelets and Megakaryocytes. Int J Mol Sci. 2019;20(12):3111.

228. Pirmohamed M. Commentary---bisphosphonates and calcium homoeostasis. Postgrad Med J. 2000;76(897):418–9.

229. Azuma Y, Chokki M, Ohta T, Kiyoki M. Effects of alendronate on plasma calcium levels, urinary calcium excretion, and bone resorption markers in normal rats: comparison with elcatonin, synthetic eel calcitonin. Endocrinology. 1996;137(6):2586–92.

230. Lei Z, Wu H, Yang Y, Hu Q, Lei Y, Liu W, i sur. Ovariectomy Impaired Hepatic Glucose and Lipid Homeostasis and Altered the Gut Microbiota in Mice With Different Diets. Front Endocrinol (Lausanne). 2021;12:1.

231. Do HJ, Shin JS, Lee J, Lee YJ, Kim M riong, Nam D, i sur. Association between liver enzymes and bone mineral density in Koreans: a cross-sectional study. BMC Musculoskelet Disord. 2018;19(1):410.

232. Breitling LP. Liver Enzymes and Bone Mineral Density in the General Population. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(10):3832–40.

233. Bisphosphonates. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012.

234. Miller PD, Jamal SA, Evenepoel P, Eastell R, Boonen S. Renal safety in patients treated with bisphosphonates for osteoporosis: A review. J Bone Miner Res. 2013;28(10):2049–59.

235. Turner AS, Alvis M, Myers W, Stevens ML, Lundy MW. Changes in bone mineral density and bone-specific alkaline phosphatase in ovariectomized ewes. Bone. 1995;17(4):395–402.

236. Kress BC, Mizrahi IA, Armour KW, Marcus R, Emkey RD, Santora AC. Use of bone alkaline phosphatase to monitor alendronate therapy in individual postmenopausal osteoporotic women. Clin Chem. 1999;45(7):1009–17.

237. Afshinnia F, Wong KK, Sundaram B, Ackermann RJ, Pennathur S. Hypoalbuminemia and osteoporosis: Reappraisal of a controversy. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101(1):167–75.

238. Delwatta SL, Gunatilake M, Baumans V, Seneviratne MD, Dissanayaka MLB, Batagoda SS, i sur. Reference values for selected hematological, biochemical and physiological parameters of Sprague-Dawley rats at the Animal House, Faculty of Medicine, University of Colombo, Sri Lanka. Anim Model Exp Med. 2018;1(4):250–4.

239. Ihedioha JI, Noel-Uneke OA, Ihedioha TE. Reference values for the serum lipid profile of albino rats (Rattus norvegicus) of varied ages and sexes. Comp Clin Path. 2013;22(1):93–9.

240. Matsuzawa T, Nomura M, Unno T. Clinical pathology reference ranges of laboratory animals. Working Group II, Nonclinical Safety Evaluation Subcommittee of the Japan Pharmaceutical Manufacturers Association. J Vet Med Sci. 1993;55(3):351–62.

241. He Q, Su G, Liu K, Zhang F, Jiang Y, Gao J, i sur. Sex-specific reference intervals of hematologic and biochemical analytes in Sprague-Dawley rats using the nonparametric rank percentile method. Johnson C, editor. PLoS One. 2017;12(12):e0189837.

242. Lundeen SG, Carver JM, McKean ML, Winneker RC. Characterization of the Ovariectomized Rat Model for the Evaluation of Estrogen Effects on Plasma Cholesterol Levels. Endocrinology. 1997;138(4):1552–8.

243. Ngo Sock E, Côté I, Mentor J, Prud'homme D, Bergeron R, Lavoie JM. Ovariectomy Stimulates Hepatic Fat and Cholesterol Accumulation in High-fat Diet-fed Rats. Horm Metab Res. 2012;45(04):283–90.

244. Terzic M, Micic J, Dotlic J, Maricic S, Mihailovic T, Knezevic N. Impact of Phytoestrogens on Serum Lipids in Postmenopausal Women. Geburtshilfe Frauenheilkd. 2012;72(06):527–31.

245. Miranda CL, Elias VD, Hay JJ, Choi J, Reed RL, Stevens JF. Xanthohumol improves dysfunctional glucose and lipid metabolism in diet-induced obese C57BL/6J mice. Arch Biochem Biophys. 2016;599:22–30.

