Učinak glukokortikosteroida na metabolizam kosti u mladih štakora

Šitum, Kristina

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:730653

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Kristina Šitum

UČINAK GLUKOKORTIKOSTEROIDA NA METABOLIZAM KOSTI U MLADIH ŠTAKORA

DOKTORSKI RAD

Mentorice: Dr.sc. Ines Glojnarić, viša znanstvena suradnica
Dr.sc. Koraljka Đurić, znanstvena suradnica

Zagreb, 2017.

University of Zagreb
Faculty of pharmacy and biochemistry

Kristina Šitum

GLUCOCORTICOSTEROID EFFECTS ON BONE METABOLISM IN YOUNG RATS

DOCTORAL THESIS

Supervisors: Ines Glojnarić, PhD, Associate research scientist
Koraljka Đurić, PhD, Assistant research scientist

Zagreb, 2017.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti
za područje biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana
medicinska biokemija

Doktorski rad pod stručnim vodstvom dr.sc. Ines Glojnarić, više znanstvene suradnice i dr.sc. Koraljke Đurić, znanstvene suradnice izrađen je u odjelu Farmakologija i ispitivanje neškodljivosti, GlaxoSmithKline Istraživački centar Zagreb d.o.o.

Dr.sc. Ines Glojnarić *rođena je 7. lipnja 1966. godine u Zagrebu gdje je završila osnovno i srednje obrazovanje. Diplomirala je 1990. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu. 1995. godine stekla je akademski stupanj magistra znanosti, a 2006. doktora znanosti za područje biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija. Znanstvenu karijeru započinje 1991. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu, te nastavlja na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, kao znanstveni novak. Od 1994. godine zaposlena je u Istraživačkom institutu PLIVA, kasnije GlaxoSmithKline, Galapagos i Fidelta. Od 2003. godine vodi istraživačke odjele i projekte u području farmakologije i toksikologije. Trenutno obnaša funkciju direktora odjela In vivo farmakologije i toksikologije te je odgovorna za farmakološko profiliranje novih kemijskih entiteta. Publicirala je 24 znanstvena rada, te sudjelovala na mnogobrojnim znanstvenim konferencijama. Izabrana je u znanstveno zvanje Višeg znanstvenog suradnika.*

Dr. sc. Koraljka Đurić*, mag. med. biochem., specijalistica medicinske biokemije, u Poliklinici Sunce radi od 2007. godine. Završila je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Specijalizirala je medicinsku biokemiju u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Radila je kao znanstveni novak na Katedri za ginekologiju i opstetriciju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te kao istraživač u Pliva – Istraživačkom institutu. Poslijediplomski studij Medicinske biokemije i doktorski studij završila je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U Poliklinici Sunce voditeljica je laboratorija i Odjela medicinsko biokemijske djelatnosti. Članica je Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Hrvatske komore medicinskih biokemičara. Recenzent je u internacionalnim časopisima te sudjeluje u edukacijskim programima kao predavač u prijediplomskoj i poslijediplomskoj nastavi.*

Zahvala

Svi naši snovi se mogu ostvariti, samo ako imamo dovoljno hrabrosti da idemo za njima.

Walt Disney

Zahvaljujem svojim mentoricama dr.sc. Ines Glojnarić i dr.sc. Koraljki Đurić na stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade doktorske disertacije.

Zahvalu upućujem svim djelatnicima odjela Farmakologija i ispitivanje neškodljivosti, a posebno Slavici Skender na pomoći pri praktičnom djelu laboratorijskih analiza. Zahvaljujem i mag.med.biokemije Lovorki Đerek na pomoći pri statističkoj obradi podataka.

Najveću zahvalu želim izraziti svojoj obitelji i prijateljima za svu podršku i razumijevanje tijekom cijelog studija, a posebno svom suprugu Ivici.

Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima...

SAŽETAK

Kosti su stalno u procesu trošenja i obnavljanja, a ravnoteža razgradnje i izgradnje preduvjet je za zdravo koštano tkivo. Slabljenje kvalitete kosti posljedica je poremećaja te ravnoteže. Za razgradnju su odgovori osteoklasti dok su za izgradnju odgovorni osteoblasti. Osteopenija je stanje smanjene gustoće kosti, a do nje može doći i zbog dugotrajne primjene glukokortikosteroida.

Glukokortikosteroidi su protuupalni lijekovi koji se, između ostalog, koriste za sprečavanje upale dišnih puteva kod astme. Budući je astma česta kronična bolest u djece potrebno je pratiti metaboličke i koštane učinke glukokortikosteroida tijekom terapije. Cilj ovog rada je uspostava modela hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima i odabir optimalnih biljega njihovih metaboličkih i koštanih učinaka.

Istražen je učinak 3 glukokortikosteroida na rast i promjenu metabolizma kosti te na ostale sustavne učinke u štakora. Beklometazon dipropionat, prednizolon i ciklezonid, davani mladim muškim Sprague-Dawley štakorima 7 dana u dozama od 0,3-10 mg/kg dnevno, s.c., su ovisno o dozi inhibirali indeks tjelesne mase timusa (za 57%, 44% i 76% s 3 mg/kg). Ciklezonid i manje učinkovit prednizolon su utjecali na ploču rasta glave femura inhibirajući rast femura (za 41% i 18% s 10 mg/kg), značajno smanjujući povećanje tjelesne mase (oboje za 100% s 10 mg/kg), te serumske koncentracije kisele fosfataze i tartarat rezistentne kisele fosfataze (za >30% s 10 mg/kg); oba su povećala serumske razine glukoze i triglicerida. Beklometazon dipropionat je imao slab učinak na ove dodatne varijable. Ciklezonid pokazuje izraženo inhibirajuće djelovanje na rast kosti u štakora. Možemo zaključiti da je ovo dobar model za ispitivanje utjecaja glukokortikosteroida na metabolizam kosti.

Ključne riječi

štakor, ploča rasta, beklometazon dipropionat, prednizolon, ciklezonid, serumske fosfataze

SUMMARY

Introduction

Bone in children is structurally different from adult bone. It is weaker but less brittle. Bone growth starts with cartilage formation. Then vessels invade the cartilage, delivering pluripotent stem cells, which initiate the formation of a primary center of ossification. Secondary ossification centers are formed at each end of long bone, and between the primary and secondary ossification centers the growth plate, or physis, develops. Bone grows as secondary and primary ossification centers unite.

Bone tissue is in dinamic process of constant deteriorating and regeneration. Weakening of bone quality is a result of imbalance in a process of bone remodelling. Bone remodelling has two stages: bone resorption with the osteoclasts, bone cells which resorb the bone, and bone formation with osteoblasts, bone cells which form the bone. The bone remodelling cycle ends with bone mineralisation. The content of mineral in bones is defined as bone density. Osteopenia is a condition with decreased bone density. Apart being a sign of normal aging, osteopenia can be induced with prolonged use of glucocorticosteroids.

Glucocorticosteroids are antiinflammatory medications prescribed, among others, for reducing and prevention inflammation of respiratory pathways in asthma. Since asthma is the most common chronic disease in children, need for monitoring metabolic and bone effects of glucocorticosteroids during therapy is appearing. Although inhaled glucocorticoids are known to have systemic effects on bone metabolism, there is little comparative information on their relative potencies.

The goal of this work is establishment of glucocorticosteroid induced hypoplasia of the physis and finding the optimal markers of their metabolic and bone effects.

The effects of three standard glucocorticoids, beclomethasone dipropionate, prednisolone and ciclesonide, in causing changes in bone metabolism and growth were investigated in relation to other systemic effects in the rat.

Materials and Methods

Male, specific pathogen-free, Sprague-Dawley rats, 4,5–5,5 weeks old (at the beginning of the experiments), were used in the study.

The rat femur model of glucocorticosteroid-induced hypoplasia of the physis was established according to Belvisi et al., using subcutaneous (s.c.) drug administration to allow for future parenteral comparison with novel compounds. Briefly, rats were randomly assigned to experimental groups of 8 animals each. In total, three experiments were performed for each glucocorticoid; beclomethasone dipropionate, prednisolone and ciclesonide, at doses of 0,3–10 mg/kg daily for 7 days. Animals in the control groups received s.c. the volume of 10 ml/kg of vehicle (4% DMSO in 0,125% CMC) daily, for 7 days. Twenty-four hours after the last treatment, animals were anaesthetized with sodium thiopental and the blood was collected at exsanguination in order to obtain serum. Also, thymus weights were recorded and the femoral bones removed (for measurement of the thickness of the proliferating zone). Animal body weights were correspondingly documented at the beginning and at the end of each experiment. Body weight gain was calculated as the change in body weight from day 1 until 24 h after treatment on day 7.

Biochemical analyses were performed on rat sera. Serum concentrations of glucose and triglycerides, alkaline and acid phosphatases, and tartrate-resistant acid phosphatase were determined on the biochemical analyzer. Concentration of osteocalcin, as a biochemical marker for bone formation, and TRACP 5b, as a biochemical marker for bone resorption, were also determined using ELISA.

The thymus was dissected free of connective tissue and immediately weighed. Thymus body mass index (BMI) was calculated according to the following formula: BMI (thymus)=thymus weight (mg)/body mass (mg). The left femur was exposed and removed with the head intact in the acetabulum by cutting through the pelvic girdle and through the femur shaft above the knee joint. The tissue was then fixed in 10% neutral buffered formalin for histological assessment.

For the purpose of quantitative histology of the femoral head proliferating zone femurs were fixed, decalcified and processed to paraffin using the unit for tissue processing. Three-micrometer-thick sections were cut in a way to include femoral head and stained. The femoral

head growth plate was examined under a light microscope. Images of the growth plate were captured onto a computer. One image was captured from each tissue section, five measurements of the growth plate width being obtained from each calibrated image. Measurements involved drawing a line perpendicular to the growth plate between the edge of the hypertrophic zone, distal to the articular cartilage and the end of the proliferating zone.

Results

Daily treatment for 7 days with standard glucocorticoids resulted in significant increases in serum glucose and triglycerides concentrations at the highest doses (10 mg/kg) of prednisolone and ciclesonide. The most pronounced changes were observed with ciclesonide, which also significantly increased serum triglycerides at a daily dose of 3 mg/kg.

None of the standard glucocorticoids had any significant effect on serum ALP, over the tested dose range, given daily for 7 days. However, at the highest dose (10 mg/kg), prednisolone and ciclesonide significantly inhibited both serum ACP and TRACP. The most pronounced changes were observed with ciclesonide, which also significantly decreased serum ACP and TRACP at a daily dose of 3 mg/kg. Beclomethasone dipropionate was less effective, causing a slight but significant decrease in serum ACP (but not TRACP) at doses of 0,3 and 1 mg/kg.

The comparative potency of the three glucocorticoids in influencing non-specific serum parameters of bone metabolism was also reflected in their effects on the proliferating zone thickness of the femoral bone head. While beclomethasone dipropionate had no significant effect, ciclesonide and prednisolong decreased physeal growth plate width. Prednisolone reduced median bone growth by 18% at the highest dose (10 mg/kg) and ciclesonide caused a dosedependent reduction in median bone growth, with significant inhibition of up to 41% over the whole tested dose range (0,3–10 mg/kg).

All three standard glucocorticoids exerted significant, dose related inhibitory effects on median body weight gain and thymus body mass indices after daily treatment for 7 days. Beclomethasone dipropionate was the least growth inhibitory; although it caused statistically

significant inhibition of thymus BMIs by 50% at dose of 1 mg/kg per day, it caused statistically significant 23% inhibition of median body weight gain only at 10 mg/kg per day. Prednisolone affected thymus BMIs causing statistically significant inhibition by 44% at dose of 3 mg/kg per day and body weight gain causing statistically significant inhibition by 33% at dose of 1 mg/kg per day. Ciclesonide exerted the most pronounced inhibition of body weight gain and thymus BMIs, causing statistically significant inhibition by 34% and 55%, respectively, already at the lowest dose of 0,3 mg/kg per day.

In order to see how examined glucocorticoids effected bone markers results showed that prednisolone had no statistical effect on bone formation while ciclesonide significantly reduced osteocalcin concentration in doses of 3 and 10 mg/kg per day (157 ng/mL and 88 ng/mL, respectively) vs. control (453 ng/mL).

On the other hand, ciclesonid showed no significant effect on bone resorption while prednisolone significantly reduced TRACP 5b concentration at the highest dose of 10 mg/kg per day compared to negative control group (10,6±0,9 U/L vs. 19,7±3,1 U/L).

Conclusions

Ciclesonide, although a pro-drug, still has potent systemic activity in the rat, causing typical glucocorticoid effects, including inhibition of bone growth. Prednisolone exhibits a similar, though less potent, spectrum of systemic activity, while beclomethasone dipropionate has weak activity in causing systemic metabolic effects, but retains thymus inhibiting potency. However, although the distinction between the effect of glucocorticoids on bone growth was observed in this study, the model can provide the toxic effect dose titration as well as distinction between toxic effect potency of different glucocorticoids. Therefore it can be concluded that this model is sufficiently sensitive and specific for testing the effect of glucocorticoids on bone metabolism.

Keywords

Rat, growth plate, beclomethasone dipropionate, prednisolone, ciclesonide, serum phosphatases

SADRŽAJ

1. UVOD....1
1.1. Glukokortikosteroidi....3
1.1.1. Glukokortikosteroidi i njihov mehanizam djelovanja....3
1.1.2. Glukokortikosteroidi u liječenju astme....6
1.2. Metabolizam ugljikohidrata (glukoze)....12
1.3. Metabolizam lipida....16
1.4. Kost....21
1.4.1. Građa i sastav kosti....21
1.4.2. Koštana pregradnja....24
1.4.3. Koštane stanice....25
1.5. Hipoplazija kosti i osteopenija....27
1.6. Koštani biljezi....28

2. OBRAZLOŽENJE TEME....31
2.1. Radna pretpostavka....32
2.2. Cilj rada....33

3. MATERIJALI I METODE....35
3.1. Uspostava modela hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima u mladih Sprague-Dawley štakora....36
3.1.1. Kemikalije....36
3.1.2. Potrošni materijal i pribor....37
3.1.3. Oprema....37
3.1.4. Životinje u pokusu....38
3.1.5. Plan pokusa....38
3.1.6. Uzorkovanje krvi....41
3.1.7. Histopatološka procjena....42
3.2. Biokemijske pretrage štakorskog seruma....44
3.2.1. Priprema uzoraka....44
3.2.2. Određivanje koncentracije glukoze u serumu....45
3.2.3. Određivanje koncentracije lipida u serumu....45

3.2.4. Određivanje koncentracije biljega osteoblasta u serumu.....46
3.2.5. Određivanje koncentracije biljega osteoklasta u serumu.....47
3.3. Statistička obrada podataka.....48

4. REZULTATI.....49
4.1. Uspostava modela hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima.....50
4.1.1. Učinak glukokortikosteroida na koncentraciju glukoze u serumu mladih štakora.....50
4.1.2. Učinak glukokortikosteroida na koncentraciju triglicerida u serumu mladih štakora.....51
4.1.3. Učinak glukokortikosteroida na katalitičku koncentraciju ALP u serumu mladih štakora.....52
4.1.4. Učinak glukokortikosteroida na katalitičku koncentraciju ACP u serumu mladih štakora.....53
4.1.5. Učinak glukokortikosteroida na katalitičku koncentraciju TRACP u serumu mladih štakora.....55
4.1.6. Učinak glukokortikosteroida na prirast tjelesne mase mladih štakora.....56
4.1.7. Učinak glukokortikosteroida na indeks mase timusa mladih štakora.....59
4.1.8. Učinak glukokortikosteroida na proliferativnu zonu glave femura mladih štakora.....62
4.2. Metabolički i koštani biljezi nakon primjene prednizolona i ciklezonida.....65
4.2.1. Učinak prednizolona i ciklezonida na koncentraciju glukoze u serumu mladih štakora.....65
4.2.2. Učinak prednizolona i ciklezonida na koncentraciju lipida u serumu mladih štakora....66
4.2.3. Učinak prednizolona i ciklezonida na katalitičku koncentraciju ALP u serumu mladih štakora.....69
4.2.4. Učinak prednizolona i ciklezonida na koncentraciju osteokalcina u serumu mladih štakora.....70
4.2.5. Učinak prednizolona i ciklezonida na katalitičku koncentraciju ACP u serumu mladih štakora.....72
4.2.6. Učinak prednizolona i ciklezonida na katalitičku koncentraciju TRACP u serumu mladih štakora.....72
4.2.7. Učinak prednizolona i ciklezonida na koncentraciju TRACP 5b izoforme u serumu mladih štakora.....73

5. RASPRAVA.....75

6. ZAKLJUČCI.....84

7. LITERATURA.....87

ŽIVOTOPIS.....100
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....103
BASIC DOCUMENTATION CARD.....104

Popis skraćenica

ACP	Kisela fosfataza
ALP	Alkalna fosfataza
CHOD-PAP	Kolesterol-oksidaza-4-aminoantipirin
CHOL	Kolesterol
CMC	Karboksimetil celuloza
DMSO	Dimetil sulfoksid
ELISA	Enzimski imunotest na čvrstoj fazi
GK	Glukokortikosteroid
GLU	Glukoza
GPO-PAP	Glicerolfosfat-4-aminoantipirin
HDL	Lipoproteini visoke gustoće (*engl. high density lipoproteins*)
ITM	Indeks tjelesne mase
LDL	Lipoproteini niske gustoće (*engl. low density lipoproteins*)
MK	Masne kiseline
NK	Negativna kontrola
OC	Osteokalcin
TG	Trigliceridi
TMB	Tetrametilbenzidin
TRACP	Tartarat rezistentna kisela fosfataza
UGH	Ugljikohidrati

1. UVOD

Kost u djece je strukturno različita od kosti odrasle osobe. Njihova kost je slabija, ali manje krhka. Rast kosti započinje formiranjem hrskavičnog modela (Benson i sur., 2010). Zatim žile nadiru u hrskavicu, donoseći pluripotentne matične stanice koje započinju stvaranje primarnog centra osifikacije. Sekundarni centri osifikacije se stvaraju na oba kraja dugih kosti. Između primarnih i sekundarnih centara osifikacije razvija se fiza, odnosno ploča rasta. Tijekom djetinjstva se sekundarni centri osifikacije ujedinjuju s primarnima i na taj način kost raste.

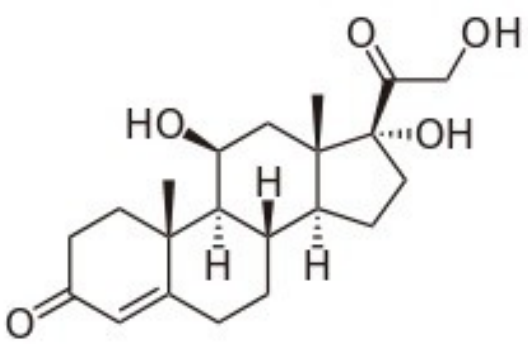
Koštano tkivo u dinamičkom je procesu neprestana trošenja i obnavljanja, pa je ravnoteža u razgradnji i stvaranju nove kosti preduvjet za zdravo koštano tkivo. Slabljenje strukture, odnosno kvalitete kosti, dovodi do osteopenije i kasnije osteoporoze, a posljedica je poremećaja ravnoteže u procesu koštane pregradnje. Pregradnja kosti odvija se u dvije faze. Prva je razgradnja (resorpcija), za koju su odgovorne specijalizirane koštane stanice osteoklasti koji djeluju na površini koštanih gredica. Druga faza je izgradnja kosti pod utjecajem osteoblasta koji udubine nastale razgradnjom kosti ispunjavaju kolagenom. U mrežu kolagenih vlakana odlažu se minerali, te ciklus koštane pregradnje završava mineralizacijom kosti (Kohrt i sur., 2004). Sadržaj minerala u kosti definira se kao koštana gustoća a osteopenija je stanje u kojem je gustoća kosti smanjena. Osim što je osteopenija znak normalnog starenja, do nje može doći i zbog dugotrajne primjene glukokortikosteroida.