246. Dostálek P, Karabín M, Jelínek LL. Hop Phytochemicals and Their Potential Role in Metabolic Syndrome Prevention and Therapy. Molecules. 2017;22(10):1761.

247. Miura Y, Hosono M, Oyamada C, Odai H, Oikawa S, Kondo K. Dietary isohumulones, the bitter components of beer, raise plasma HDL-cholesterol levels and reduce liver cholesterol and triacylglycerol contents similar to PPARα activations in C57BL/6 mice. Br J Nutr. 2005;93(4):559–67.

248. Booth JE, van der Schoot P, Moleman P. Parachlorophenylalanine and copulatory behaviour in neonatally castrated male rats. Physiol Behav. 1979;23(4):701–7.

249. Böttner M, Christoffel J, Wuttke W. Effects of long-term treatment with 8-prenylnaringenin and oral estradiol on the GH–IGF-1 axis and lipid metabolism in rats. J Endocrinol. 2008;198(2):395–401.

250. Joo IW, Oh HJ. Lipid Profile Changes in Postmenopausal Korean Women Treated with Alendronate (10 mg) for 2 Years: Comparing with Control Group. J Korean Endocr Soc. 2007;22(1):19.

251. Adami S, Braga V, Guidi G, Gatti D, Gerardi D, Fracassi E. Chronic Intravenous Aminobisphosphonate Therapy Increases High-Density Lipoprotein Cholesterol and Decreases Low-Density Lipoprotein Cholesterol. J Bone Miner Res. 2010;15(3):599–604.

252. Kan B, Zhao Q, Wang L, Xue S, Cai H, Yang S. Association between lipid biomarkers and osteoporosis: a cross-sectional study. BMC Musculoskelet Disord. 2021;22(1):1–8.

253. Parhami F, Garfinkel A, Demer LL. Role of Lipids in Osteoporosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(11):2346–8.

254. Bijelic R, Balaban J, Milicevic S. Correlation of the Lipid Profile, BMI and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women. Mater Socio Medica. 2016;28(6):412.

255. Migliaccio S, Greco EA, Fornari R, Donini LM, Di Luigi L, Lenzi A. Skeletal alterations in women affected by obesity. Aging Clin Exp Res. 2013;25(S1):35–7.

256. Ong T, Sahota O, Tan W, Marshall L. A United Kingdom perspective on the relationship between body mass index (BMI) and bone health: A cross sectional analysis of data from the Nottingham Fracture Liaison Service. Bone. 2014;59:207–10.

257. Chen YY, Wang WW, Yang L, Chen WW, Zhang HX. Association between lipid profiles and osteoporosis in postmenopausal women: a meta-analysis. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018;22(1):1–9.

258. Kousteni S, Han L, Chen JR, Almeida M, Plotkin LI, Bellido T, i sur. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. J Clin Invest. 2003;111(11):1651–64.

259. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, i sur. Nongenotropic, Sex-Nonspecific Signaling through the Estrogen or Androgen Receptors. Cell. 2001;104(5):719–30.

260. Manolagas SC, Almeida M. Gone with the Wnts: β-Catenin, T-Cell Factor, Forkhead Box O, and Oxidative Stress in Age-Dependent Diseases of Bone, Lipid, and Glucose Metabolism. Mol Endocrinol. 2007;21(11):2605–14.

261. Callewaert F, Sinnesael M, Gielen E, Boonen S, Vanderschueren D. Skeletal sexual dimorphism: relative contribution of sex steroids, GH–IGF1, and mechanical loading. J Endocrinol. 2010;207(2):127–34.

262. Duque G, Rivas D. Alendronate Has an Anabolic Effect on Bone Through the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. J Bone Miner Res. 2007;22(10):1603–11.

263. Qvist P, Christgau S, Pedersen B., Schlemmer A, Christiansen C. Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTx): effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. Bone. 2002;31(1):57–61.

264. Song L, Bi Y, Zhang P, Yuan X, Liu Y, Zhang Y, i sur. Optimization of the Time Window of Interest in Ovariectomized Imprinting Control Region Mice for Antiosteoporosis Research. Biomed Res Int. 2017;2017:1–10.