Sredinom prošlog stoljeća glukokortikosteroidi su uvedeni u kliničku primjenu kako bi osigurali liječenje raznih upalnih bolesti kao što su astma i reumatoidni artritis. No, već tijekom prvih nekoliko godina prijavljeni su slučajevi lomova kostiju nakon najmanjih trauma u pacijenata koji su bili na terapiji glukokortikosteroidima, te se pojavio klinički problem osteopenije izazvane glukokortikosteroidima koji je ostao i do danas. Budući je astma najčešća kronična bolest u djece, i kako se glukokortikosteroidi koriste za smanjenje i spriječavanje upale dišnih puteva kod astme, postoji stalna mogućnost razvoja osteopenije kod djece na terapiji. Zbog toga se nameće potreba za praćenjem metaboličkih i koštanih učinaka glukokortikosteroida tijekom terapije.

1.1. Glukokortikosteroidi

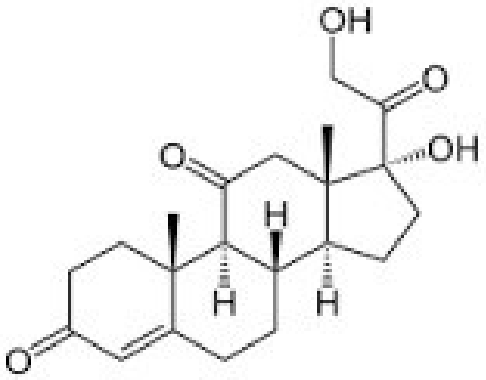
1.1.1. Glukokortikosteroidi i njihov mehanizam djelovanja

Hormoni koje luči kora nadbubrežne žlijezde neophodni su za život. To se prvenstveno odnosi na kortizol i aldosteron. Kortikosteroidi, preciznije 17-hidroksikortikosteroidi ili drugim imenom glukokortikoidi, izlučuju se u zoni fascikulati. Kortizol (slika 1.) je najvažniji prirodni glukokortikosteroid, poznat je i kao spoj F ili hidrokortizon. Djelovanjem enzima 11ß-hidroksisteroidne dehidrogenaze tipa 1 i 2 iz kortizola nastaje kortizon (slika 2.). Samo enzim tipa 1 omogućuje dvosmjernu reakciju (O'Regan i sur., 2001). Glukokortikoidi se vežu na specifične receptore u mnogim tkivima i tako utječu na metaboličke procese. Njihovo se djelovanje klasično odvija preko transkripcije gena i stvaranja mRNA i sinteze proteina, do čega dolazi nakon što se hormon veže na citoplazmatski proteinski receptor i zatim djeluje na jezgru stanice. Uz genomske, postoje i negenomski učinci kortikosteroida, koji nastupaju brže. Specifični negenomski učinci nastaju preko steroidnih receptora na staničnoj membrani koji aktiviraju proteinske kinaze u citoplazmi, a ne djeluju na jezgru stanice. Kortikosteroidi u visokim dozama mogu izazvati i nespecifične negenomske parakrine učinke zbog fizikalno-kemijskih interakcija sa staničnim membranama (Juretić, 2004).



Preuzeto iz: *https://sh.wikipedia.org/wiki/Kortizol,* pristupljeno 6.2.2017.

Slika 1. Shematski prikaz strukture kortizola



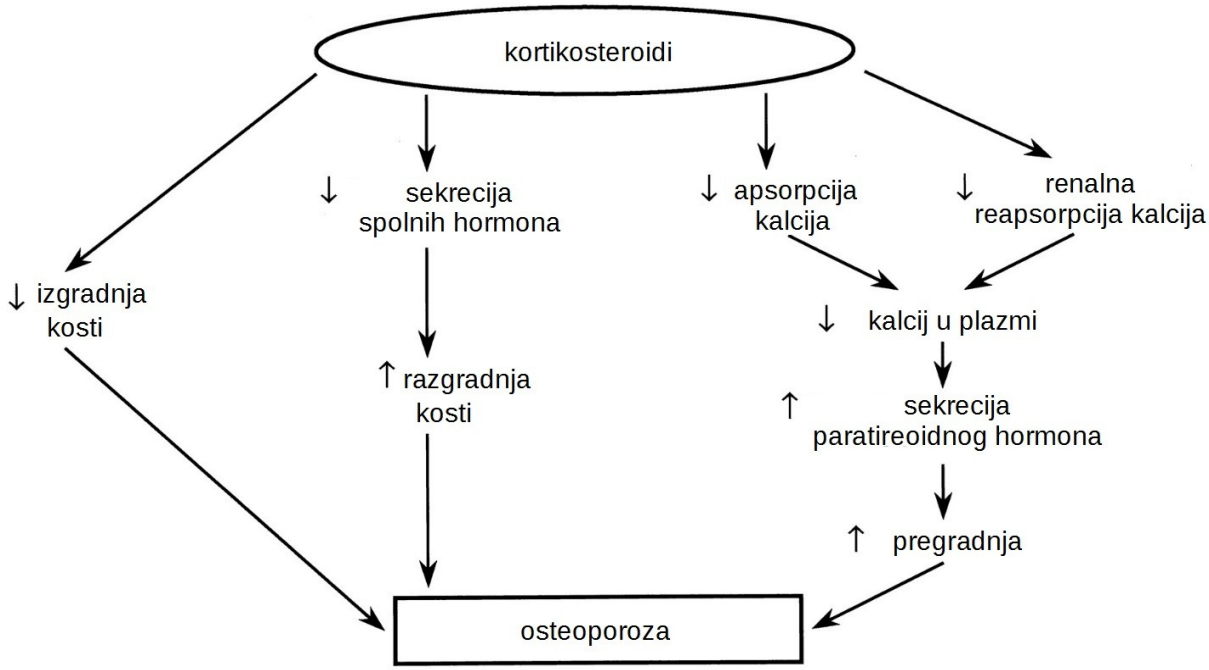
Preuzeto iz: *http://www.kortizon.gen.tr/kortizon-vucuttan-nasil-atilir.html,* pristupljeno 6.2.2017.

Slika 2. Shematski prikaz strukture kortizona

U mnogim tkivima glukokortikosteroidi pokreću kataboličke procese. Tako, primjerice, pod njihovim utjecajem dolazi do razgradnje proteina u mišićima, koži, vezivnom, masnom i limfnom tkivu. S druge strane, u jetri glukokortikoidi stimuliraju enzime glukoneogeneze i povećavaju količinu glikogena i proteina. U suvišku oni dovode do hiperglikemije, hipertenzije, hipertrofične kardiomiopatije, gastro-intestinalnog krvarenja i perforacije crijeva, smanjuju rast i prirast tjelesne mase. Postoje brojni sintetski analozi kortizona i hidrokortizona. Prednizon i prednizolon karakterizira dodatna dvostruka veza u prstenu A. Njihovo je protuupalno djelovanje četiri puta jače u odnosu na prirodne kortikosteroide. Isto je toliko izraženiji i njihov učinak na metabolizam ugljikohidrata, dok je djelovanje na retenciju vode i soli oslabljeno. Halogenirani derivati imaju dodatno višestruko pojačan protuupalni učinak, koji u najvećoj mjeri proizlazi iz promijenjenog kretanja neutrofila. Naime, zbog djelovanja kortikosteroida, endotelne stanice i neutrofili ispoljavaju manje adhezijskih molekula na površini, što može biti rezultat smanjene produkcije proupalnih medijatora u makrofazima. To je razlog da se neutrofili ne zaustavljaju uz endotel i ne odlaze na mjesto upale. Uz to se smanjuje vazodilatacija, stabilizira membrana lizosoma i smanjuje fagocitoza (Juretić, 2004).

Glukokortikosteroidi su sintetski proizvedeni lijekovi koji jako sliče kortizolu, a koriste se za smanjenje upalnih procesa u mnogim kroničnim bolestima. Kad dođe do upale, leukociti migriraju iz krvnih žila, nakon čega se kemokini iz leukocita oslobađaju da bi spriječili djelovanje stranih agenasa. No, katkada leukociti mogu nanijeti štetne učinke za organizam. Glukokortikosteroidi djeluju tako da smanjuju upalu kako bi minimalizirali oštećenje tkiva, te snizuju aktivnost imunosnog sustava djelujući na funkciju limfocita.

Pojava neželjenih učinaka glukokortikosteroida ovisi o dozi, vrsti glukokortikosteroida te o dužini same primjene. Neki od neželjenih učinaka su: mišićna slabost, zamućen vid, smanjenje koštane mase, pogoršanje dijabetesa, visoki krvni tlak, retencija vode, glaukom, iritacija želuca, problemi sa spavanjem i sl. Da bi se ti učinci smanjili na minimum, glukokortikosteroide treba uzimati samo kada je zaista neophodno, redovito treba pratiti pacijente na terapiji, po mogućnosti koristiti lokalnu aplikaciju lijeka, uzimati minimalne doze, te ih postupno smanjivati dok je bolest pod kontrolom, pratiti krvni tlak i uzimati kalcij za održavanje koštane gustoće. Glukokortikosteroidi imaju i direktan i indirektan učinak na koštano tkivo koji dovodi do gubitka koštane mase (slika 3.). Direktni učinak se odnosi na smanjenje koštanih stanica, odnosno na produženje života osteoklasta i povećanje apoptoze osteoblasta (Ćurković, 2007) što dovodi do smanjenja koštane izgradnje. Indirektno, mogu utjecati na ravnotežu metabolizma kalcija u organizmu i na stvaranje spolnih hormona, što opet dovodi do smanjenja koštane mase. Stoga je neophodno uzimati nadomjestke kalcija dok je pacijent na terapiji glukokortikosteroidima.



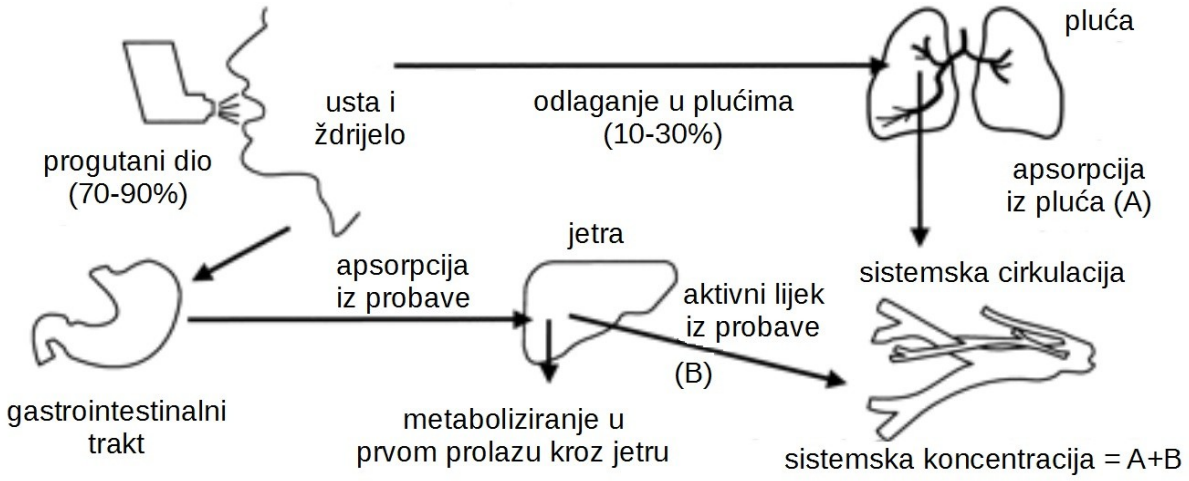
Preuzeto iz: *http://pediatrics.aappublications.org/content/109/Supplement_E1/373,* pristupljeno 6.2.2017.

Slika 3. Učinak glukokortikosteroida na metabolizam kosti

1.1.2. Glukokortikosteroidi u liječenju astme

Astma je uzrokovana upalom dišnih puteva što dovodi do oticanja, suženja i pojačane osjetljivosti dišnih puteva na iritanse. Protuupalni lijekovi smanjuju upalu, pa se na taj način smanjuje i spriječava daljnje oticanje dišnih puteva, smanjuje se njihovo suženje prouzročeno kontrakcijom mišića, a dišni putevi postaju manje osjetljivi na pokretače astme. Protuupalni su lijekovi vrlo učinkoviti i u većine ljudi mogu kontrolirati astmu. Najučinkovitiji protuupalni lijekovi su inhalacijski kortikosteroidi, kao što su budezonid, beklometazon i flutikazon. Glukokortikosteroidi se u astmi obično primjenjuju udisanjem (inhalacijom), pa ih zovemo inhalacijski kortikosteroidi ili inhalacijski glukokortikosteroidi.

Glukokortikosteroidi se u liječenju astme udišu tako da na taj način lijek odlazi ravno u upalom pogođene dišne puteve. Ovako se znatno smanjuje rizik mogućeg štetnog učinka na ostatak organizma. Mala količina lijeka koja dođe do krvotoka brzo se uklanja pa ne nastaju nuspojave koje se mogu pojaviti prilikom drugačijeg načina primjene steroidne terapije (slika 4.). Sistemska bioraspoloživost glukokortikosteroida je izrazito bitna za uspostavu ravnoteže između ciljanog i željenog terapijskog učinka i neželjenih sistemskih učinaka. Ovo je vrlo važno kod male djece i dojenčadi (Allen, 2002) i tijekom trudnoće. Dugotrajno liječenje glukokortikosteroidnim tabletama stavlja majku i nerođeno dijete u značajan rizik različitih komplikacija.



Preuzeto iz: *http://pediatrics.aappublications.org/content/109/Supplement_E1/373,* pristupljeno 6.2.2017.

Slika 4. Sistemska bioraspoloživost glukokortikosteroida

Unatoč svim negativnim učincima, inhalacijski glukokortikosteroidi i dalje su lijek izbora za astmu (Gentile i Skoner, 2010). Klinička i biološka aktivnost inhalacijskih glukokortikosteroida ovisi o njihovoj bioraspoloživosti, afinitetu za receptor, lipofilnosti, poluživotu eliminacije i molekularnoj masi (Chciałowski i Płusa, 2004). Ciklezonid, kao novi

inhalacijski glukokortikosteroid, sam po sebi je neaktivan i koristi se kao prekursorski lijek koji se treba otpustiti pomoću plućnih esteraza kako bi postigao protuupalnu aktivnost. Zahvaljujući svojoj velikoj brzini aktivacije, dugoj kliničkoj učinkovitosti (u dozi od 100-800 mikrograma/danu), te prilično blagim neželjenim učincima, ciklezonid je jako učinkovit kao lokalni protuupalni lijek.

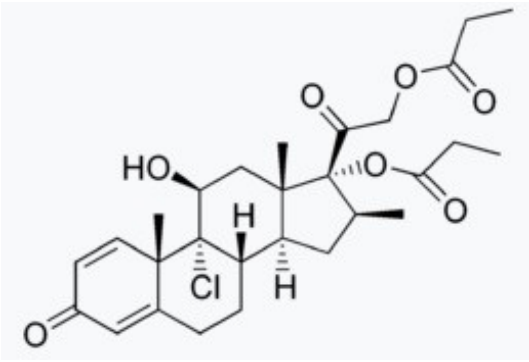
Nedavno su razvijeni inhalatori koji sadrže male čestice inhalacijskih glukokortikosteroida, dva takva sadrže čestice beklometazon dipropionata i ciklezonida. Glavna prednost tih malih čestica je povećana dostupnost lijeka u plućima, te je tako postignuta kontrola astme s nižim dnevnim dozama lijeka. Druga prednost tih malih čestica je povećana učinkovitost, a postoji mogućnost i da se poveća sigurnost smanjenjem mogućnosti nastanka orofaringealne kandidijaze.

Kortikosteroidne tablete (obično prednizolon ili prednizon) ili injekcije mogu pomoći u liječenju teških napada astme kada inhalacijski kortikosteroidi nemaju zadovoljavajući učinak ili nisu dostupni. Kratkotrajno liječenje kortikosteroidnim tabletama ili injekcijama uzrokuje nekoliko nuspojava. Visoke doze mogu privremeno utjecati na raspoloženje. Dugotrajno liječenje kortikosteroidnim tabletama ili injekcijama može prouzročiti nuspojave kao što su osteoporoza, kožna preosjetljivost, porast tjelesne mase, porast krvnog tlaka, glaukom i porast vrijednosti glukoze u krvi. Ovi se rizici izbjegavaju ukoliko se što prije primjene inhalacijski kortikosteroidi, te se izbjegavaju dugotrajne primjene kortikosteroidnih tableta ili injekcija.

Beklometazon dipropionat

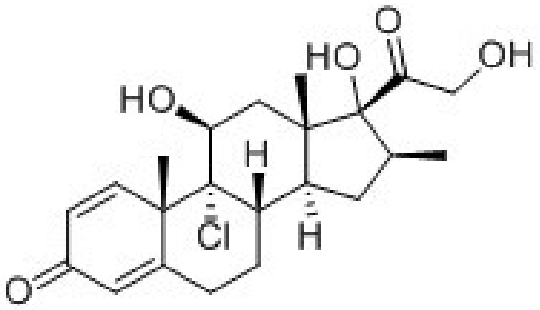
Beklometazon je aktivna supstanca beklometazon dipropionata (slika 5.) koji je zapravo steroidni predlijek. Beklometazon dipropionat je patentiran 1962. godine a od 1972. godine se koristi u liječenju (McPherson, 2007) te se smatra izrazito učinkovitim i sigurnim lijekom. Dostupan je kao inhalator, krema, tablete i sprej za nos a u dugoročnom liječenju astme koristi se inhalacijski oblik. Beklometazon dipropionat ima jaku glukokortikoidnu

aktivnost a nakon unosa u organizam metabolizira se u farmakološki aktivnu tvar beklometazon (slika 6.).



Preuzeto iz: *htttp://www.wikiwand.com/sh/Beklometazon_dipropionat,* pristupljeno 6.2.2017.

Slika 5. Shematski prikaz strukture beklometazon dipropionata



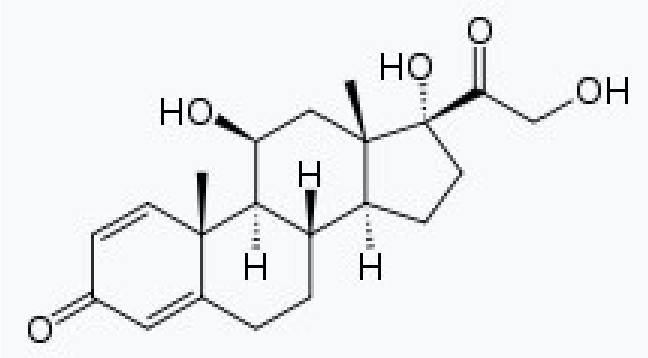
Preuzeto iz: *https://pl.wikipedia.org/wiki/Beklometazon,* pristupljeno 6.2.2017.

Slika 6. Shematski prikaz strukture beklometazona

Prednizolon

Prednizolon (slika 7.) je sintetski glukokortikoid s protuupalnim djelovanjem koji se upotrebljava u nadomjesnome liječenju adrenokortikalne insuficijencije te u liječenju astme, multiple skleroze, reumatoidnog artritisa, dermatitisa i drugih upalni stanja, autoimunih

bolesti i karcinoma. Protuupalno djelovanje prednizolona je i do četiri puta jače od prirodnih kortikosteroida. Ovaj analog kortizola otkriven je 1955. godine i iste godine odbrena je njegova upotreba u liječenju (Kim i sur., 2016) a u organizam se može unijeti peroralno, intravenozno te preko kože i sluznice. Dugotrajna uporaba prednizolona dovodi do gubitka koštane mase. Zbog svoje dominantne glukokortikoidne a niske mineralokortikoidne aktivnost prednizolon je često lijek izbora u liječenju astme (Fiel i Vincken, 2006).



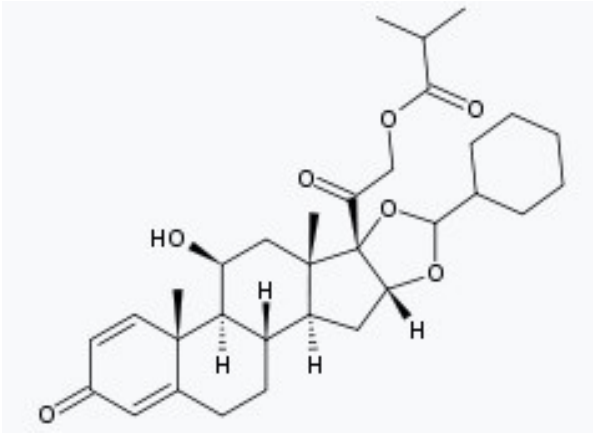
Preuzeto iz: *http://www.wikiwand.com/pl/Prednizolon,* pristupljeno 6.2.2017.

Slika 7. Shematski prikaz strukture prednizolona

Kortikosteroidi općenito, pa tako i prednizolon, sprečavaju upalne odgovore na brojne poticajne tvari i pretpostavlja se da odgađaju ili usporavaju liječenje tako što sprečavaju edeme, odlaganje fibrina, proširenje kapilara, migraciju leukocita, proliferaciju kapilara i fibroblasta, te odlaganje kolagena i stvaranje ožiljka (Lee, 2015).

Ciklezonid

Ciklezonid (slika 8.) je glukokortikoid koji se koristi u liječenju astme i alergijskog rinitisa. 2006. godine Američka administracija za hranu i lijekove odobrila je ciklezonid za liječenje odraslih i djece starije od 12 godina.



Preuzeto iz: *https://sl.wikipedia.org/wiki/Ciklezonid,* pristupljeno 6.2.2017.

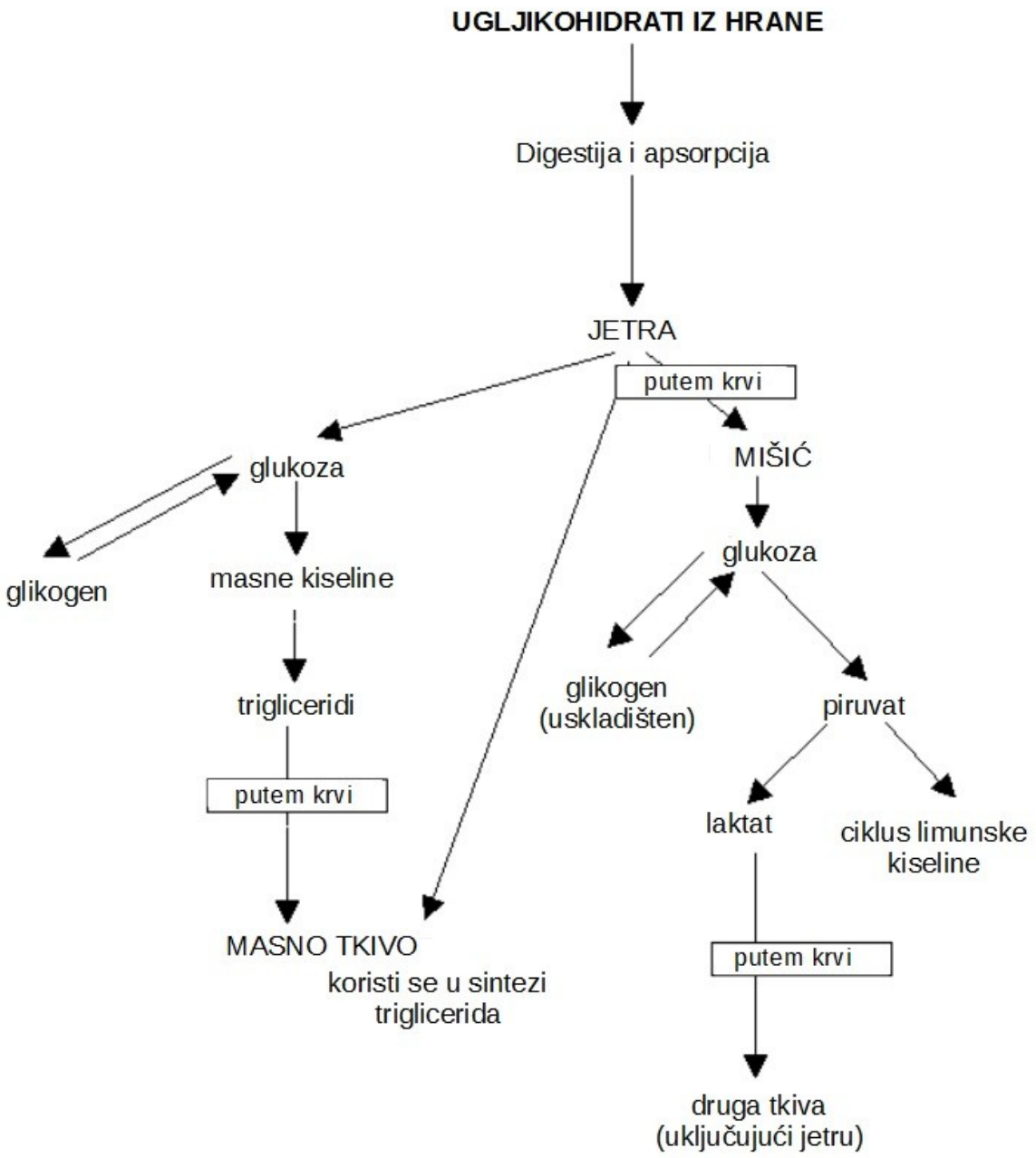
Slika 8. Shematski prikaz strukture ciklezonida

Ciklezonid je zapravo predlijek koji se u plućima pretvara u aktivni metabolit desizobutiril-ciklezonid. Desizobutiril-ciklezonid ima puno jači protuupalni učinak od ciklezonida pa je stoga i lokalni učinak ovog metabolita jači dok su sistemske nuspojave manje. Ciklezonid, kao inhalacijski kortikosteroid, ima pogodna farmakokinetička i farmakodinamička svojstva koja uključuju nisku oralnu bioraspoloživost, snažno vezanje na proteine plazme i brzo izlučivanje, visoko odlaganje i distribuciju te dugo zadržavanje u plućima. Ove korisne osobine čine ciklezonid vrlo učinkovitom opcijom u liječenju s rijetkim nuspojavama. Brojne kliničke studije ukazuju na sigurnost i učinkovitost ciklezonida u liječenju blage, umjerene i teške astme u pacijenata. (Mukker, Singh i Derendorf, 2016).

Iako su se ovi glukokortikosteroidi pokazali kao dobri lijekovi u terapiji astme njihovi sustavni učinci uzrokuju usporeni rast u djece i smanjenu mineralnu gustoću kosti (Skoner, 2016). Stoga se, samo po sebi, nameće pitanje u kojoj mjeri oni utječu na rast i zdravlje kosti, posebno kod djece.

1.2. Metabolizam ugljikohidrata (glukoze)

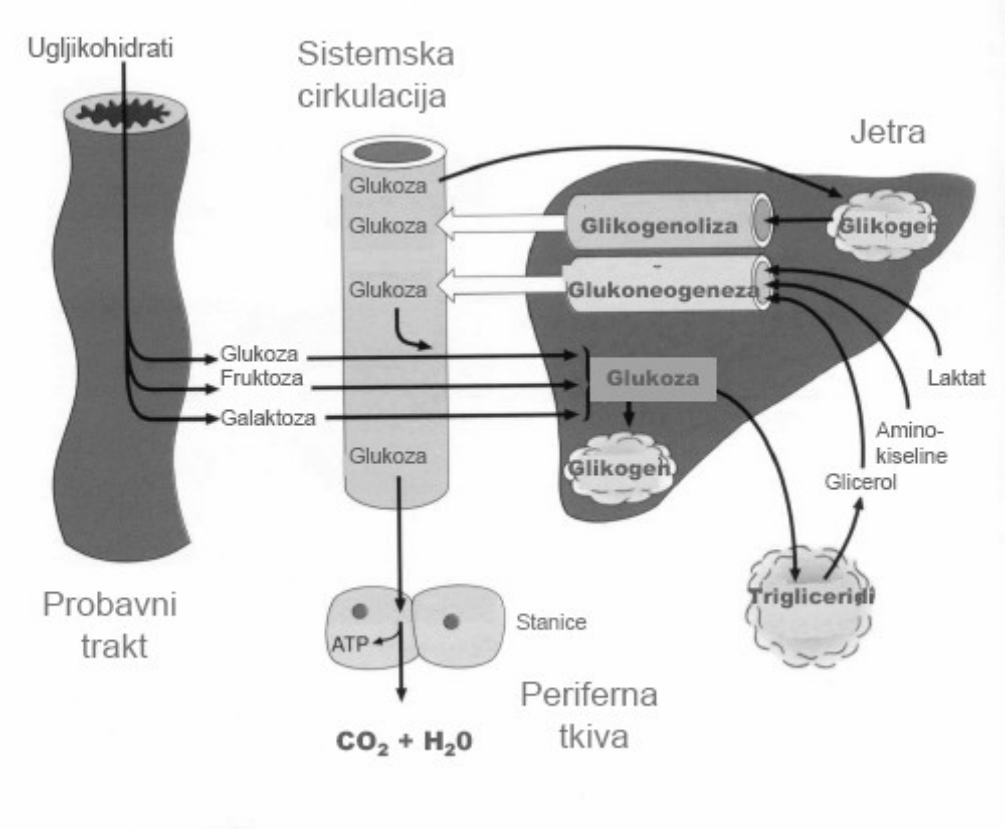
Glukoza nastaje glikogenolizom (prevladava u stanju natašte) i glukoneogenezom (povećava se produljenim gladovanjem). Tijekom gladovanja jetra, a u manjoj mjeri bubrezi, otpuštaju glukozu. Skladištenje glukoze u mišiće i masno tkivo je minimalno, a lipidi postaju glavni izvor energije. Poslije jela, porastom glukoze i inzulina (Beck-Nielsen, Alford i Hother-Nielsen, 2005) nastaje gotovo potpuna supresija endogenog stvaranja glukoze u jetri, započinje skladištenje glukoze u mišiće, jetru i masno tkivo, a i inhibicija glikogenolize, glukoneogeneze i lipolize (Gerich i sur., 2001; Moller i sur., 2001). Glukoza ulazi u stanicu glukoznim transporterima, poslije čega se fosforilira u glukoza-6-fostat (G-6-P), koji može poslužiti kao izvor energije (glikoliza) ili se može pohraniti kao glikogen ili trigliceridi (Metelko i Crkvenčić, 2004). Metabolizam ugljikohidrata prikazan je dijagramom na slici 9. Nakon unosa ugljikohidata u organizam i apsorpcije, ugljikohidrati odlaze u jetru gdje se jedan dio pretvara u glukozu, drugi odlazi u krvotok i putuje do mišića, a dio se može odmah pohraniti u masnom tkivu. Glukoza nastala u jetri može se pohraniti kao glikogen ili putem masnih kiselina i triglicerida kao masno (adipozno) tkivo. U mišićima također nastaje glukoza koja se opet može pohraniti kao glikogen ili se može iskoristiti u mišićima ili nekom drugom tkivu, npr. jetri.



Slika 9. Dijagram metabolizma ugljikohidrata

Na slici 10. prikazan je metabolizam ugljikohidrata u jetri. Ugljikohidrati iz probavnog trakta odlaze u sistemsku cirkulaciju otkuda se mogu prenijeti u jetru ili pak do perifernih tkiva koja će u stanicama odmah iskoristiti glukozu za energiju. U jetri se glukoza može, kako

je već spomenuto, uskladištiti u vidu glikogena ili prijeći u masne kiseline, pa u trigliceride i tako se uskladištiti u masnom tkivu. U povratnom smjeru, kada je snižena koncentracija glukoze u krvi i u stanicama, u jetri može glukoza nastati na dva načina: glikogenolizom iz glikogena ili glukoneogenezom iz glicerola, aminokiselina i/ili laktata. Prinos energije dobiven hidrolizom iz uskladištenog glikogena i naknadna oksidacija otpuštene glukoze jednaki su u mišićima i jetri.



Preuzeto iz: *http://nuraisyahsukor.weebly.com/blog,* pristupljeno 8.2.2017.

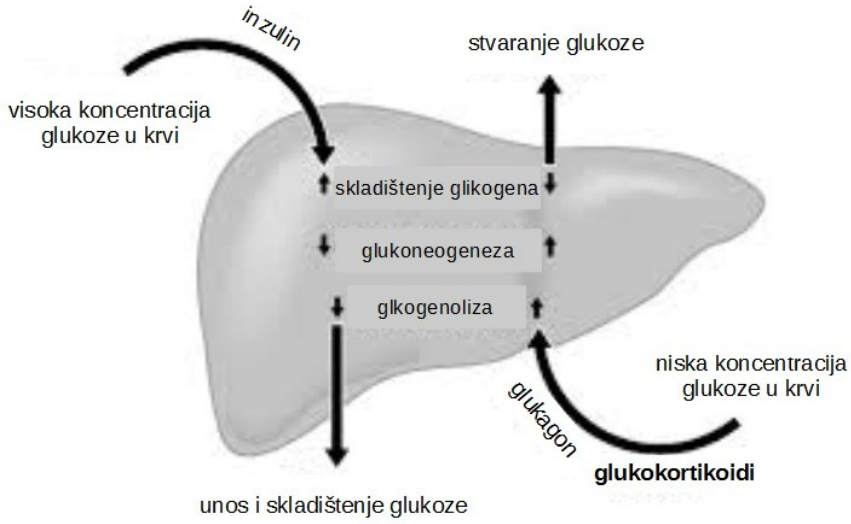
Slika 10. Metabolizam ugljikohidrata u jetri

Kao što je već rečeno, glavna uloga glukokortikosteroida je utjecaj na metabolizam glukoze, te proteina i masti. Učinci kortizola, kao hormona kore nadbubrežne žlijezde, na metabolizam su sljedeći: kortizol u jetri povećava glukoneogenezu (stvaranje glukoze iz aminokiselina i drugih spojeva), uzrokuje smanjenje količine proteina u svim stanicama osim

u jetrenim, povećava iskorištavanja masnih kiselina za dobivanje energije u stanici, te smanjuje iskorištavanje glukoze u stanicama. Svi ti učinci dovode do povećane količine glukoze u krvi i čuvanja zaliha glukoze sintezom glikogena, odnosno glikogenezom.

Na slici 11. prikazano je kako glukokortikosteroidi djeluju na procese glikogenolize i glukoneogeneze u jetri, a samim time i na koncentraciju glukoze u krvi. Povećane koncentracije glukokortikosteroida uzrokuju povećanje stvaranja glukoze u jetri u procesima glikogenolize i glukoneogeneze.

Brojni sintetski analozi kortikosteroida, kao što su primjerice prednizon i prednizolon, imaju, osim jačeg protuupalnog djelovanja u odnosu na prirodne kortikosteroide, znatno izraženiji učinak na metabolizam ugljikohidrata, dok im je djelovanje na retenciju vode i soli oslabljeno.



Preuzeto iz: *http://physrev.physiology.org/content/90/1/1/F6,* pristupljeno 8.2.2017.

Slika 11. Utjecaj glukokortikosteroida na koncentraciju glukoze u krvi

S druge strane, suprotni učinak na metabolizam glukoze od kortizola ima inzulin. Inzulin je hormon koji luči žlijezda gušterača (pankreas) a glavna uloga mu je regulacija

ugljikohidrata (glukoze) u krvi. Inzulin također ima ulogu i u metabolizmu proteina i masti u tijelu, te utječe na rast.

Učinak na ugljikohidrate očituje se nakon reagiranja inzulina s inzulinskim receptorima na staničnoj membrani, a sastoji se u poticanju ulaska glukoze u stanice i njezinu iskorištavanju za metaboličke potrebe stanica. Posljedica je takva djelovanja smanjenje koncentracije glukoze u krvi. Ako je količina raspoložive glukoze veća od staničnih potreba, glukoza se djelovanjem inzulina može pohraniti u obliku glikogena (uglavnom u jetrenim i mišićnim stanicama) ili se može pretvoriti u mast (uglavnom u jetri) i u tom obliku prenijeti u stanice masnoga tkiva te se u njima pohraniti. Prema tomu, kada je na raspolaganju dovoljno glukoze, inzulin potiče njezino iskorištavanje a koči iskorištavanje masti.

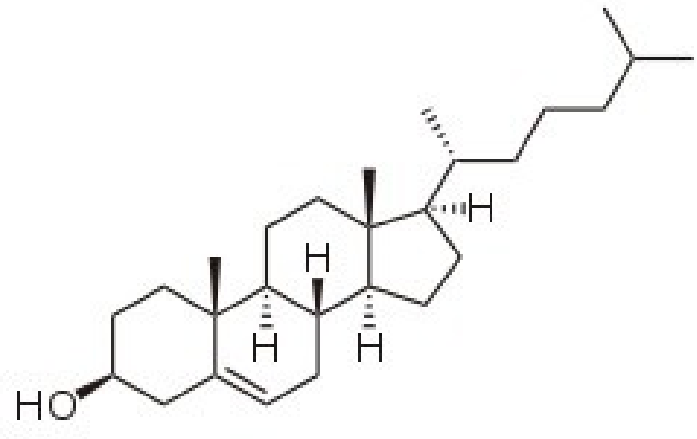
Povrh činjenice da inzulin i kortizol imaju suprotni učinak na metabolizam glukoze, općenito svi glukokortikoidi imaju periferno anti-inzulinsko djelovanje.

1.3. Metabolizam lipida

Kolesterol

Kolesterol je poznat kao rizični čimbenik za nastanak ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti. Međutim to je i supstanca koja je neophodna za funkcioniranje organizma. Kolesterol (slika 12.) je vrsta masnoća koja je prisutna u svakoj živoj stanici ljudi i životinja jer je esencijalni metabolit (Leah, 2009), a najviše ga ima u namirnicama životinjskog podrijetla. Sastavni je dio stanične membrane, sudjeluje u metaboličkim procesima u izmjeni tvari, služi za sintezu hormona kore nadbubrežne žlijezde i spolnih hormona, te vitamina topivih u mastima kao i za sintezu vitamina D, prekursor je žučnih kiselina koje služe u probavi i apsorpciji masti. Ako su vrijednosti kolesterola povišene postaju rizični čimbenik za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Posljedice na zdravlje mogu biti velike, pa se u takvim slučajevima količina kolesterola u krvi regulira medicinskim preparatima. Kemijska formula kolesterola je $C_{27}H_{46}O$.

Budući je kolesterol neophodan za funkcioniranje organizma, njegova količina ne ovisi samo o unosu putem hrane već se stvara i u tijelu (Rhodes, Stryer i Tasker, 1995). Smatra se da je oko 20% ukupnog kolesterola u tijelu dobiveno iz hrane, a oko 80% se sintetizira u jetri. Ovisno o količini kolesterola unesenog hranom dnevno se može sintetizirati oko 600-1500 mg kolesterola kod odraslih osoba. Način prehrane, tj. količine i vrste masti koje se unose u organizam utječu na sintezu kolesterola u tijelu, ali količina kolesterola u organizmu ovisi i o stupnju apsorpcije, transportu, razgradnji žučnih kiselina i izlučivanju.