265. Kim MR, Kim HJ, Yu SH, Lee BS, Jeon SY, Lee JJ, i sur. Combination of Red Clover and Hops Extract Improved Menopause Symptoms in an Ovariectomized Rat Model. Evidence-Based Complement Altern Med. 2020;2020:1–9.

266. Sathyapalan T, Aye M, Rigby AS, Fraser WD, Thatcher NJ, Kilpatrick ES, i sur. Soy Reduces Bone Turnover Markers in Women During Early Menopause: A Randomized Controlled Trial. J Bone Miner Res. 2017;32(1):157–64.

267. Overk CR, Guo J, Chadwick LR, Lantvit DD, Minassi A, Appendino G, i sur. In vivo estrogenic comparisons of Trifolium pratense (red clover) Humulus lupulus (hops), and the pure compounds isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. Chem Biol Interact. 2008;176(1):30–9.

268. Keiler AM, Dörfelt P, Chatterjee N, Helle J, Bader MI, Vollmer G, i sur. Assessment of the effects of naringenin-type flavanones in uterus and vagina. J Steroid Biochem Mol Biol. 2015;145:49–57.

269. Marusak RA, Radi ZA, Obert L. Expression of Ki-67 in the uterus during various stages of the estrous cycle in rats. Exp Toxicol Pathol. 2007;59(3–4):151–5.

270. Sato M, Bryant HU, Iversen P, Helterbrand J, Smietana F, Bemis K, i sur. Advantages of raloxifene over alendronate or estrogen on nonreproductive and reproductive tissues in the long-term dosing of ovariectomized rats. J Pharmacol Exp Ther. 1996;279(1):298–305.

271. Quarmby VE, Korach KS. The influence of 17 beta-estradiol on patterns of cell division in the uterus. Endocrinology. 1984;114(3):694–702.

272. Malinská H, Hüttl M, Miklánková D, Trnovská J, Zapletalová I, Poruba M, i sur. Ovariectomy-Induced Hepatic Lipid and Cytochrome P450 Dysmetabolism Precedes Serum Dyslipidemia. Int J Mol Sci. 2021;22(9):4527.

273. Boldarine VT, Pedroso AP, Brandão-Teles C, LoTurco EG, Nascimento CMO, Oyama LM, i sur. Ovariectomy modifies lipid metabolism of retroperitoneal white fat in rats: a proteomic approach. Am J Physiol Metab. 2020;319(2):427–37.

274. Samuels JS, Shashidharamurthy R, Rayalam S. Novel anti-obesity effects of beer hops compound xanthohumol: role of AMPK signaling pathway. Nutr Metab (Lond). 2018;15(1):42.

275. Khalilpourfarshbafi M, Gholami K, Murugan DD, Abdul Sattar MZ, Abdullah NA. Differential effects of dietary flavonoids on adipogenesis. Eur J Nutr. 2019;58(1):5–25.

276. Baron R, Rawadi G. Targeting the Wnt/β-Catenin Pathway to Regulate Bone Formation in the Adult Skeleton. Endocrinology. 2007;148(6):2635–43.

277. Krishnan V. Regulation of bone mass by Wnt signaling. J Clin Invest. 2006;116(5):1202–9.

278. Lee H, Lee YJ, Choi H, Ko EH, Kim J woo. Reactive Oxygen Species Facilitate Adipocyte Differentiation by Accelerating Mitotic Clonal Expansion. J Biol Chem. 2009;284(16):10601–9.

279. Luangmonkong T, Suriguga S, Mutsaers HAM, Groothuis GMM, Olinga P, Boersema M. Targeting Oxidative Stress for the Treatment of Liver Fibrosis. Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology. Rev Physiol Biochem Pharmacol; 2018. 71–102.

280. Bao YL, Wang L, Pan HT, Zhang TR, Chen YH, Xu SJ, i sur. Animal and Organoid Models of Liver Fibrosis. Front Physiol. 2021;12:763.

281. Papamitsou T, Sotiriou S, Papakoulas A, Toskas A, Kamperis D, Karachrysafi S, i sur. Alendronate effect in esophagus, stomach and liver: an animal based pathological study. Histol Histopathol. 2020;35(4):417–22.