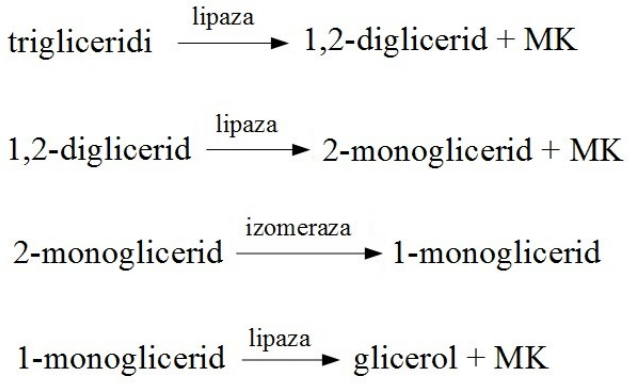
Preuzeto iz: *https://hr.wikipedia.org/wiki/Kolesterol,* pristupljeno 9.2.2017.

Slika 12. Shematski prikaz strukture kolesterola

Trigliceridi

Trigliceridi su esteri glicerola i masnih kiselina (Rhodes, Stryer i Tasker, 1995). Glavni su sastojak životinjskih i biljnih masti i ulja. Dobili su ime po tome što se tri masne kiseline vežu na tri hidroksidne skupine glicerola. Masti su spojevi sa zasićenim masnim kiselinama (palmitinska, stearinska), te su zato pri sobnoj temperaturi u krutom ili polukrutom agregatnom stanju, a ulja spojevi sa nezasićenim masnim kiselinama (oleinska, linolna, linolenska) pa su zato pri sobnoj temperaturi u tekućem agregatnom stanju. Masne kiseline su dugačke molekule koje na jednom kraju imaju karboksilnu skupinu (-COOH) a na drugom

kraju metilnu skupinu (-CH_3) tako da svojstva triglicerida ovise o ovim molekulama. U probavi hrane, žuč razgrađuje mast tek u tankom crijevu. Žuč, koja dolazi iz žučnog mjehura u duodenum (prvi dio tankog crijeva), zajedno s hranom putuje kroz tanko crijevo i razgrađuje mast na njezin sastav: glicerol i masne kiseline. Shematski prikaz razgradnje triglicerida na glicerol i masne kiseline (MK) prikazan je na slici 13. Masne kiseline bivaju dalje probavljene (Daley i sur., 2004), a glicerol se metabolizira u jetri.



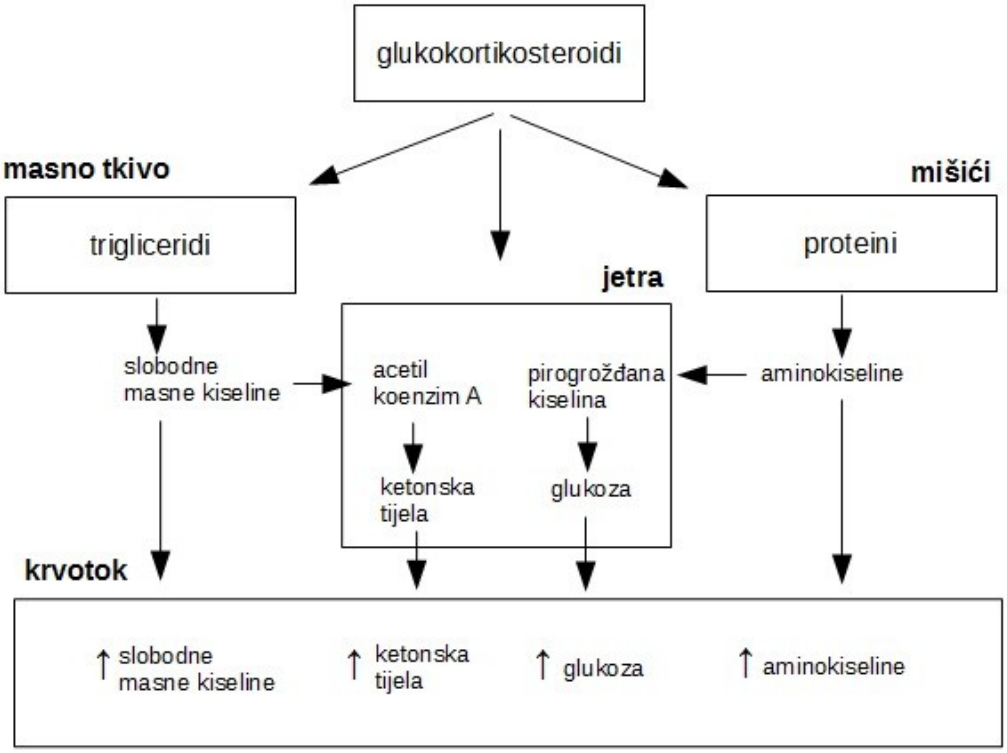
Slika 13. Shematski prikaz razgradnje triglicerida

Dok su u obliku triglicerida lipidi se ne mogu apsorbirati u dvanaesniku za razliku od glicerola i masnih kiselina, čak i nekih diglicerida, te ih je stoga nužno razgraditi kako bi se dobila energija potrebna tijelu. Pankreatična lipaza djeluje na estersku vezu triglicerida i hidrolizira ju otpuštajući masne kiseline. U tankom crijevu, nakon sekrecije lipaze i žuči, trigliceridi se, u procesu zvanom lipoliza, dijele na monoacilglicerol i slobodne masne kiseline koji se onda apsorbiraju u stanice. Tamo se ponovno izgrađuju trigliceridi koji zajedno s kolesterolom i proteinima tvore hilomikrone. Hilomikroni zatim putem krvi donose trigliceride do različitih tkiva i na taj im način osiguravaju izvor energije.

Stanice jetre mogu stvarati i skladištiti trigliceride. Kad su tijelu potrebne masne kiseline kao izvor energije hormon glukagon signalizira razgradnju triglicerida pomoću hormon-osjetljive lipaze kako bi se oslobodile slobodne masne kiseline. No, kako mozak ne može koristiti masne kiseline kao izvor energije, u tom slučaju se drugi sastavni dio

triglicerida, glicerol, pretvara u glukozu putem glukoneogeneze osiguravajući tako energiju za moždano tkivo.

Poznato je da kortizon i drugi glukokortikoidi dovode do povećanog oslobađanja slobodnih masnih kiselina iz masnih rezervi ali točan mehanizam još uvijek nije u potpunosti jasan. Iako se zadnjih godina naše razumijevanje ovih kompleksnih procesa znatno popravilo nažalost malo studija je idealno provedeno pa su stoga i zaključci u literaturi dosta nedosljedni (Macfarlane, Forbes i Walker, 2008). Na slici 14. shematski su prikazani metabolički učinci glukokortikosteroida.



Slika 14. Metabolički učinci glukokortikosteroida (shematski prikaz)

Štoviše, studije provedene na životinjama i na ljudima pokazale su različite rezultate i time dovele do različitih zaključaka (Ross i Marais, 2014). Neke studije rađene na štakorima

su pokazale da glukokortikoidi mogu povisiti koncentraciju triglicerida i ukupnog kolesterola (Staels i sur., 1991; Reaven, Kolterman i Reaven, 1974) dok su u drugim studijama glukokortikoidi djelovali samo na koncentraciju ukupnog kolesterola (Staels i sur., 1991). Rezultati nekih studija provedenih na štakorima ukazuju na to da je do višestrukog povećanja konentracije kolesterola došlo zbog smanjene aktivnost lipoprotein lipaze i smanjene koncentracije HDL-kolesterola (Bagdade i sur., 1976).

Djelomično suprotno tome neke studije provedene na ljudima pokazale su da glukokortikoidi mogu povisiti koncentraciju HDL-kolesterola dok na koncentracije triglicerida i LDL-kolesterola nisu imali značajnog učinka (Brotman i sur., 2005). Neke druge studije provedene na ljudima pokazale su da postoji pozitivna korelacija između LDL-kolesterola i endogenog plazmatskog kortizola (Nanjee i Miller, 1989).

No, s druge strane, zna se da, prvenstveno preko povećanog unosa kaloričnе i masne hrane, a onda i povećanjem hidrolize cirkulirajućih triglicerida pomoću lipoprotein lipaze, glukokortikosteroidi povećavaju količinu slobodnih masnih kiselina u cirkulaciji koje se onda dopremaju do stanica jetre, mišića i masnih stanica. Glukokortikosteroidi također povećavaju proizvodnju lipida *de novo* u hepatocitima te potpomažu pretvorbu preadipocita u adipocite uzrokujući tako hiperplaziju masnog tkiva. Ipak, akutni i dugoročni učinci glukokortikosteroida na lipolizu masnog tkiva još uvijek ostaju nejasni (Peckett, Wright i Riddell, 2011).

HDL-kolesterol i LDL-kolesterol

Kolesterol i ostale masnoće (lipidi) topivi su samo u mastima. Stoga da bi se mogli prenositi putem krvi iz probavnog sustava i jetre do svih stanica u tijelu, kolesterol zajedno s posebnim bjelančevinama čini čestice koje se zovu lipoproteini i služe za prijenos kolesterola i drugih masnoća (Rhodes, Stryer i Tasker, 1995). Nekoliko je vrsta lipoproteina, a najvažnije su dvije frakcije:

• LDL-čestice (lipoproteini male gustoće) - prenose kolesterol iz jetre do stanica. Višak kolesterola može se taložiti na stijenkama arterija, te uz još neke druge supstance stvara aterosklerotski plak, a koji s vremenom može uzrokovati začepljenje krvnih žila.

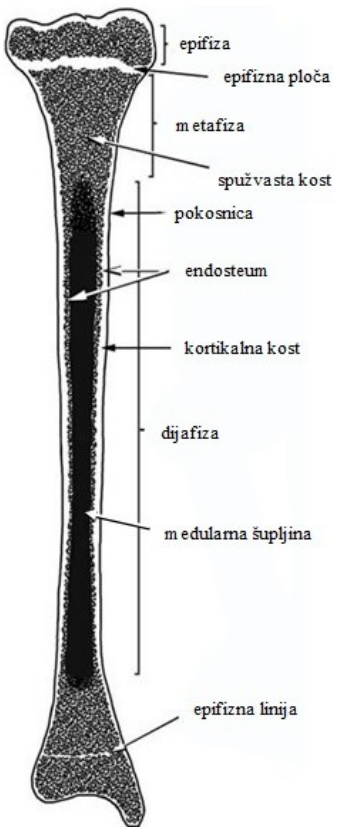
• HDL-čestice (lipoproteini velike gustoće) - sakupljaju na sebe suvišan kolesterol iz krvi i tkiva i prenose ga u jetru. Na taj način smanjuju vjerojatnost nagomilavanja kolesterola na stijenkama krvnih žila i vjerojatnost razvoja kardiovaskularnih bolesti.

Kada sve funkcionira kako treba, sustav je uravnotežen, međutim ako je u organizmu previše kolesterola da bi ga HDL lipoproteini prihvatili, ili je premalo HDL-a, može doći do stvaranja masnih naslaga na žilama.

1.4. Kost

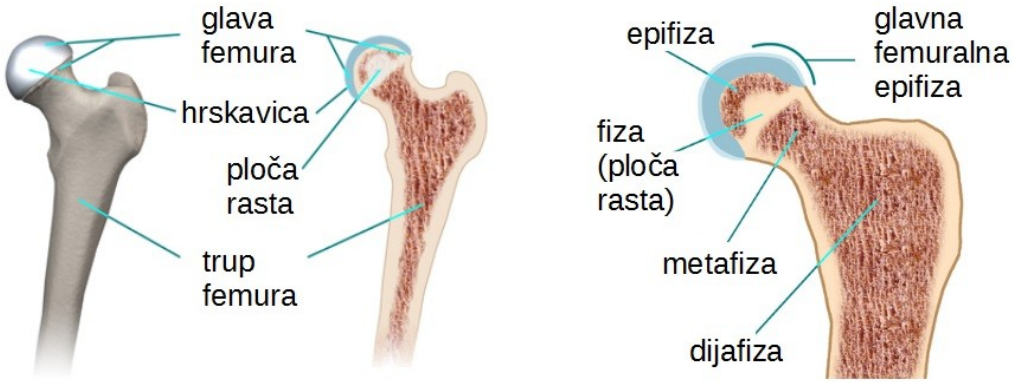
1.4.1. Građa i sastav kosti

Kost (lat. *os*), ili koštano tkivo jest vezivno tkivo koje podupire tjelesnu strukturu, a nalazi se kod većine životinja. Sve kosti u ljudskom tijelu zajedno čine ljudski kostur, a zajedno s mišićima kosti čine sustav organa za kretanje (Derrickson i Tortora, 2005). Kosti su čvrsti dijelovi tijela, a mogu biti duge, kratke, pločaste i nepravilne (građa, odnosno dijelovi duge kosti su prikazani na slici 15.). Između epifize i dijafize nalaze se zone, odnosno ploče rasta (slika 16.). Na tim pločama kost raste u dužinu dok okoštavanjem dijafize raste u širinu. Kost u dužinu raste do između 16. i 23. godine, a poslije toga samo u širinu, okoštavanjem (npr. kosti lubanje i lica).



Preuzeto iz: *http://www.portalnebula.hr/pojam/kosti/,* pristupljeno 13.2.2017.

Slika 15. Građa duge kosti (longitudinalni presjek)



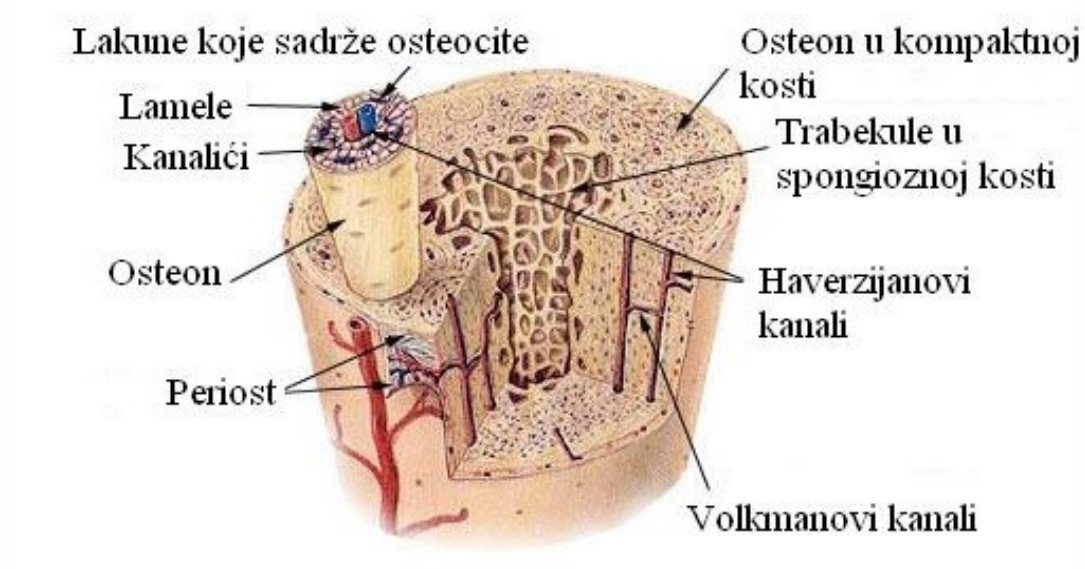
Preuzeto iz: *http://eorthopod.com/slipped-capital-femoral-epiphysis/,* pristupljeno 30.5.2017.

Slika 16. Ploča rasta glave femura

Građa kosti

Kost se sastoji od pet vrsta tkiva:

- čvrsto koštano tkivo prožeto je kanalićima oko kojih su kružno poredane koštane stanice, koje u međustanični prostor izlučuju kalcij i fosfor što kostima daje čvrstoću, dok kanalićima prolaze krvne žile i živci (slika 17.)
- hrskavica je glatka i čvrsta savitljiva nadopuna kostima, a smanjuje trenje u zglobu
- spužvasto koštano tkivo jest koštano tkivo ispunjeno šupljinama i prožeto malim potpornjima koji čine kosti jakima, ali ne i preteškima
- pokosnica obavija kost i čvrsto prirasta uz nju, a građena je od posebnog vezivnog tkiva
- koštana srž - cijevaste šupljine dugih kostiju i šupljine u spužvastom tkivu ispunjene su koštanom srži koja proizvodi većinu krvnih stanica.



Preuzeto iz: *http://www.bionet-skola.com/w/Ko%C5%A1tano_tkivo,* pristupljeno 13.2.2017.

Slika 17. Građa kosti (prikaz čvrstog i spužvastog koštanog tkiva)

Sastav kosti

Kosti su aktivno živo tkivo u tijelu. Građene su od koštanih stanica međusobno povezanih nastavcima. Izgrađuje ih bjelančevina osein (25% kosti), a 10% kostiju čini voda. Kosti imaju krvne žile koje ulaze i izlaze iz njih, opskrbljujući ih kisikom i hranjivim tvarima, a oslobađaju ih štetnih tvari. Određene kosti sadrže srž koja proizvodi krvne stanice. Sve kosti imaju živce kojima osjećamo pritisak i bol. K tome, kosti su građene od minerala (pretežito kalcija) i drugih kemijskih tvari koje kosti čine tvdima i krutima (oko 65%). Te krute tvari stanice izlučuju u međustanični prostor (Derrickson i Tortora, 2005).

Kosti su rezerva kalcija u organizmu. Kalcij iz kosti se u slučaju potrebe (npr. kod nedovoljnog unosa kalcija u organizam ili u trudnoći) može resorbirati što ima za posljedicu smanjenje gustoće kostiju.

1.4.2. Koštana pregradnja

Kost se neprestano mijenja. Proces kojim se tijekom života dijelovi koštanog tkiva zamjenjuju novoizgrađenom kosti naziva se koštanom pregradnjom. Njezin je cilj izmjena starih i dotrajalih dijelova novom, kvalitetnom kosti, a nastaje kao odgovor na tjelesnu aktivnost. Povećani napori potiču koštanu pregradnju, pa se tako kostur učvršćuje i povećava se otpornost na veća opterećenja. Koštana pregradnja također osigurava otpuštanje kalcija i ostalih minerala iz kosti u cirkulaciju. To je nužno za održavanje optimalne koncentracije kalcija u krvi i odvijanje niza važnih procesa u tijelu.
Pregradnja kosti odvija se u dvije faze. Prva je razgradnja (resorpcija), za koju su odgovorne specijalizirane koštane stanice osteoklasti koji djeluju na površini koštanih gredica. Druga faza je izgradnja kosti pod utjecajem osteoblasta koji udubine nastale razgradnjom kosti ispunjavaju kolagenom. U mrežu kolagenih vlakana odlažu se minerali, te ciklus koštane pregradnje završava mineralizacijom kosti. Potpuna ravnoteža u procesu koštane pregradnje postoji onda kad se razgrađena kost u potpunosti nadomjesti novim koštanim tkivom. Budući da je izgradnja kosti daleko sporiji proces, idealnu ravnotežu teško je ostvariti. Stoga se pri intenzivnoj pregradnji kost neizbježno gubi.

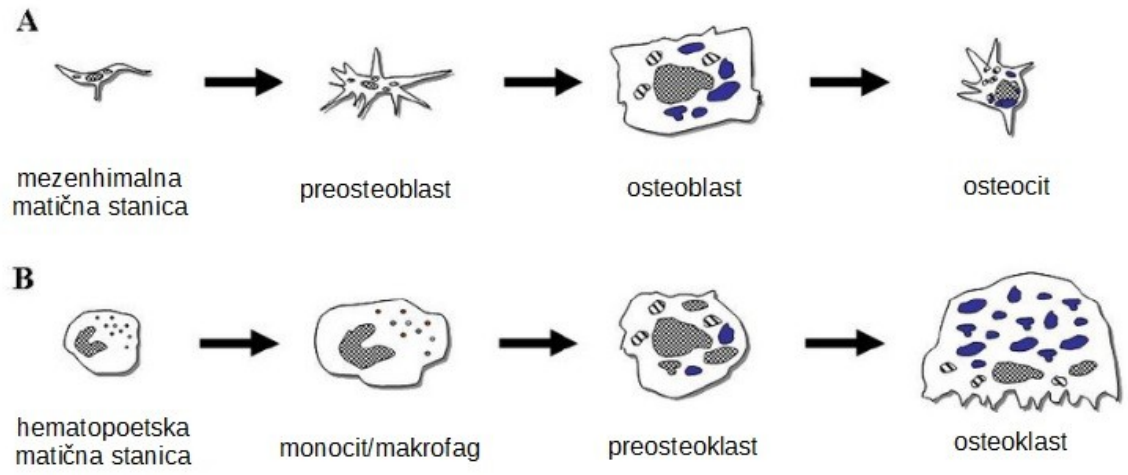
1.4.3. Koštane stanice

Osteoblasti

Osteoblasti (od grčke riječi „kost“ i „zametak“ ili „nerazvijen“) su stanice odgovorne za stvaranje kosti. U pravilu, osteoblasti su sofisticirani fibroblasti, koji ispoljavaju istu gensku ekspresiju kao i fibroblasti, s dodatkom gena za kost *sialoproteina* i *osteokalcina* (Salentijn, 2007). Osteoblasti proizvode *osteoid*, koji se sastoji uglavnom od kolagena tipa I. Osteoblasti su također odgovorni za mineralizaciju osteoidne matrice. Cink, bakar i natrij su neki od brojnih proizvedenih minerala. Osteoblasti koji ostanu „zarobljeni“ u koštanoj matrici postaju osteociti (slika 18. A). Stanice osteoblasta imaju tendenciju opadanja što je osoba starija, smanjujući na taj način prirodnu regeneraciju koštanog tkiva (D’ippolito, 1999).

Osteociti

Osteociti su zrele koštane stanice koje nastaju iz osteoblasta (slika 18. A) koji, kako je već rečeno, ostanu zarobljeni u koštanoj matrici.



Preuzeto iz: *Marquis ME, Lord E, Bergeron E i Faucheux N. Bone cells-biomaterials interactions. Frontiers in Bioscience 2009;14(3):1023-1067,* pristupljeno 13.2.2017.

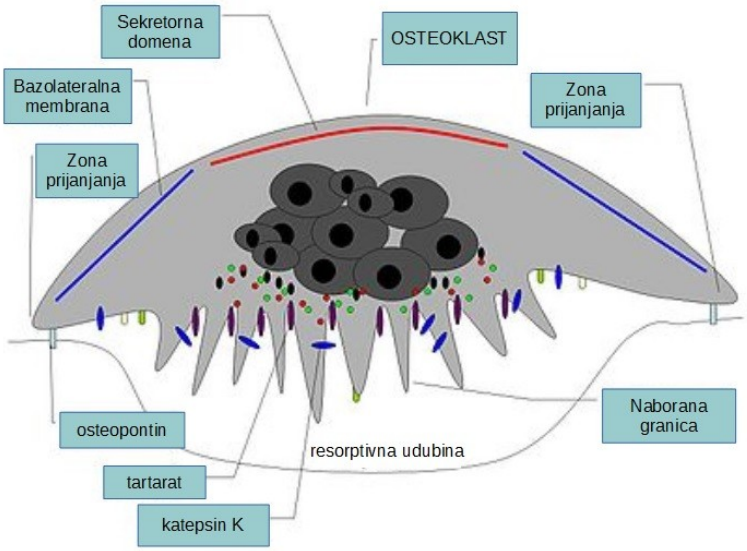
Slika 18. Diferencijacija osteoblasta, osteocita i osteoklasta

Područja u kojima se oni nalaze su poznata kao lakune. U mnogim procesima sudjeluju zajedno s osteoblastima (Ehrlich i Lanyon, 2002; You i sur., 2000). Njihova funkcija uključuje: izgradnju kosti, održavanje koštanog matriksa i homeostaze kalcija. Također se pokazalo da osteociti djeluju kao mehaničko-osjetilni receptori koji reguliraju odgovor kosti na stres i mehaničko opterećenje.

Osteoklasti

Osteoklast (od grčke riječi „kost“ i „slomljen“) je tip koštane stanice koja uklanja koštano tkivo uklanjajući njegovu mineraliziranu matricu i razlažući organsku kost. Taj proces je poznat kao *resorpcija kosti.* Osteoklaste je otkrio Kolliker 1873. godine (Peter, Nijweidi i Feyen, 1986) i još od tada se vode debate o njihovom podrijetlu. Osteoklasti su nastali spajanjem stanica monocito-makrofagne stanične linije (slika 18. B) (Netter, 1987; Peter, Nijweidi i Feyen, 1986), a imaju veliki utjecaj na koncentraciju tartarat rezistentne kisele fosfataze i katepsina K.

Osteoklasti (slika 19.) sadrže 15-20 ovalnih gusto zbijenih jezgri, a mogu se naći u sitnim rupicama na površini kosti koje se još zovu resorbirajuće lakune. Ta struktura je nastala zbog visoke koncentracije vezikula i vakuola, odnosno lizosoma u kojima se nalazi kisela fosfataza. Na mjestu aktivne resorpcije kosti, osteoklasti čine specijaliziranu staničnu membranu koja dodiruje površinu koštanog tkiva (Netter, 1987). Ta membrana, koja omogućava uklanjanje koštane matrice, je morfološka odlika osteoklasta koji aktivno razgrađuju kost. Jednom aktivirani, osteoklasti se kemotaksijom sele u područja mikrofrakture u kosti.



Preuzeto iz: *https://sr.wikipedia.org/wiki/Osteoklast,* pristupljeno 13.2.2017.

Slika 19. Ilustrirani presjek aktiviranog osteoklasta

1.5. Hipoplazija kosti i osteopenija

Općenito, hipoplazija je nedovoljno ili nepotpuno razvijeno tkivo ili organ, a pod tim pojmom podrazumijeva se i smanjeni rast normalnih struktura. Hipoplazija koštanog tkiva može dovesti do osteopenije. Poznato je da glukokortikoidi utječu na rast i razvoj kostiju, štoviše brojne studije su pokazale štetne učinke glukokortikoida na metabolizam kosti (Henneicke i sur., 2014; Hrvačić i sur., 2015; Kim i sur., 2007).

Osteopenija je smanjenje, odnosno stanjivanje koštane mase. Iako se smanjenje koštane mase često ne smatra ozbiljnim problemom, ipak se smatra ozbiljnim faktorom rizika za razvoj osteoporoze (Rosen, 2005). Najčešće se osteopenija javlja kod starijih ljudi (iznad 50 godina), ali osim što je osteopenija znak normalnog starenja, do nje može doći i zbog dugotrajne primjene nekih lijekova, kao što su, na primjer, glukokortikosteroidi (Alonso-Coello i sur., 2008; Tauchmanovà i sur., 2001). Dijagnostička razlika između osteopenije i osteoporoze je mjera koštane mineralne gustoće (engl. bone mineral density, BMD).

Osteopenija se odnosi na koštanu mineralnu gustoću nižu od normalne razine, ali ne dovoljno nisku da se klasificira kao osteoporoza. Koštana mineralna gustoća je mjera količine minerala u kostima, koji ukazuju na to koliko su kosti tvrde i jake. Osobe kojima je dijagnosticirana osteopenija imaju puno veći rizik za razvoj osteoporoze kroz neko vrijeme.

Svatko tko je na terapiji glukokortikosteroidima i ima druge faktore rizika za razvoj osteoporoze spada u visoko rizičnu skupinu za razvoj glukokortikosteroidima izazvane osteoporoze i koštanih lomova. Glavni faktori rizika za razvoj osteoporoze su:

- pripadnost bijeloj rasi
- pojava osteoporoze u obiteljskoj anamnezi
- poremećaji u prehrani
- smanjena tjelesna masa
- tjelesna neaktivnost
- duga primjena glukokortikosteroida
- pušenje
- alkohol i dr.

Iako se osteopenija ne smatra bolešću, dijagnoza osteopenije zahtijeva detaljno praćenje. Također bi trebalo poduzeti i preventivne mjere s obzirom da se daljnjim gubitkom koštane mase može razviti osteoporoza.

1.6. Koštani biljezi

Biljezi koštane izgradnje

Alkalna fosfataza (ALP) je tkivno nespecifična hidrolaza odgovorna za uklanjanje fosfatnih grupa iz različitih tipova molekula (Tamás i sur., 2002), uključujući *nukleotide, proteine i alkaloide*. Proces uklanjanja fosfatnih grupa zove se *defosforilacija*. Kao što i samo ime govori alkalne fosfataze su najunčikovitije u alkalnom okruženju (Garen i Levinthal, 1960). Katkad se za njih koristi naziv i bazične fosfataze. Postoje više različitih ali srodnih izoenzima alkalne fosfataze: crijevni, placentarni, jetreni/koštani izoenzim. Točna fiziološka

funkcija alkalne fosfataze nije poznata (Maxam i Gilbert, 1980). Alkalna fosfataza se često koristi kao nespecifični biljeg koštane izgradnje, iako je njen koštani izoenzim puno bolji pokazatelj same izgradnje kosti.

Osteokalcin (OC), također poznat kao koštani protein koji sadrži gama-karboksiglutamilnu kiselinu (engl. bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein, BGLAP), je nekolageni protein pronađen u kosti (Lee i sur., 2007; Puchacz i sur., 1989). Osteokalcin izlučuju isključivo osteoblasti. Također je uključen u mineralizaciju kosti i homeostazu kalcija. Osteokalcin djeluje kao hormon u tijelu, uzrokujući veće oslobađanje inzulina iz beta stanica gušterače, a istovremeno usmjerava masne stanice da otpuštaju hormon adiponektin, koji povećava osjetljivost na inzulin. Osteokalcin se koristi kao biokemijski pokazatelj koštane pregradnje (Čepelak i Čvorišćec, 2009). Opće je poznato da viša razina osteokalcina u serumu relativno dobro korelira s povećanjem mineralne gustoće kostiju. Osteokalcin se često koristi i kao preliminarni biljeg učinkovitosti lijeka na kosti (Lee, Hodges i Eastell, 2000).

Biljezi koštane razgradnje

Kisela fosfataza (ACP) je enzim iz skupine fosfataza koje imaju ulogu oslobađanja fosfatnih skupina iz mnogih molekula za vrijeme probave. To je u osnovi fosfomonoesteraza a unutar stanice je smještena u lizosomima raznih tkiva (trombociti, eritrociti, kost, prostata), iako se može naći i izvan njih. Kisela fosfataza djeluje kad se lizosomi spoje s endosomima, u kiselom mediju lizosoma. Zbog toga ovi enzimi imaju kiseli pH optimum (Burstone, 1959). Različite izoforme kisele fosfataze se nalaze u različitim organima i njihova se razina u serumu koristi za dijagnozu bolesti tih organa. Na primjer, povišena razina prostatičnog izoenzima kisele fosfataze može upućivati na karcinom prostate, a koštani izoenzim može upućivati na poremećaj rasta i razvoja kosti.

U plazmi je otkriveno 5 izoenzimskih oblika enzima koji se razlikuju prema tkivnom (prostatična, lizosomalna, testikularna) i kromosomskom podrijetlu, kao i po molekularnoj masi te elektroforetskoj pokretljivosti. Prema elektoforetskoj pokretljivosti klasificiraju se kao

izoenzimi 1-5, a prema osjetljivosti na inhibiciju s L(+)-tartaratom klasificiraju se dodatno na tartarat-osjetljive i tartarat-rezistentne oblike (Cundy, Reid i Grey, 2008; Looker, Bauer i Chesnut, 2000; Janckil i sur., 2001; Garnero i sur., 2000). Mjerenje ukupne aktivnosti TR-ACP u serumu kao biljega razgradnje kostiju ima dosta nedostataka (relativno mala aktivnost enzima, prisutnost inhibitora u serumu, nestabilnost kod alkalnog pH, interferencija hemolize), stoga se ne preporuča za postavljanje dijagnoze (Čepelak i Čvorišćec, 2009).

Tartarat rezistentna kisela fosfataza (TRACP) ili kisela fosfataza 5 (ACP5) je glikozilirani monomerni metaloenzim koji se javlja u stanicama sisavaca (Baumbach i sur., 1991), a optimalnu aktivnost ima u kiselim uvjetima. TRACP se sintetizira kao latentni proenzim i aktivira se proteolitičkim cijepanjem i redukcijom (Ljusberg, Ek-Rylander i Andersson, 1999; Ljusberg i sur., 2005), a od drugih izoenzima kisele fosfataze razlikuje se po svojoj rezistenciji na inhibiciju tartaratom, molekularnoj masi i karakterističnoj ljubičastoj boji. Točna fiziološka uloga tartarat rezistentne kisele fosfataze još nije poznata, ali joj se pridodaju brojne funkcije. Neke studije su pokazale da povećana ekspresija TRACP u miševa dovodi do povećane aktivnosti osteblasta i koštane sinteze (Angel i sur., 2010). S druge strane, neka istraživanja su pokazala da kada se miševima „utiša“ gen za TRACP, dolazi do smanjene aktivnosti osteoklasta (Hayman i sur., 1996).

TRACP tipa 5 stvaraju makrofagi i dendritične stanice (TRACP 5a) i osteoklasti (TRACP 5b). Promjene TRACP tipa 5b u biti odražavaju broj aktivnih osteoklasta (Halleen i sur., 2003). Većinom postupaka za mjerenje aktivnosti TR-ACP nije moguće razlikovati osteoklastni (izoforma 5b) oblik enzima od drugih oblika (izoforma 5a) koji se nalaze u plazmi.

5b izoforma tartarat rezistentne kisele fosfataze (TRACP 5b) je novi, specifični biljeg koji ukazuje na broj osteoklasta i resorpciju kosti (Halleen i sur., 2006). Osteoklasti luče TRACP 5b u krvotok kao aktivni enzim koji se inaktivira i razgrađuje prije nego se odstrani iz cirkulacije. Neke studije su pokazale da izlučena TRACP 5b izoforma ukazuje na broj osteoklasta, a ne na njihovu aktivnost (Alatalo i sur., 2000).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

2.1. Radna pretpostavka

Astma je najčešća kronična bolest u djece, a često se liječi oralnom primjenom glukokortikosteroida. Već dugi niz godina istraživanja ukazuju da peroralna primjena glukokortikosteroida utječe na koštano tkivo izazivajući osteopeniju i u težim slučajevima osteoporozu. Prema nekim istraživanjima (Weinsiein i sur., 1998; Mangolas i Weinsiein, 1999), biokemijska analiza koštanih biljega u krvi, histomorfometrija i denzitometrija koje se koriste kod ljudi mogu se primjenjivati i na štakorima (Jee i Yao, 2001) i na miševima. Oni su pokazali da mišji model može biti pouzdani životinjski model osteopenije izazvane glukokortikosteroidima i da oponaša promjene viđene u ljudi (Jee i Yao, 2001).

S druge strane, postoje ograničenja u životinjskim modelima kao što su, između ostalih, načini primjene testnih supstancija, posebno u mladih životinja. Način primjene supstancija je ključna komponenta znanstvenih istraživanja. Postoje brojni faktori na koje treba obratiti pažnju kako bi se osigurao pravovaljani način primjene supstancija životinjama koje sudjeluju u pokusu (Turner i sur., 2011). Pažljivo planiranje i obraćanje pažnje na detalje prilikom odabira načina primjene supstancija pridonijet će ujednačenijim rezultatima i svest će nepovoljne učinke na minimum.

Brojna su istraživanja o postmenopauzalnoj osteopeniji i osteopeniji nakon odstranjenja jajnika ili nakon imobilizacije kosti, no o osteopeniji koju izaziva primjena glukokortikosteroida tijekom rasta i razvoja kosti, istraživanja su puno rjeđa. Još uvijek nije potpuno poznato djeluju li glukokortikosteroidi na osteoklaste *in vivo* direktno kako bi produžili njihov životni vijek i pridonosi li to bržem gubitku koštane mase. Neka istraživanja su pokazala da glukokortikosteroidi produžuju životni vijek osteoklasta unatoč smanjenju broja prekursora osteoklasta (Jia i sur., 2006). Štoviše, pokazalo se da glukokortikosteroidi direktno utječu na osteoklaste izazivajući rani gubitak koštane mase (Jia i sur., 2006).

Metode kao što su denzitometrija, histomorfometrija i tomografija najčešće se koriste za otkrivanje i potvrđivanje osteopenije izazvane glukokortikosteroidima (McLaughlin i sur., 2002). S druge strane, javlja se potreba za pronalaženjem što specifičnijih serumskih koštanih biljega jer oni osiguravaju puno ranije informacije o promjenama u organizmu, kao

i o samom mehanizmu promjene. Koštani biljezi imaju višestruku funkciju: osim za otkrivanje osteopenije, mogu se koristiti za predviđanje brzine propadanja koštanog tkiva, te za praćenje terapije (Eastell i Hannon, 2008). Nedavno se počela pridodavati veća pažnja otkrivanju novih, specifičnijih serumskih biljega. Između ostalih, izrazito osjetljivi i specifični biljezi izgradnje kosti su osteokalcin i koštani izoenzim alkalne fosfataze, dok se kao biljezi koštane razgradnje koriste kisela fosfataza i tartarat rezistentna kisela fosfataza (TRAP/TRACP) kao enzim osteoklasta (Garnero, 2008). Dvije izoforme TRACP enzima cirkuliraju u krvi, poznate kao TRACP5a, koja proizlazi iz makrofaga, i TRACP5b, koju izlučuju osteoklasti (Hallen i sur., 2003). Osteoklasti luče TRACP5b u krvotok kao aktivni enzim koji se inaktivira i razgrađuje prije nego se odstrani iz cirkulacije. Studije su pokazale da izlučeni TRACP5b ukazuje na broj osteoklasta, a ne na njihovu aktivnost (Alatalo i sur., 2003).

Stoga bi opsežnija istraživanja na ovom području omogućila bolje razumijevanje metaboličkih i koštanih učinaka glukokortikosteroida, mehanizma njihovog djelovanja, kao i eventualne promjene terapijskih pristupa pri liječenju raznih upalnih bolesti, između ostalih i astme, kod djece imajući na umu možebitne nuspojave i utjecaj na rast.

2.2. Cilj rada

Temeljni cilj ovog rada je uspostava modela hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima u mladih štakora i pronalaženje optimalnih metaboličkih i koštanih biljega. Time bi se unaprijedila diferencijalna dijagnostika osteopenije i medicinska praksa u prevenciji i liječenju gubitka koštane mase. S obzirom da ne postoji jednoznačan mehanizam kojim glukokortikosteroidi utječu na koštanu masu, uspostavom modela hipoplazije fize bi se utvrdilo u kojoj mjeri je njihova primjena odgovorna za pojavu hipoplazije i same osteopenije.