282. Parwin A, Najmi AK, Ismail MV, Kaundal M, Akhtar M. Protective effects of alendronate in Triton X-100-induced hyperlipidemia in rats. Turkish J Gastroenterol. 2019;30(6):557–64.

283. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, Plotkin LI, Stewart SA, Roberson PK, i sur. Skeletal Involution by Age-associated Oxidative Stress and Its Acceleration by Loss of Sex Steroids. J Biol Chem. 2007;282(37):27285–97.

284. Li X, Li B, Shi Y, Wang C, Ye L. Targeting reactive oxygen species in stem cells for bone therapy. Drug Discov Today. 2021;26(5):1226–44.

285. Signorelli SS, Neri S, Sciacchitano S, Pino L Di, Costa MP, Marchese G, i sur. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. Maturitas. 2006;53(1):77–82.

286. Rodrigues MFC, Stotzer US, Domingos MM, Deminice R, Shiguemoto GE, Tomaz LM, i sur. Effects of ovariectomy and resistance training on oxidative stress markers in the rat liver. Clinics. 2013;68(9):1247–54.

287. Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, Vasudevan G, Prabhu V, Subramaniam V, i sur. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. Clin Chim Acta. 2005;360(1–2):81–6.

288. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. Trends Pharmacol Sci. 2017;38(7):592–607.

289. Reczek CR, Chandel NS. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. Annu Rev Cancer Biol. 2017;1(1):79–98.

290. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2007;34(9):906–11.

291. Araujo M, Welch WJ. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2006;15(1):72–7.

292. Kowalczyk E, Kopff A, Kopff M, Fijałkowski P, Błaszczyk J. Nitric oxide--oxidant or antioxidant? Wiad Lek. 2005;58(9–10):540–2.

293. Jin Z, Kho J, Dawson B, Jiang MM, Chen Y, Ali S, i sur. Nitric oxide modulates bone anabolism through regulation of osteoblast glycolysis and differentiation. J Clin Invest. 2021;131(5).

294. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxid Med Cell Longev. 2014;2014:1–31.

295. Eriksen EF, Díez-Pérez A, Boonen S. Update on long-term treatment with bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis: a systematic review. Bone. 2014;58(July):126–35.

296. Palmisano BT, Zhu L, Stafford JM. Role of Estrogens in the Regulation of Liver Lipid Metabolism. Advances in experimental medicine and biology. NIH Public Access; 2017. 227–56.

297. Ma HY, Chen S, Du Y. Estrogen and estrogen receptors in kidney diseases. Ren Fail. 2021;43(1):619–42.

298. Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM, i sur. Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. Biochim Biophys Acta. 2007;1773(2):93–104.

299. Cervellati C, Bergamini CM. Oxidative damage and the pathogenesis of menopause related disturbances and diseases. Clin Chem Lab Med. 2016;54(5):739–53.

300. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. J Cell Mol Med. 2006;10(2):389–406.

301. Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. EMBO J. 2005;24(7):1311–7.

302. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. Biol Chem. 2017;398(10):1095–108.

303. Pickering AM, Vojtovich L, Tower J, A. Davies KJ. Oxidative stress adaptation with acute, chronic, and repeated stress. Free Radic Biol Med. 2013;55:109–18.

304. Albano GD, Gagliardo RP, Montalbano AM, Profita M. Overview of the Mechanisms of Oxidative Stress: Impact in Inflammation of the Airway Diseases. Antioxidants. 2022;11(11):2237.

305. Miller MA, Zachary JF. Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. Pathologic Basis of Veterinary Disease. Elsevier; 2017. 2-43.e19.

306. López-Grueso R, Gambini J, Abdelaziz KM, Monleón D, Díaz A, El Alami M, i sur. Early, But Not Late Onset Estrogen Replacement Therapy Prevents Oxidative Stress and Metabolic Alterations Caused by Ovariectomy. Antioxid Redox Signal. 2014;20(2):236–46.

307. Biendl M. Development of new plant extracts rich in hop polyphenols. Proceedings of the European Brewers Convention Congress. 2007. 1–10.

308. Whisner CM, Castillo LF. Prebiotics, Bone and Mineral Metabolism. Calcif Tissue Int. 2018;102(4):443–79.

309. McCabe L, Britton RA, Parameswaran N. Prebiotic and Probiotic Regulation of Bone Health: Role of the Intestine and its Microbiome. Curr Osteoporos Rep. 2015;13(6):363–71.

310. Hyun J, Jung Y. DNA Methylation in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Int J Mol Sci. 2020;21(21):8138.

311. Moro J, Tomé D, Schmidely P, Demersay TC, Azzout-Marniche D. Histidine: A Systematic Review on Metabolism and Physiological Effects in Human and Different Animal Species. Nutrients. 2020;12(5):1414.

312. Feigelson M. Estrogenic Regulation of Hepatic Histidase during Postnatal Development and Adulthood. J Biol Chem. 1968;243(19):5088–93.

313. Prokopieva VD, Yarygina EG, Bokhan NA, Ivanova SA. Use of Carnosine for Oxidative Stress Reduction in Different Pathologies. Oxid Med Cell Longev. 2016;2016:1–8.

314. Kong F, Li Y, Diao Q, Bi Y, Tu Y. The crucial role of lysine in the hepatic metabolism of growing Holstein dairy heifers as revealed by LC-MS-based untargeted metabolomics. Anim Nutr. 2021;7(4):1152–61.

315. Yamauchi M, Sricholpech M. Lysine post-translational modifications of collagen. Scott I, editor. Essays Biochem. 2012;52(1):113–33.

316. Rashid J, Kumar SS, Job KM, Liu X, Fike CD, Sherwin CMT. Therapeutic Potential of Citrulline as an Arginine Supplement: A Clinical Pharmacology Review. Pediatr Drugs. 2020;22(3):279–93.

317. Ming Leung T, Lu Y, Yan W, Morón-Concepción JA, Ward SC, Ge X, i sur. Argininosuccinate synthase conditions the response to acute and chronic ethanol-induced liver injury in mice. Hepatology. 2012;55(5):1596–609.

318. Wakamatsu K, Fukushima S, Minagawa A, Omodaka T, Hida T, Hatta N, i sur. Significance of 5-S-Cysteinyldopa as a Marker for Melanoma. Int J Mol Sci. 2020;21(2):432.

319. Malik R. The relationship between the thyroid gland and the liver. QJM. 2002;95(9):559–69.

320. Ben-Rafael Z, Struass JF, Arendash-Durand B, Mastroianni L, Flickinger GL. Changes in thyroid function tests and sex hormone binding globulin associated with treatment by gonadotropin. Fertil Steril. 1987;48(2):318–20.

321. Stetten D, Schoenheimer R. THE CONVERSION OF PALMITIC ACID INTO STEARIC AND PALMITOLEIC ACIDS IN RATS. J Biol Chem. 1940;133(2):329–45.

322. Alekos NS, Moorer MC, Riddle RC. Dual Effects of Lipid Metabolism on Osteoblast Function. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:707.

323. Sztolsztener K, Chabowski A, Harasim-Symbor E, Bielawiec P, Konstantynowicz-Nowicka K. Arachidonic Acid as an Early Indicator of Inflammation during Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Development. Biomolecules. 2020;10(8):1133.

324. Florio AA, Graubard BI, Yang B, Thistle JE, Bradley MC, McGlynn KA, i sur. Oophorectomy and risk of non-alcoholic fatty liver disease and primary liver cancer in the Clinical Practice Research Datalink. Eur J Epidemiol. 2019;34(9):871–8.

325. Fu X, Xing L, Xu W, Shu J. Treatment with estrogen protects against ovariectomy-induced hepatic steatosis by increasing AQP7 expression. Mol Med Rep. 2016;14(1):425–31.

326. Liu L, Fu Q, Li T, Shao K, Zhu X, Cong Y, i sur. Gut microbiota and butyrate contribute to nonalcoholic fatty liver disease in premenopause due to estrogen deficiency. Alpini GD, editor. PLoS One. 2022;17(2):e0262855.

327. Nilsson O, Månsson JE, Håk̈ansson G, Svennerholm L. The occurrence of psychosine and other glycolipids in spleen and liver from the three major types of gaucher's disease. Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab. 1982;712(3):453–63.