Hipoteze ovog rada su:

- učinak glukokortikosteroida na kost i metabolizam glukoze i lipida ovisi o vrsti i dozi
- glukokortikosteroidi smanjuju prirast tjelesne mase, te mijenjaju metabolizam glukoze i lipida u mladih štakora
- učinak glukokortikosteroida na metabolizam koštanog tkiva može se pratiti određivanjem biokemijskih biljega koštane pregradnje u krvotoku životinja
- učinak glukokortikosteroida na rast kosti u mladih štakora moguće je pratiti mjerenjem proliferativne zone glave femura

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uspostava modela hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima u mladih Sprague-Dawley štakora

3.1.1. Kemikalije

1) Prednizolon (Sigma, Diesenhofen, Njemačka; P-6004)
2) Ciclesonide (Sequoia Res Prod ltd, SRP030064c)
3) Beclomethasone dipropionate (min 99%, Sigma, Diesenhofen, Njemačka, B3022)
4) DMSO, dimethyl sulphoxid (Sigma, Diesenhofen, Njemačka)
5) CMC, carboxymethyl cellulose (Sigma, Diesenhofen, Njemačka)
6) Tiopental (natrijev tiopental, 50 mg/kg; PLIVA, Zagreb, Hrvatska)
7) TBD-2 dekalcifikator (Shandon, UK)
8) Formalin (Shandon, UK)
9) Parafin (Shandon, UK)
10) Hematoksilin / eozin (Shandon, UK)
11) Komercijalni reagensi (Beckman Coulter)

3.1.2. Potrošni materijal i pribor

1) Serum separator epruvete (Becton Dickinson)
2) Predmetna stakla (Knittel glaser)
3) Pokrovna stakla (Menzel glaser)
4) Plastični nastavci za automatske pipete (1-10 000 µl; Labsystems, Eppendorf)
5) Staklene čaše (Duran)
6) Sraklene bočice s čepom (Duran)
7) Odmjerne tikvice (Duran)
8) Erlen-Meyer tikvice s čepom (Duran)
9) Stakleni štapići (Duran)
10) Igle za injekcije (Henke Sass Wolf GmbH)
11) Jednokratne štrcaljke (Dispomed)
12) Kirurški pribor (Hamacher Solingen)
13) Kirurški konac

3.1.3. Oprema

1) Numerator kazeta (Sassmark 2, Shandon, UK)
2) Tkivni procesor (Excelsior, Shandon, UK)
3) Stroj za bojanje histoloških preparata (Tissue-Tek, Sakura)
4) Mikrotom (HM 440 G, Mikrom)
5) Svjetlosni mikroskop s kamerom (DM RXA, Leica, Njemačka)
6) Biokemijski analizator (Olympus AU 400, Beckman Coulter, USA)
7) Centrifuga (5804, Eppendorf)
8) Neautomatska vaga (AT-261DR, Mettler-Toledo)
9) Automatske pipete, jedno- i multikanalne (Finpipette – Labsystems, Eppendorf)
10) Čitač mikrotitarskih pločica (Victor 2, Wallac)
11) Mješalica magnetna (RCT basic, IKA)

3.1.4. Životinje u pokusu

Vrsta:	štakori
Soj:	Sprague-Dawley
Spol:	muški
Starost:	4,5 – 5,5 tjedana na početku pokusa
Tjelesna masa:	120 – 140 g
Porijeklo:	Charles River, Lyon, Francuska

3.1.5. Plan pokusa

U prvoj fazi ovog rada uspostavljen je model hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima s promjenama u krvi i u kostima opisanim u literaturi (Kohrt i sur., 2004; Jee i Yao, 2001; Jia i sur., 2006). Istražen je metabolički i koštani učinak opetovane primjene prednizolona, beklometazon dipropionata i ciklezonida u mladih štakora. Razmotren je i njihov utjecaj na tjelesnu masu, metaboličke i koštane biljege, te na debljinu proliferativne zone glave femura.

U slijedećem koraku, na osnovi rezultata dobivenih iz preliminarnih pokusa, izabrane su dvije supstancije (prednizolon i ciklezonid) koje su pokazale statistički značajan metabolički i koštani učinak, kako bi se detaljnije istražile. Uz metaboličke (glukozu i proširenu paletu pretraga koja pokazuje promjene u metabolizmu masti) i nespecifične koštane biljege (ALP i ACP), određivana je i koncentracija specifičnih biljega koštane pregradnje u serumu: osteokalcina i koštane alkalne fosfataze kao biljega koštane izgradnje, te TRACP 5b izoforme kao specifičnog biljega koštane razgradnje. Također, na osnovi istih rezultata, odustalo se od primjene najniže doze korištenih supstancija s obzirom da nije bilo značajnog učinka.

Kratki opis modela

Model hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima uspostavljen je prema Belvisi i sur. (2001). Ukratko, štakori (8 životinja po skupini) tretirani su sa standardnim supstancijama prednizolonom, beklometazon dipropionatom i ciklezonidom subkutano (s.c.) u dozama od 0,3, 1, 3 i 10 mg/kg, kroz 7 dana. Životinje u kontrolnoj skupini (negativna kontrola, NK) su subkutano primale dimetil sulfoksid (DMSO) u 0,125 %-tnoj karboksimetilcelulozi (CMC) u volumenu od 10 ml/kg. Dvadesetičetiri sata poslije zadnje primjenjene doze, životinje su žrtvovane (anestetizirane su s barbituratom, Tiopentalom 50 mg/kg, PLIVA) kako bi se dobili uzorci za daljnje analize.

Smještaj životinja

Životinje su držane deset dana u karanteni, a nakon toga su se aklimatizirale kroz četiri dana do početka pokusa. Držane su u plastičnim kavezima punih stranica (Tecniplast *cage bodies*/Bayer-Makrolon *natural polycarbonate – F.D.A. approved*); 425 mm x 266 mm x 180 mm na stelji od drvene strugotine (Scobis Uno – Mucedola, Italija). U svakom kavezu držane su 4 životinje.

Uvjeti okoliša u Nastambi za laboratorijske životinje održavani su kako slijedi: temperatura 22 ± 2 °C, relativna vlažnost zraka 55 ± 10 %, oko 10-15 izmjena zraka na sat filtriranog kroz HEPA filtere 99,97 % i umjetnim osvjetljenjem s 12-satnom izmjenom svjetlo-tama (07 – 19 h).

Životinje su uzimale hranu (Mucedola, Italija, 4RF 21 GLP Top Certificate) i vodu (bočice Techniplast, Italija) *ad libitum*.

Po isteku aklimatizacijskog perioda životinje su izvagane, randomizirane, označene oznakama na uškama (L – lijevo, D – desno, LD - oba uha i bez oznake), te smještene u kaveze, po 4 životinje u svaki kavez. Svaki kavez je obilježen karticom koja je sadržavala oznaku pokusa, broj pokusne skupine, soj životinja, spol, te pripadajući jedinstveni broj životinje.

Svi pokusi obavljeni su uz odobrenje Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva, Uprave za veterinarstvo, a na temelju članka 31. Zakona o dobrobiti životinja (Narodne novine, broj 19/99). Svi postupci sa životinjama, kao i smještaj i briga o životinjama bila je u skladu s *"The EEC Council Directive 86/609 of 24th November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes".*

Primjena testnih supstancija

Testne supstancije su primjenjene subkutano (s.c.), prema slijedećim shemama:

Tablica 1. Shematski prikaz preliminarnih pokusa (u svakom pokusu korišten je jedan glukokortikosteroid)

Grupa	Broj životinja	Supstancija	Doza (mg/kg/dan)
1	8	DMSO u CMC	/
2	8	GK	0,3
3	8		1
4	8		3
5	8		10

DMSO = dimetil sulfoksid

CMC = karboksimetil celuloza

GK = glukokortikosteroid (beklometazon dipropionat/prednizolon/ciklezonid)

Tablica 2. Shematski prikaz pokusa nastavnog istraživanja

Grupa	Broj životinja	Supstancija	Doza (mg/kg/dan)
1	8	DMSO u CMC	/
2	8	Prednizolon	1
3	8		3
4	8		10
5	8	Ciklezonid	1
6	8		3
7	8		10

DMSO = dimetil sulfoksid

CMC = karboksimetil celuloza

Volumen primjene bio je 10 ml/kg, a izračunat je prema individualnim tjelesnim masama pokusnih životinja utvrđenim na početku pokusa. Supstancije su primjenjivane svaki dan, kroz 7 dana, a uzorkovanje je bilo 24 sata nakon zadnje primjenjene doze.

Tjelesna masa životinja

Tjelesna masa životinja mjerena je prije početka pokusa, prilikom randomiziranja, te na kraju pokusa, neposredno prije žrtvovanja (dan 8).

3.1.6. Uzorkovanje krvi

Terminalno krvarenje

Uzorci krvi uzimani su 24 sata nakon zadnje primjene testne supstancije (glukokortikosteroida). Štakori su uspavani (anestezirani) intraperitonealnom injekcijom otopine tiopentala u dozi od 50 mg/kg, da bi se uzorkovala krv za biokemijske pretrage.

Uspavanim životinjama, fiksiranim uz podlogu, vršila se preparacija arterije *Carrotis communis*, te njeno presijecanje, da bi krv bila prikupljena u epruvete sa serumskim separatorom (Becton Dickinson, SAD). Pokusne životinje su potom žrtvovane dekapitacijom, kako bi se mogli uzorkovati timusi i izmjeriti njihove mase te uzorkovati femuri za histopatološku procjenu.

Timusi su odvojeni od vezivnog tkiva i odmah izvagani. Indeks mase timusa (ITM) izračunat je prema slijedećoj formuli:

ITM = masa timusa (mg) / tjelesna masa (mg).

Jednokratno krvarenje

Uzorci krvi uzeti su na početku nastavnog istraživanja, kako bi se odredila koncentracija TRACP 5b izoforme u serumu životinja prije bilo kakvog tretmana. Uzorkovanje je vršeno bez primjene uspavljivanja (anestezije). Pokusne životinje zagrijane su pod infra-crvenom sijalicom, te je krv uzeta iglom iz repne vene u Microtainere sa serumskim separatorom (Becton Dickinson, SAD).

3.1.7. Histopatološka procjena

Za histološku evaluaciju razvoja osteopenije, odnosno gubitka koštane mase, nakon primjene glukokortikosteroida, uzorkovane su lijeve bedrene kosti s posebnom pažnjom da se sačuva spoj zgloba kuka. Rez je rađen kroz zdjelični pojas, s jedne strane, te preko bedrene kosti malo iznad koljena. Zatim su kosti stavljane u označene bočice s fiksativom (10 %-tnim formalinom).

Nakon 7 dana kosti su izvađene iz bočica s fiksativom i stavljene u TBD-2 dekalcifikator na dekalcifikaciju. Nakon 8 dana kosti su izvađene iz dekalcifikatora i stavljene

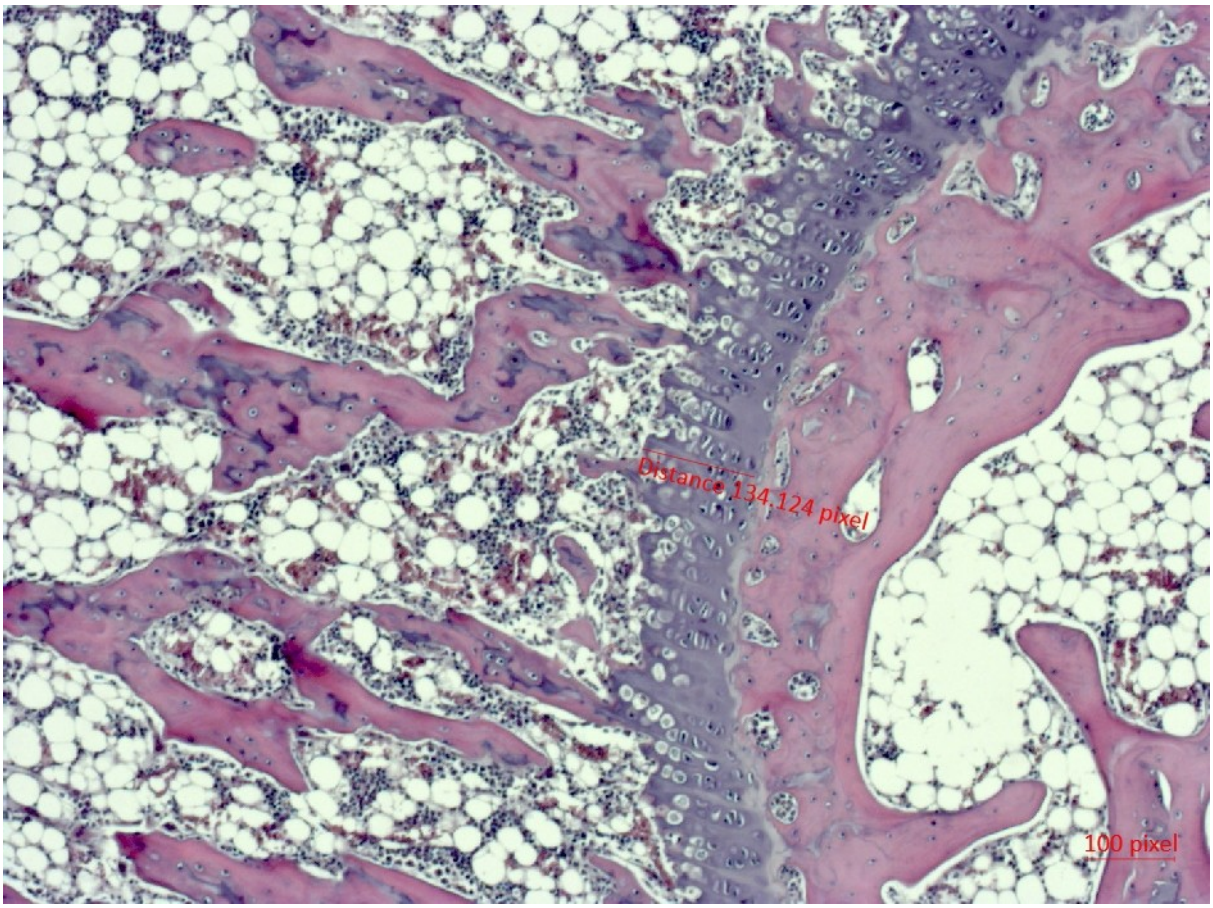
u univerzalne kazete koje su prethodno označene u numeratoru kazeta sukladno oznakama na bočicama. Kazete su zatim zatvorene i dobro isprane u destiliranoj vodi kroz 2 sata.

Nakon ispiranja slijedi postupak dehidracije i prožimanja tkiva u tkivnom procesoru kroz 18 sati, te postupak uklapanja u parafin prema *"Leica histoembeder operating instructions"* (Leica, Njemačka). Tako uklopljeni uzorci u parafinskim blokovima hlađeni su na -5 °C na ploči za hlađenje 30 minuta.

Blokovi su rezani kliznim mikrotomom na debljinu 2-3 μm. Dobiveni rezovi su stavljeni na predmetno stakalce, te sušeni u termostatu 30 minuta na 60 °C. Nakon toga slijedio je postupak deparafiniranja i bojanja histoloških preparata, standardnim postupkom s hematoksilin-eozinom, te pokrivanje pokrovnim stakalcima i označavanje histološkim brojem.

Histološka procjena provedena je prema Belvisi i sur. (2001). Ukratko, ploča rasta glave femura pregledana je svjetlosnim mikroskopom pod povećanjem 100x. Slike ploče rasta prebačene su na računalo. Svaki presjek tkiva je fotografiran i na 5 mjesta je mjerena širina ploče rasta, odnosno proliferativne zone glave femura. Mjerenje je uključivalo povlačenje okomite linije preko epifizne ploče rasta (slika 20.), između kraja hipertrofične zone distalno do zglobne hrskavice i kraja proliferativne zone, koja je bila označena tamnoplavim obojenjem. Iz mjerenja su bili isključeni krajevi ploče rasta i pukotine bez proliferativnih stanica koje se prirodno pojavljuju (one nisu pokazivale tamnoplavo obojenje).

Dijelovi koji su pokazivali traumu nastalu prije smrti također su bili isključeni iz mjerenja. Naime, traume nastaju zbog međusobnog ozljeđivanja životinja zajedno smještenih u kavezima i tako nastaju prijelomi kosti koji počinju zarastati. Taj proces zarastanja se razlikuje od samog procesa rasta kosti koji ide u duljinu dok zarastanje popunjava rupu u kosti gdje god ta trauma nastane. Te razlike prepoznaje iskustveni histolog.



Slika 20. Fotografija epifizne ploče rasta s prikazom načina mjerenja povlačenjem okomite linije preko ploče rasta. Širina ploče rasta (označena tamnoplavim obojenjem) mjerena je pikselima.

3.2. Biokemijske analize štakorskog seruma

3.2.1. Priprema uzoraka

Krv (približno 10 ml) prikupljena u epruvete sa serumskim separatorom, centrifugirana je 10 minuta na 3000 o/min, a potom je serum odvojen i alikvotiran u plastične epruvete s čepom, te pohranjen na -70 °C do početka analize. Ostatak uzorka je neškodljivo uklonjen.

3.2.2. Određivanje koncentracije glukoze u serumu

Koncentracija glukoze u serumu određena je na biokemijskom analizatoru Olympus AU 400, Beckman Coulter, SAD. Metoda se temelji na enzimatskoj oksidaciji glukoze pomoću glukoza-oksidaze/heksokinaze pri čemu nastaju vodikov peroksid i glukuronska kiselina. Indikator je kinonimin koji nastaje iz vodikovog peroksida, 4-aminoantipirina i fenola uz pomoć enzima peroksidaze.

3.2.3. Određivanje koncentracije lipida u serumu

Trigliceridi

Koncentracija triglicerida u serumu određena je na biokemijskom analizatoru Olympus AU 400, Beckman Coulter, SAD. Metoda se temelji na enzimskoj hidrolizi triglicerida s lipazom. Indikator je kinonimin koji nastaje iz vodikovog peroksida, 4-aminoantipirina i 4-klorfenola uz pomoć enzima peroksidaze.

Kolesterol

Koncentracija kolesterola u serumu određena je na biokemijskom analizatoru Olympus AU 400, Beckman Coulter, SAD. Metoda se temelji na enzimskoj hidrolizi estera kolesterola pomoću kolesterol-esteraze. Nastali kolesterol se potom oksidira pomoću kolesterol-oksidaze pri čemu nastaju kolest-4-en-3-on i vodikov peroksid. Indikator je kinonimin koji nastaje iz vodikovog peroksida, 4-aminoantipirina i hidroksibenzojeve kiseline uz pomoć enzima peroksidaze.

HDL-kolesterol

Koncentracija HDL-kolesterola u serumu određena je na biokemijskom analizatoru Olympus AU 400, Beckman Coulter, SAD. Metoda se temelji na enzimskoj hidrolizi HDL-kolesterola pomoću kolesterol-esteraze, nakon što humana β-lipoproteinska antitijela vežu LDL, VLDL i hilomikrone, a potom se oksidira pomoću kolesterol-oksidaze pri čemu nastaju kolest-4-en-3-on i vodikov peroksid. Indikator je kromogen koji nastaje iz vodikovog peroksida, 4-aminoantipirina i N-etil-N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoksi-4 fluoranilina uz pomoć enzima peroksidaze.

LDL-kolesterol

Koncentracija LDL-kolesterola u serumu određena je na biokemijskom analizatoru Olympus AU 400, Beckman Coulter, SAD. Metoda se temelji na enzimskoj hidrolizi LDL-kolesterola pomoću kolesterol-esteraze i kolesterol-oksidaze, koje ujedno razgrađuju sve ne-LDL lipoproteine, pri čemu nastaju kolest-4-en-3-on i vodikov peroksid. Indikator je kromogen koji nastaje iz vodikovog peroksida, 4-aminoantipirina i HDAOS uz pomoć enzima peroksidaze.

3.2.4. Određivanje koncentracije biljega osteoblasta u serumu

Alkalna fosfataza

Koncentracija ALP u serumu određena je na biokemijskom analizatoru Olympus AU 400, Beckman Coulter, SAD. Metoda se temelji na mjerenju stope konverzije p-nitrofenil fosfata u p-nitrofenol u prisutnosti iona magnezija i dietanolamina kao akceptora fosfataze pri pH=9,8. Brzina stvaranja p-nitrofenola izravno je proporcionalna aktivnosti ALP u uzorku.

Osteokalcin

Koncentracija štakorskog osteokalcina određena je komercijalnom ELISA (enzimski imunotest na čvrstoj fazi, *enzyme-linked immunosorbent assay*) metodom (Nordic Bioscience Diagnostics A/S, Danska). To je kompetitivna metoda koja je uključivala 5 kalibratora, u rasponu od 45,9 ng/mL do 1510 ng/mL, i slijepu probu. Prema informacijama dobivenih od proizvođača specifičnost metode je izrazito visoka i iznosi 99±4 %. Preciznost u seriji (KV<5,0 %) i preciznost iz dana u dan (KV<7,7 %) testirana je od strane proizvođača. Za kontrolu kvalitete metode korištena je komercijalna kontrola proizvođača.