328. Kotsopoulos J, Shafrir AL, Rice M, Hankinson SE, Eliassen AH, Tworoger SS, i sur. The relationship between bilateral oophorectomy and plasma hormone levels in postmenopausal women. Horm Cancer. 2015;6(1):54–63.

329. Laughlin GA, Barrett-Connor E, Kritz-Silverstein D, von Mühlen D. Hysterectomy, Oophorectomy, and Endogenous Sex Hormone Levels in Older Women: The Rancho Bernardo Study. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85(2):645–51.

330. van Duursen MBM. Modulation of estrogen synthesis and metabolism by phytoestrogens in vitro and the implications for women's health. Toxicol Res (Camb). 2017;6(6):772–94.

331. Selby C. Sex Hormone Binding Globulin: Origin, Function and Clinical Significance. Ann Clin Biochem Int J Lab Med. 1990;27(6):532–41.

332. Dello SAWG, Neis EPJG, de Jong MC, van Eijk HMH, Kicken CH, Olde Damink SWM, i sur. Systematic review of ophthalmate as a novel biomarker of hepatic glutathione depletion. Clin Nutr. 2013;32(3):325–30.

333. Martini C, Sosa FN, Malvicini R, Pacienza N, Yannarelli G, del C. Vila M. Alendronate inhibits triglyceride accumulation and oxidative stress in adipocytes and the inflammatory response of macrophages which are associated with adipose tissue dysfunction. J Physiol Biochem. 2021;77(4):601–11.

334. Liang Y, Wei P, Duke RW, Reaven PD, Harman SM, Cutler RG, i sur. Quantification of 8-iso-prostaglandin-F2α and 2,3-dinor-8-iso-prostaglandin-F2α in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Free Radic Biol Med. 2003;34(4):409–18.

335. Armeni T, Cianfruglia L, Piva F, Urbanelli L, Luisa Caniglia M, Pugnaloni A, i sur. S-D-Lactoylglutathione can be an alternative supply of mitochondrial glutathione. Free Radic Biol Med. 2014;67:451–9.

336. Mothe-Satney I, Filloux C, Amghar H, Pons C, Bourlier V, Galitzky J, i sur. Adipocytes Secrete Leukotrienes. Diabetes. 2012;61(9):2311–9.

337. Kuryłowicz A, Cąkała-Jakimowicz M, Puzianowska-Kuźnicka M. Targeting Abdominal Obesity and Its Complications with Dietary Phytoestrogens. Nutrients. 2020;12(2):582.

11. **ŽIVOTOPIS**

Opći podatci:

- Ime i prezime: Edi Rođak
- Datum rođenja: 20.11.1990
- Adresa: Ferićeva 2, 31512 Feričanci
- telefon: 098/139-8718
- email: edi.rodak@gmail.com

Zaposlenje:

- 1.3.2018. - danas : Asistent Zavoda za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera Osijek
- 19.10.2016. - 8.12.2017. : Asistent Katedre za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera Osijek

Obrazovanje:

- 2018. - danas : Student poslijediplomskog doktorskog studija biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera Osijek
- 2013. - 2016. : Magistar eksperimentalne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2009. - 2013. : Prvostupnik molekularne biologije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2005. - 2009. : Prirodoslovno-matematička gimnazija, Srednja škola Isidora Kršnjavog, Našice
- 1997. - 2005. : Osnovna škola Vladimira Nazora, Feričanci

Objavljeni znanstveni radovi:

A) Radovi indeksirani u Current Contents:

1. **Rođak E**, Oršolić N, Grgac R, Rajc J, Bakula M, Bijelić N. Analysis of Uterine Morphology in Ovariectomized Rats Treated With Alendronate and Hop Extract Using Open-Source Software. Image Anal Stereol. 2022;41(3):193–202.
2. Mihaljević V, Zjalić M, Kizivat T, Omanović Kolarić T, Smolić M, **Rođak E**, i sur. Molecular Mechanisms Linking Empagliflozin to Renal Protection in the LLC-PK1 Model of Diabetic Nephropathy. Biomedicines. 2022;10(11):2983.
3. Mujkić R, Šnajder Mujkić D, Ilić I, **Rođak E**, Šumanovac A, Grgić A, i sur. Early Childhood Fat Tissue Changes—Adipocyte Morphometry, Collagen Deposition, and Expression of CD163+ Cells in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue of Male Children. Int J Environ Res Public Health. 2021;18(7):3627.
4. Šešelja K, Bazina I, Welss J, Schicht M, Paulsen F, Bijelić N, **Rođak E**, i sur. Effect of Tff3 Deficiency and ER Stress in the Liver. Int J Mol Sci 2019, Vol 20, Page 4389. 2019;20(18):4389.
5. Kozina N, Mihaljević Z, Baus Lončar M, Mihalj M, Mišir M, Radmilović M, Justić H, Gajović S, Šešelja K, Bazina I, Horvatić A, Matić A, Bijelić N, **Rođak E**, Jukić I, Drenjančević I. Impact of High Salt Diet on Cerebral Vascular Function and Stroke in Tff3−/−/C57BL/6N Knockout and WT (C57BL/6N) Control Mice. Int J Mol Sci. 2019;20(20):5188.
6. Oršolić N, Goluža E, Đikić D, Lisičić D, Sašilo K, **Rođak E**, i sur. Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contents in the retinoic acid-induced bone loss model of rat. Eur J Nutr. 2014;53(5):1217–27.

B) Radovi indeksirani u SCI-EXP:

1. Ilić I, Oršolić N, **Rođak E**, Odeh D, Lovrić M, Mujkić R, i sur. The effect of high-fat diet and 13-cis retinoic acid application on lipid profile, glycemic response and oxidative stress in female Lewis rats. Bader M, editor. PLoS One. 2020;15(9):e0238600.

C) Ostali radovi:

1. Vučić D, Bijelić N, **Rođak E**, Rajc J, Dumenčić B, Belovari T, i sur. Right Heart Morphology and Its Association With Excessive and Deficient Cardiac Visceral Adipose Tissue. Clin Med Insights Cardiol. 2021;15.
2. Bijelić N, Abramović M, Rajc J, **Rođak E**, Marušić Z, Tolušić Levak M, i sur. Neoadjuvant Chemotherapy Affects TFF3 Peptide Expression in Luminal B Subtype of Breast Cancer – A Pilot Study. Southeast Eur Med J. 2020;4(2):20–7.

D) Sažeci kongresnih priopćenja koja su objavljena u časopisima koji se indeksiraju u CC-u:

1. Lovrić I, Odeh D, Mujkić R, **Rođak E**, Grgić A, Vargek M, i sur. The effect of high-fat diet and retinoic acid application on oxidative stress, inflammation and insulin resistance in Lewis rats. Obesity Facts. Glasgow: Karger; 2019. 187–187.

E) Ostala kongresna priopćenja:

1. Zjalić M, Cibok S, **Rođak E**, Heffer M, Belovari T, Bijelić N. The golden days are back: modern application of gold impregnation technique on rat brain cryosections. Macan J, Kovačević G, urednici. 4th Croatian Microscopy Congress with international participation: Book of Abstracts. Poreč, Hrvatska; 2022. 61–61.
2. Bijelić N, Kozina N, **Rođak E**, Bazina I, Šešelja K, Baus Lončar M, i sur. Structural characteristics of femoral arteries in wild-type and TFF3 knock-out mice on standard and high-salt diet. Macan J, Kovačević G, urednici. 4th Croatian Microscopy Congress with international participation: Book of Abstracts. Poreč, Hrvatska; 2022. 34–5.
3. Bijelić N, **Rođak E**, Šešelja K, Bazina I, Belovari T, Baus Lončar M. Pancreatic islet surface and share of insulin granules after streptozotocin treatment in wild-type and Tff3 knock-out mice. Macan J, Kovačević G, urednici. 4th Croatian Microscopy Congress with international participation: Book of Abstracts. Poreč, Hrvatska; 2022. 57–8.