3.2.5. Određivanje koncentracije biljega osteoklasta u serumu

Kisela fosfataza

Koncentracija ACP u serumu određena je na biokemijskom analizatoru Olympus AU 400, Beckman Coulter, SAD. Metoda se temelji na mjerenju stope konverzije 1-naftil-fosfata u 1-naftol, koji se uz *Fast red TR* sol, pri pH=4,8 pretvara u obojeni azo spoj. Intenzitet obojenja izravno je proporcionalan aktivnosti ACP u uzorku.

Tartarat rezistentna kisela fosfataza

Koncentracija TRACP u serumu određena je na biokemijskom analizatoru Olympus AU 400, Beckman Coulter, SAD. Metoda se temelji na mjerenju stope konverzije 1-naftil-fosfata u 1-naftol, koji se uz *Fast red TR* sol, pri pH=4,8 pretvara u obojeni azo spoj. Aktivnost TRACP se mjeri nakon dodatka tartarata. Intenzitet obojenja izravno je proporcionalan aktivnosti TRACP u uzorku.

TRACP 5b izoforma

Koncentracija štakorske TRACP 5b izoforme određena je komercijalnom ELISA metodom (SBA Sciences, IDS Ltd, Finska). Metoda je uključivala 4 kalibratora, u rasponu od 0,5 U/L do 9 U/L, i slijepu probu (kalibracijska krivulja rađena je u 5 točaka). Prema informacijama dobivenih od proizvođača osjetljivost metode iznosi 0,1 U/L. Preciznost u seriji (KV<5,8 %) i preciznost iz dana u dan (KV<5,2 %) testirana je od strane proizvođača. Za kontrolu kvalitete metode korištena je komercijalna kontrola proizvođača.

3.3. Statistička obrada podataka

Podaci su obrađeni primjenom MS Excel softvera (deskriptivna statistika) i pomoću GraphPad Prism 5 Project programa pri čemu se pokazalo da niti jedna skupina nije slijedila normalnu distribuciju. Parametri koji nisu slijedili normalnu distribuciju obrađeni su neparametrijskim testom (Non-parametric ANOVA) s Kruskal-Wallis i Dunn's Multiple Comparison testom. Razina značajnosti u svim testovima bila je postavljena na $P<0,05$. Dodatno je ispitana korelacija i linearna regresija kako bi se vidjelo je li učinak testnih supstancija ovisan o primijenjenoj dozi.

4. REZULTATI

4.1. Uspostava modela hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima

Svrha preliminarnih pokusa bila je uspostava životinjskog modela hipoplazije fize kojim bi se mogao pratiti utjecaj glukokortikosteroida na metabolizam ugljikohidrata, lipida i na rast i razvoj kosti. U svakom pokusu, od ukupno 3, korišten je jedan glukokortikosteroid (beklometazon dipropionat, prednizolon i ciklezonid) u 4 različite doze, 0,3, 1, 3 i 10 mg/kg, a u svakoj skupini je bilo po 8 životinja. Na kraju svakog pokusa životinje su žrtvovane i uzeti su uzorci za daljnje analize.

4.1.1. Učinak glukokortikosteroida na koncentraciju glukoze u serumu mladih štakora

U tablici 3. prikazane su vrijednosti koncentracije glukoze u serumu mladih štakora nakon primjene 4 različite doze pojedine standardne supstance.

Primjena beklometazon dipropionata nije značajno utjecala na koncentraciju glukoze niti u jednoj od primijenjenih doza, dok su prednizolon i ciklezonid statistički značajno povisili koncentraciju glukoze (23 %, odnosno 104 %) samo u najvišoj primjenjenoj koncentraciji, 10 mg/kg/danu, u odnosu na kontrolnu skupinu (12,2 (raspon 11,5-14,6) mmol/L u odnosu na 8,7 (raspon 8,3-9,2) mmol/L i 20,9 (raspon 12,1-26,7) mmol/L u odnosu na 9,4 (raspon 8,9-12,5) mmol/L).

Tablica 3. Koncentracija glukoze u serumu mladih štakora nakon subkutane primjene glukokortikosteroida.

	Glukoza (mmol/L)	% porasta	P
NK	9,0 (8,6-9,3)		
Beklometazon dipropionat (mg/kg/dan)			
0,3	8,9 (7,9-9,5)	-3	nz
1	8,9 (8,3-10,0)	0	nz
3	8,9 (8,1-11,9)	7	nz
10	9,5 (8,8-12,2)	8	nz
NK	8,7 (8,3-9,2)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
0,3	9,1 (8,7-9,9)	5	nz
1	10,1 (9,4-11,1)	18	nz
3	9,9 (9,2-10,9)	12	nz
10	12,2 (11,5-14,6)	23	<0,01
NK	9,4 (8,9-12,5)		
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
0,3	9,8 (8,9-10,7)	0	nz
1	9,3 (7,8-10,6)	-5	nz
3	9,9 (8,9-15,0)	7	nz
10	20,9 (12,1-26,7)	104	< 0,01

NK=negativna kontrola, koncentracija glukoze prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

4.1.2. Učinak glukokortikosteroida na koncentraciju triglicerida u serumu mladih štakora

U tablici 4. prikazane su vrijednosti koncentracije triglicerida u serumu mladih štakora nakon primjene 4 različite doze pojedine standardne supstance.

Primjena beklometazon dipropionata nije značajno utjecala na koncentraciju triglicerida niti u jednoj od primijenjenih doza, za razliku od prednizolona koji je u dozi od 10 mg/kg/danu statistički značajno povisio (206 %) koncentraciju triglicerida (4,24 (raspon 3,71-4,98) mmol/L u odnosu na 1,31 (raspon 1,11-1,74) mmol/L) i ciklezonida koji je statistički značajno povisio koncentraciju triglicerida (148 %, odnosno 101 %) u dozama od 3 mg/kg/danu i 10 mg/kg/danu u odnosu na kontrolnu skupinu (1,93 (raspon 0,79-4,29) mmol/L i 1,59 (raspon 0,99-3,13) mmol/L u odnosu na 0,78 (raspon 0,47-1,54) mmol/L).

Tablica 4. Koncentracija triglicerida u serumu mladih štakora nakon subkutane primjene glukokortikosteroida.

	Trigliceridi (mmol/L)	% porasta	P
NK	1,10 (0,81-1,53)		
Beklometazon dipropionat (mg/kg/dan)			
0,3	1,03 (0,52-1,53)	0	nz
1	1,34 (0,68-1,91)	23	nz
3	0,86 (0,47-1,09)	-26	nz
10	0,79 (0,53-1,56)	-25	nz
NK	1,31 (1,11-1,74)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
0,3	1,20 (0,94-1,71)	-7	nz
1	1,78 (1,12-2,44)	45	nz
3	1,75 (0,96-2,91)	32	nz
10	4,24 (3,71-4,98)	206	<0,001
NK	0,78 (0,47-1,54)		
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
0,3	1,28 (0,75-1,49)	25	nz
1	1,23 (0,42-1,70)	32	nz
3	1,93 (0,79-4,29)	148	< 0,01
10	1,59 (0,99-3,13)	101	< 0,05

NK=negativna kontrola, koncentracija triglicerida prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

4.1.3. Učinak glukokortikosteroida na katalitičku koncentraciju ALP u serumu mladih štakora

U tablici 5. prikazane su vrijednosti katalitičke koncentracije alkalne fosfataze u serumu mladih štakora nakon primjene 4 različite doze pojedine standardne supstance. Primjena svakog od tri standarda nije značajno utjecala na katalitičku koncentraciju alkalne fosfataze niti u jednoj od primijenjenih doza.

Tablica 5. Katalitička koncentracija ALP u serumu mladih štakora nakon subkutane primjene glukokortikosteroida.

	ALP (U/L)	% porasta	P
NK	380 (283-512)		
Beklometazon dipropionat (mg/kg/dan)			
0,3	362 (309-489)	1	nz
1	467 (257-607)	24	nz
3	417 (312-531)	14	nz
10	404 (309-546)	7	nz
NK	425 (399-458)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
0,3	395 (312-487)	-6	nz
1	470 (425-551)	12	nz
3	433 (407-496)	2	nz
10	370 (316-502)	-12	nz
NK	490 (427-944)		
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
0,3	539 (70-637)	-19	nz
1	434 (353-578)	-22	nz
3	420 (338-911)	-14	nz
10	580 (385-1033)	16	nz

NK=negativna kontrola, katalitička koncentracija ALP prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

4.1.4. Učinak glukokortikosteroida na katalitičku koncentraciju ACP u serumu mladih štakora

U tablici 6. prikazane su vrijednosti katalitičke koncentracije kisele fosfataze u serumu mladih štakora nakon primjene 4 različite doze pojedine standardne supstance. Primjena beklometazon dipropionata je statistički značajno smanjila (17 %, odnosno 15 %) katalitičku koncentraciju kisele fosfataze u dozama od 0,3 i 1 mg/kg/danu (32 (raspon 26-35) U/L i 32 (raspon 28-34) U/L u odnosu na 39 (raspon 29-42) U/L), dok u višim dozama nije značajno utjecala na katalitičku koncentraciju ACP-a.

Tablica 6. Katalitička koncentracija ACP u serumu mladih štakora nakon subkutane primjene glukokortikosteroida.

	ACP (U/L)	% porasta	P
NK	39 (29-42)		
Beklometazon dipropionat (mg/kg/dan)			
0,3	32 (26-35)	-17	<0,05
1	32 (28-34)	-15	<0,05
3	34 (30-38)	-9	nz
10	34 (27-40)	-11	nz
NK	34 (33-38)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
0,3	38 (36-41)	13	nz
1	30 (22-40)	-10	nz
3	32 (29-36)	-2	nz
10	24 (22-27)	-31	<0,01
NK	72 (60-80)		
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
0,3	70 (54-80)	-2	nz
1	69 (54-82)	-5	nz
3	50 (45-61)	-29	< 0,01
10	35 (30-52)	-47	< 0,001

NK=negativna kontrola, katalitička koncentracija ACP prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

Suprotno tome, prednizolon je samo u najvišoj dozi od 10 mg/kg/danu statistički značajno smanjio (31 %) katalitičku koncentraciju kisele fosfataze (24 (raspon 22-27) U/L u odnosu na 34 (raspon 33-38) U/L), dok je u najnižoj dozi od 0,3 mg/kg/danu čak povisio (13 %) katalitičku koncentraciju kisele fosfataze (38 (raspon 36-41) U/L u odnosu na 34 (raspon 33-38) U/L), no ipak ne statistički značajno. Treća standardna supstanca, ciklezonid, je kao i beklometazon dipropionat u svim dozama smanjio katalitičku koncentraciju kisele fosfataze, ali samo u dozama od 3 i 10 mg/kg/danu je učinak (29 %, odnosno 47 %) bio statistički značajan u odnosu na kontrolnu skupinu (50 (raspon 45-61) U/L i 35 (raspon 30-52) U/L u odnosu na 72 (raspon 60-80) U/L).

4.1.5. Učinak glukokortikosteroida na katalitičku koncentraciju TRACP u serumu mladih štakora

U tablici 7. prikazane su vrijednosti katalitičke koncentracije tartarat rezistentne kisele fosfataze, kao biokemijskog biljega osteoklasta, u serumu mladih štakora nakon primjene 4 različite doze pojedine standardne supstance.

Tablica 7. Katalitička koncentracija TRACP u serumu mladih štakora nakon subkutane primjene glukokortikosteroida.

	TRACP (U/L)	**% porasta**	**P**
NK	10 (8-11)		
Beklometazon dipropionat (mg/kg/dan)			
0,3	10 (9-13)	5	nz
1	10 (8-12)	3	nz
3	11 (10-14)	15	nz
10	10 (8-12)	0	nz
NK	7 (6-8)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
0,3	8 (8-9)	12	nz
1	6 (6-9)	-10	nz
3	6 (6-7)	-9	nz
10	3 (3-4)	-55	<0,05
NK	11 (10-13)		
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
0,3	10 (8-12)	-6	nz
1	10 (9-11)	-11	nz
3	8 (7-9)	-31	< 0,01
10	6 (5-8)	-44	< 0,001

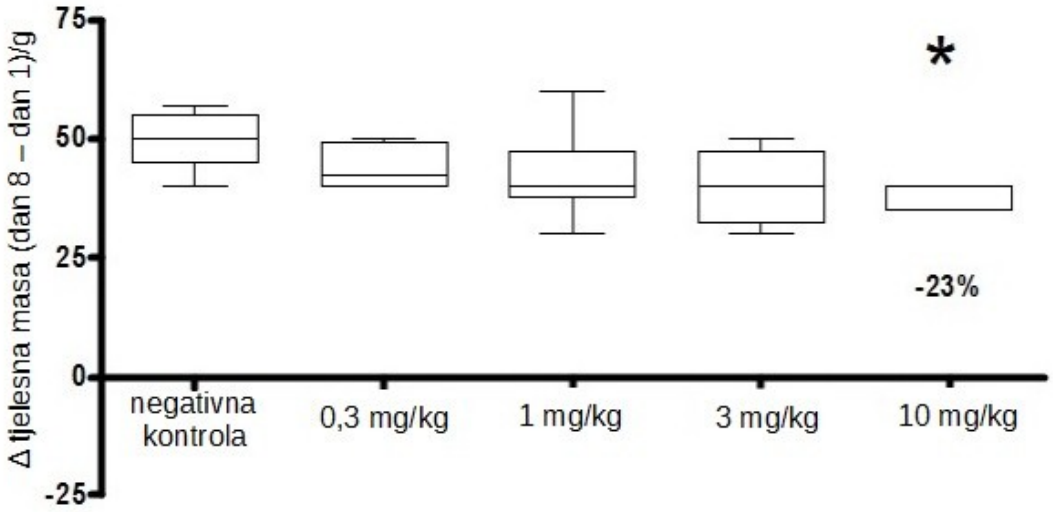
NK=negativna kontrola, katalitička koncentracija TRACP prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

Primjena beklometazon dipropionata nije statistički značajno utjecala na katalitičku koncentraciju tartarat rezistentne kisele fosfataze iako je povisila koncentraciju TRACP u svim dozama. Za razliku od beklometazon dipropionata, prednizolon i ciklezonid su uzrokovali smanjenje katalitičke koncentracije TRACP u serumu mladih štakora. Prednizolon je u dozi od 10 mg/kg/danu statistički značajno smanjio (55 %) katalitičku koncentraciju

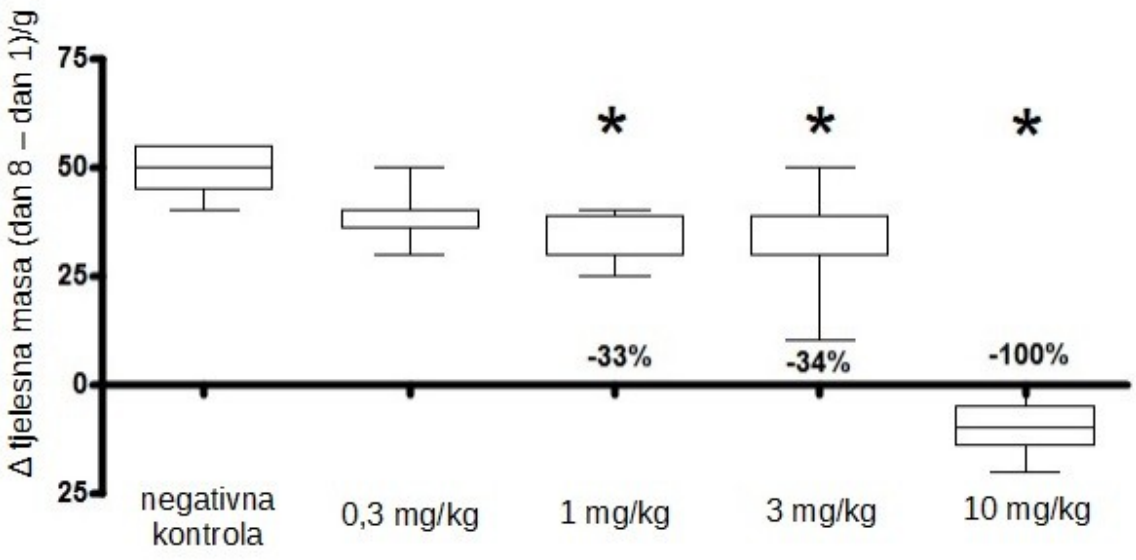
TRACP u odnosu na negativnu kontrolu (3 (raspon 3-4) U/L u odnosu na 7 (raspon 6-8) U/L). Ciklezonid je statistički značajno smanjio (31 %, odnosno 44 %) katalitičku koncentraciju tartarat rezistentne kisele fosfataze u dozama od 3 i 10 mg/kg/danu u odnosu na kontrolnu skupinu (8 (raspon 7-9) U/L i 6 (raspon 5-8) U/L u odnosu na 11 (raspon 10-13) U/L).

4.1.6. Učinak glukokortikosteroida na prirast tjelesne mase mladih štakora

Na slici 21. prikazane su promjene tjelesne mase mladih štakora nakon 7 dana primjene navedenih doza beklometazon dipropionata u odnosu na tjelesne mase prije početka pokusa. Beklometazon dipropionat je smanjio prirast tjelesne mase mladih štakora u svim dozama, ali statistički značajno (23 %) samo u najvišoj dozi, 10 mg/kg/danu, u odnosu na kontrolnu skupinu. Štoviše, statistička obrada je pokazala da postoji slaba negativna korelacija (P = 0,0098, koeficijent korelacije = -0,4087) između primijenjenih doza i prirasta tjelesne mase: za svaki dodatni mg/kg beklometazon dipropionata prirast tjelesne mase se smanjuje za 0,7693 g.



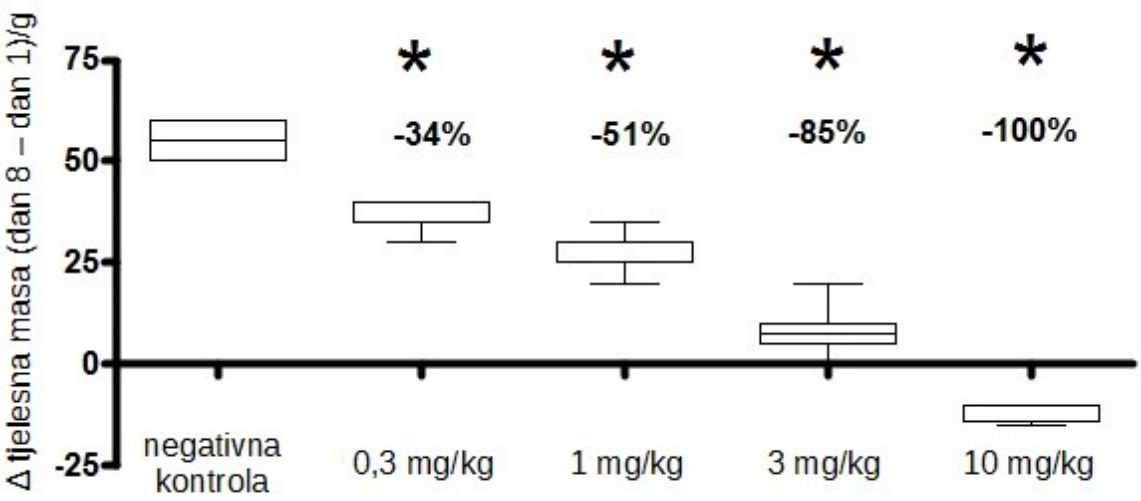
Na apscisi su prikazane primijenjene doze glukokortikosteroida, prirast tjelesne mase je prikazan medijanima s interkvartilnim rasponom i minimumima i maksimumima, N=8, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, * = statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu.