4. Bijelić N, Zjalić M, **Rođak E**, Vučić D, Debeljak Ž, Dumenčić B, i sur. Lipid profile of epicardial adipose tissue in obese individuals – preliminary data. Macan J, Kovačević G, urednik. 4th Croatian Microscopy Congress with international participation: Book of Abstracts. Poreč, Hrvatska; 2022. 59–60.
5. **Rođak E**, Viland S, Zjalić M, Bijelić N, Heffer M, Odeh D, i sur. Effect of alendronate, hop-extract and their combination on the number and average surface of astrocytes in the brain of ovariectomised female Wistar rats. MC2021 Proceedings. Beč, Austrija; 2021. 366–366.
6. Bijelić N, Firić M, **Rođak E**, Belovari T, Šešelja K, Bazina I, i sur. Differences in renal microscopic morphology between wild-type and Tff3 knock-out mice. MC2021: Proceedings. Beč, Austrija; 2021. 331–331.
7. Bijelić N, Aliti Đ, **Rođak E**, Belovari T, Šešelja K, Bazina I, i sur. Morphological analysis of renal morphology in wild-type and Tff3 knock-out mice subjected to tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress. MC2021 : Proceedings. Beč, Austrija; 2021. 332–332.
8. Vučić D, Bijelić N, **Rođak E**, Rajc J, Dumenčić B, Belovari T, i sur. Pathohistological association of right heart collagen with waist circumference: preliminary data. Pećin I, urednik. Ateroskleroza.emed.hr. Online; 2021. 1–1.
9. Mujkić R, Šnajder Mujkić D, Ilić I, Grgić A, **Rođak E**, Divković D, i sur. Early childhood fat tissue changes – future risk for metabolic related diseases: subcutaneous and visceral fat adipose tissue CD163+ cells expression and collagen deposition in young male children. 13th Congress of the Croatian Cardiac Society with international participation under the patronage of the Croatian Academy of Sciences and Arts Hrvatska: Medical Publishing, d.o.o. Online; 2021. 57–57.
10. Bijelić N, Abramović M, Rajc J, Belovari T, **Rođak E**, Tolušić Levak M, i sur. Changes in TFF3 peptide expression in luminal B breast carcinoma after neoadjuvant chemotherapy. 19th International European Light Microscopy Initiative Meeting Abstract Book. Brno, Češka; 2019. 122–3.

11. Bijelić N, Belovari T, **Rođak E**, Kibel A, Rajc J, Selthofer-Relatić K. Postmortem quantification of intramyocardial fat infiltration using free and open-source software. 19th International European Light Microscopy Initiative Meeting Abstract Book. Brno, Češka; 2019. 130–130.

12. **Rođak E**, Lovrić I, Bijelić N, Belovari T. A novel and economical staining method for quick identification and evaluation of FFPE sections in a histology laboratory. Weber I, Tolić I, Kovačević G, Vidoš A, urednici. 17th International European Light Microscopy Initiative Meeting Program and Abstract Book. Dubrovnik, Hrvatska; 2017. 93–4.

13. Bijelić N, Stolnik D, **Rođak E**, Lovrić I, Belovari T. A method for measuring area and surface-related parameters on microphotographs by using free and open-source image processing software. Gajović A, Weber I, Kovačević G, Čadež V, Šegota S, Vidoš A, urednici. 13th Multinational Congress on Microscopy: Book of Abstracts. Rovinj, Hrvatska; 2017. 380–1.

14. **Rođak E**, Ivić K, Belovari T, Lovrić I, Bijelić N, Baus Lončar M. A histological analysis of glycogen content in hepatocytes of trefoil factor family 2 and trefoil factor family 3 knock-out mice. Weber I, Tolić I, Kovačević G, Vidoš A, urednici. 13th Multinational Congress on Microscopy: Book of Abstracts. Dubrovnik, Hrvatska; 2017. 335–335.

15. Kukolj M, Kunštić M, Gračan R, **Rođak E**, Oršolić N. The efficiency of caffeic acid on oxidative stress and angiogenesis in Ehrlich ascites tumor. Klobučar G, Kopjar N, Gligora Udovič M, Lukša Ž, Jelić D, urednici. 12 Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem. Sveti Martin na Muri, Hrvatska; 2015. 262–3.

16. Oršolić N, Đikić D, Nemrava J, Majcen P, Kunštić M, Kukolj M, **Rođak E**, i sur. The effectiveness of quercetin on biomarkers for osteoporosis. Klobučar G, Kopjar N, Gligora Udovič M, Lukša Ž, Jelić D, urednici. 12 Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem. Sveti Martin na Muri, Hrvatska; 2015. 265–6.