Slika 22. Učinak prednizolona na prirast tjelesne mase mladih štakora.
Na apscisi su prikazane primijenjene doze glukokortikosteroida, prirast tjelesne mase je prikazan medijanima s interkvartilnim rasponom i minimumima i maksimumima, N=8, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, * = statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu.

Na slici 22. prikazane su promjene tjelesne mase mladih štakora nakon 7 dana primjene navedenih doza prednizolona u odnosu na tjelesne mase prije početka pokusa. U odnosu na kontrolnu skupinu, prednizolon je statistički značajno smanjio prirast tjelesne mase mladih štakora u dozama od 1 mg/kg/danu (33 %), 3 mg/kg/danu (34 %) i 10 mg/kg/danu (100 %). Štoviše, u dozi od 10 mg/kg/danu nije samo smanji prirast tjelesne mase nego i samu tjelesnu masu.

Statistička obrada također je pokazala da postoji jaka negativna korelacija (P < 0,0001, koeficijent korelacije = -0,9275) između primijenjenih doza i prirasta tjelesne mase: za svaki dodatni mg/kg prednizolona prirast tjelesne mase se smanjuje za 5,2142 g.



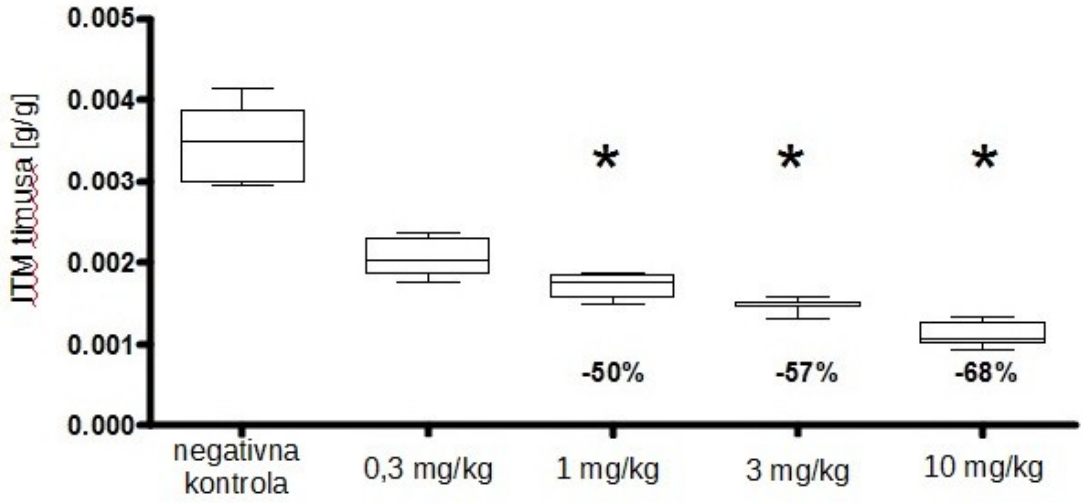
Slika 23. Učinak ciklezonida na prirast tjelesne mase mladih štakora.
Na apscisi su prikazane primijenjene doze glukokortikosteroida, prirast tjelesne mase je prikazan medijanima s interkvartilnim rasponom i minimumima i maksimumima, N=8, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, * = statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu.

Na slici 23. prikazane su promjene tjelesne mase mladih štakora nakon 7 dana primjene navedenih doza ciklezonida u odnosu na tjelesne mase prije početka pokusa. Ciklezonid je statistički značajno smanjio prirast tjelesne mase mladih štakora u svim dozama u odnosu na kontrolnu skupinu (u dozi 0,3 mg/kg/danu 34 %; u dozi 1 mg/kg/danu 51 %; u dozi 3 mg/kg/danu 85 %; u dozi 10 mg/kg/danu 100 %). Štoviše, isto kao i prednizolon, i ciklezonid je u dozi od 10 mg/kg/danu smanjio ne samo prirast tjelesne mase nego i ukupnu tjelesnu masu.

Statistička obrada također je pokazala da postoji jaka negativna korelacija (P < 0,0001, koeficijent korelacije = -0,8786) između primijenjenih doza i prirasta tjelesne mase: za svaki dodatni mg/kg ciklezonida prirast tjelesne mase se smanjuje za 5,4098 g.

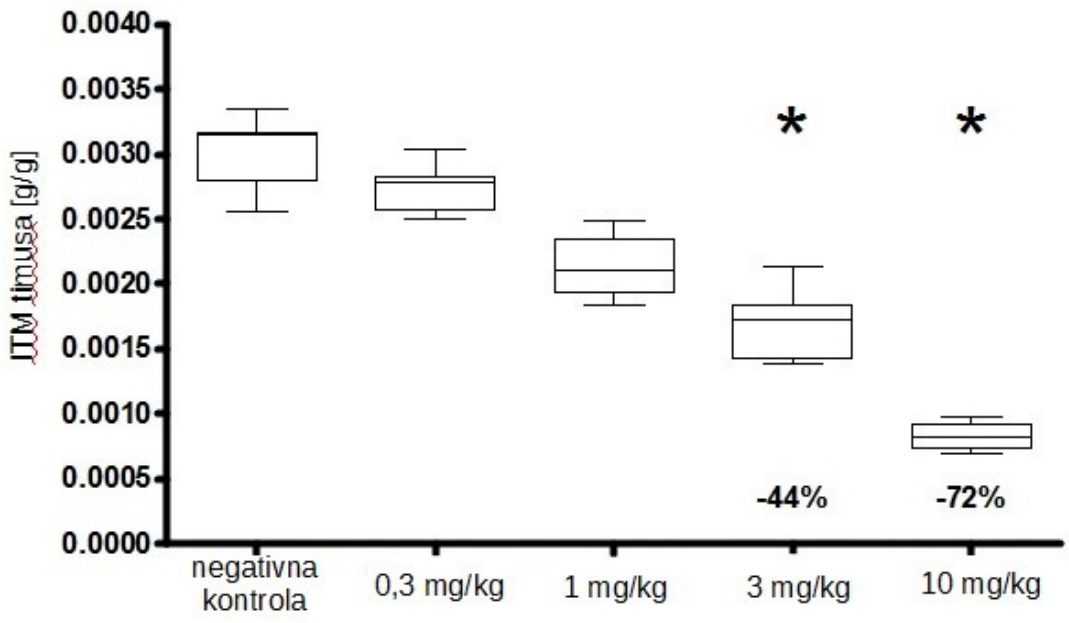
4.1.7. Učinak glukokortikosteroida na indeks mase timusa mladih štakora

Na slici 24. prikazani su indeksi mase timusa mladih štakora nakon 7 dana primjene navedenih doza beklometazon dipropinata. Beklometazon dipropionat je statistički značajno smanjio indeks mase timusa u dozama od 1 mg/kg/danu (50 %), 3 mg/kg/danu (57 %) i 10 mg/kg/danu (68 %) u odnosu na kontrolnu skupinu.



Slika 24. Učinak beklometazon dipropionata na indeks mase timusa mladih štakora.
Na apscisi su prikazane primijenjene doze glukokortikosteroida, ITM = indeks mase timusa, prikazani su medijani s interkvartilnim rasponom i minimumima i maksimumima, N=8, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, * = statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu.

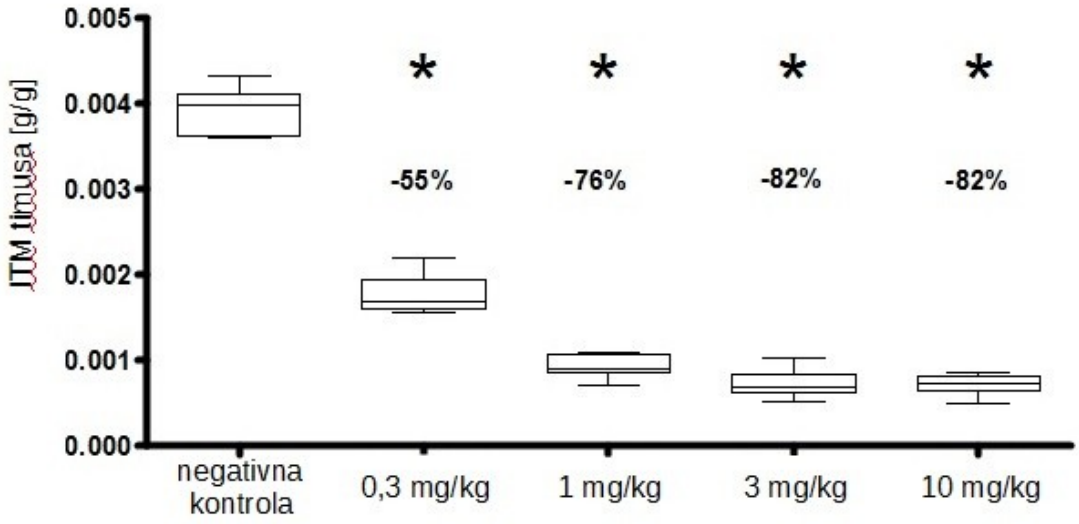
Štoviše, statistička obrada je pokazala da postoji umjerena negativna korelacija (P < 0,0001, koeficijent korelacije = -0,6487) između primijenjenih doza i indeksa mase timusa: za svaki dodatni mg/kg beklometazon dipropionata indeks mase timusa se smanjuje za 0,0001414 g/g.



Slika 25. Učinak prednizolona na indeks mase timusa mladih štakora.
Na apscisi su prikazane primijenjene doze glukokortikosteroida, ITM = indeks mase timusa, prikazani su medijani s interkvartilnim rasponom i minimumima i maksimumima, N=8, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, * = statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu.

Na slici 25. prikazani su indeksi mase timusa mladih štakora nakon 7 dana primjene navedenih doza prednizolona. Prednizolon je statistički značajno smanjio indekse mase timusa u dozama od 3 mg/kg/danu (44 %) i 10 mg/kg/danu (72 %) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Štoviše, statistička obrada je pokazala da postoji jaka negativna korelacija (P < 0,0001, koeficijent korelacije = -0,8998) između primijenjenih doza i indeksa mase timusa: za svaki dodatni mg/kg prednizolona indeks mase timusa se smanjuje za 0,0001922 g/g.



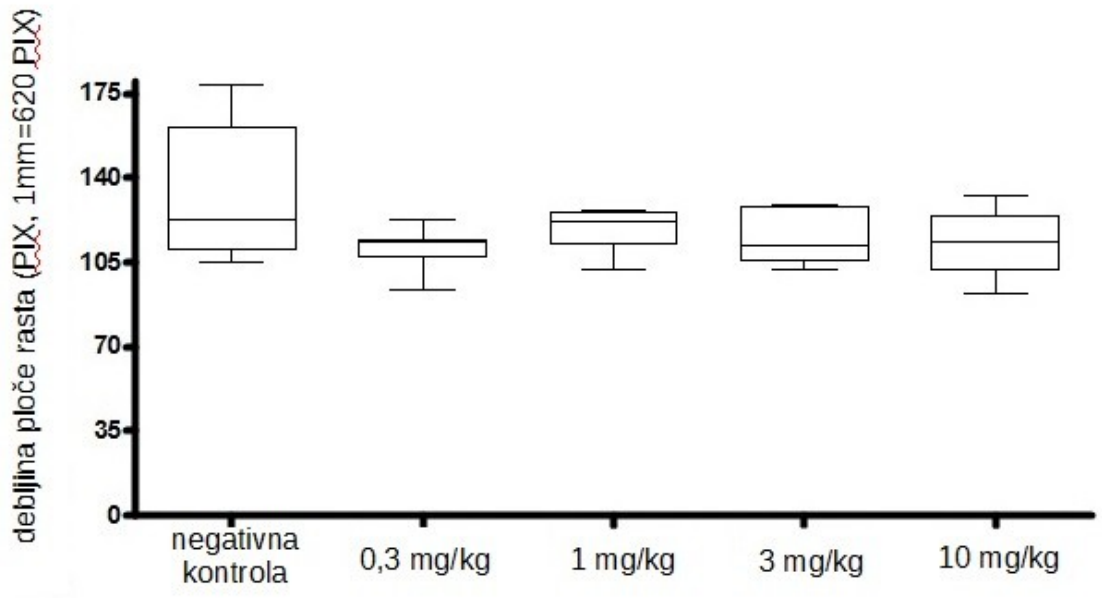
Slika 26. Učinak ciklezonida na indeks mase timusa mladih štakora.
Na apscisi su prikazane primijenjene doze glukokortikosteroida, ITM = indeks mase timusa, prikazani su medijani s interkvartilnim rasponom i minimumima i maksimumima, N=8, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, * = statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu.

Na slici 26. prikazani su indeksi mase timusa mladih štakora nakon 7 dana primjene navedenih doza ciklezonida. Ciklezonid je statistički značajno smanjio indekse mase timusa u svim dozama u odnosu na kontrolnu skupinu: u dozi od 0,3 mg/kg/danu ciklezonid je uzrokovao smanjenje od 55 %, u dozi od 1 mg/kg/danu uzrokovao je smanjenje od 76 %, a u dozama od 3 i 10 mg/kg/danu uzrokovao je smanjenje ITM-a od 82 %.

Štoviše, statistička obrada je pokazala da postoji umjerena negativna korelacija (P < 0,0001, koeficijent korelacije = -0,5379) između primijenjenih doza i indeksa mase timusa: za svaki dodatni mg/kg ciklezonida indeks mase timusa se smanjuje za 0,0001711 g/g.

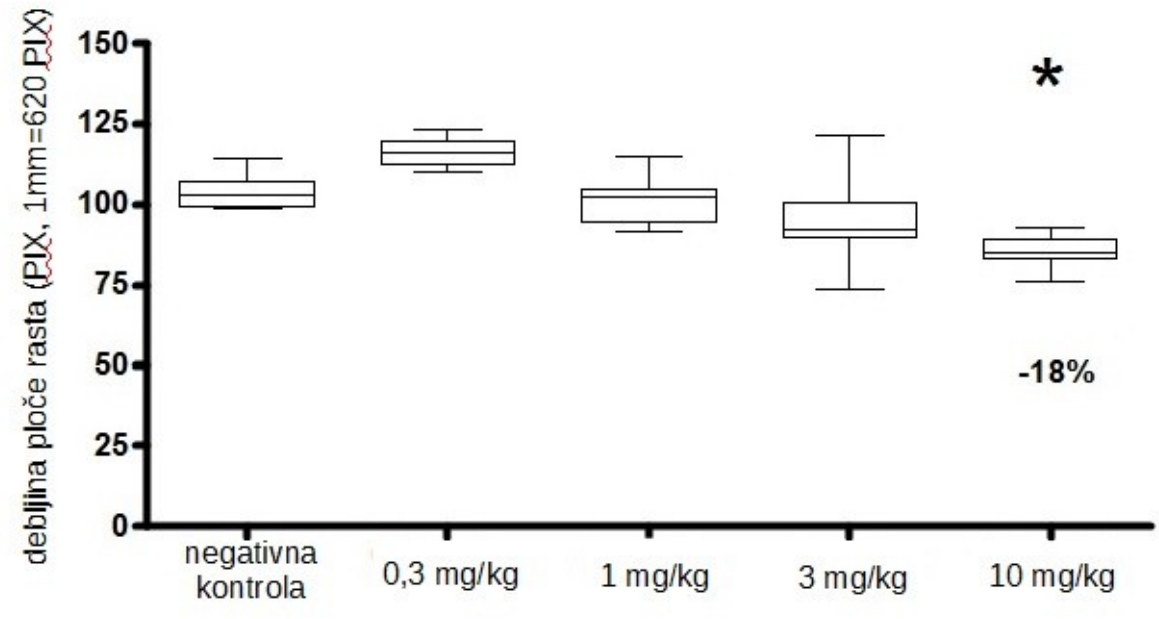
4.1.8. Učinak glukokortikosteroida na proliferativnu zonu glave femura mladih štakora

Na slici 27. prikazane su debljine proliferativne zone glave femura mladih štakora nakon 7 dana primjene navedenih doza beklometazon dipropionata. Beklometazon dipropionat nije statistički značajno utjecao na debljinu proliferativne zone glave femura niti u jednoj od navedenih doza u odnosu na kontrolnu skupinu. Štoviše, nije uočena korelacija učinka i primijenjene doze beklometazon dipropionata.



Slika 27. Učinak beklometazon dipropionata na debljinu proliferativne zone glave femura mladih štakora.

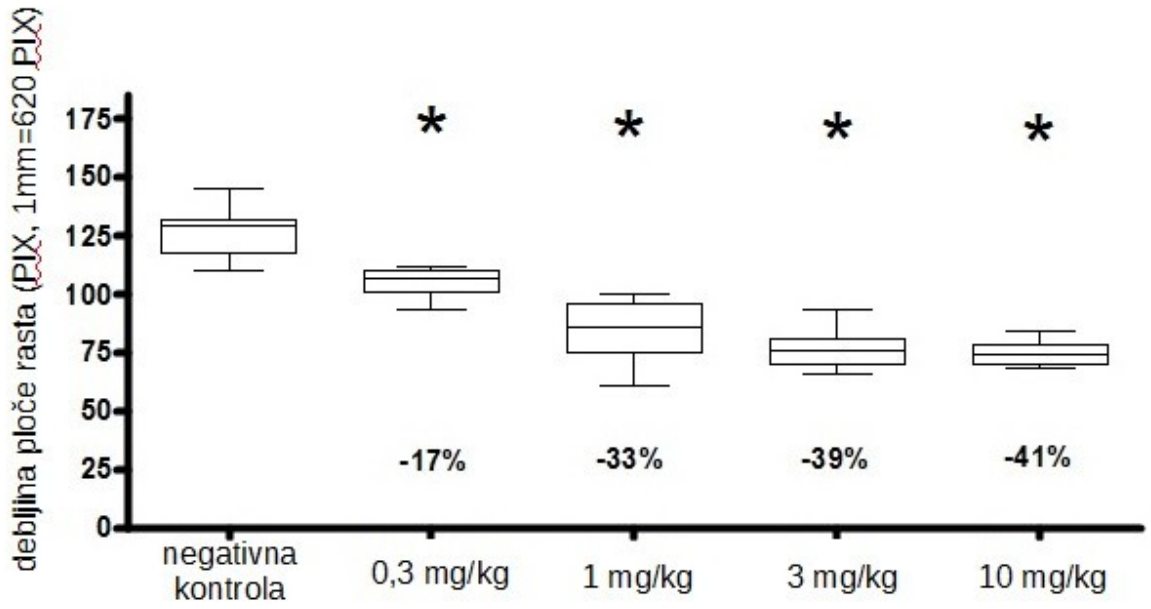
Na apscisi su prikazane primijenjene doze glukokortikosteroida, PIX = pikseli, debljina ploče rasta prikazana je medijanima s interkvartilnim rasponom i minimumima i maksimumima, N=8, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, * = statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu.



Slika 28. Učinak prednizolona na debljinu proliferativne zone glave femura mladih štakora. Na apscisi su prikazane primijenjene doze glukokortikosteroida, PIX = pikseli, debljina ploče rasta prikazana je medijanima s interkvartilnim rasponom i minimumima i maksimumima, N=8, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, * = statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu.

Na slici 28. prikazane su debljine proliferativne zone glave femura mladih štakora nakon 7 dana primjene navedenih doza prednizolona. Prednizolon je statistički značajno smanjio (18 %) debljinu proliferativne zone glave femura samo u najvišoj dozi (10 mg/kg/danu) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Štoviše, statistička obrada je pokazala da postoji umjerena negativna korelacija (P < 0,0001, koeficijent korelacije = -0,6640) između primijenjenih doza i debljine proliferativne zone glave femura: za svaki dodatni mg/kg prednizolona debljina proliferativne zone glave femura se smanjuje za 2,3055 piksela.



Slika 29. Učinak ciklezonida na debljinu proliferativne zone glave femura mladih štakora. Na apscisi su prikazane primijenjene doze glukokortikosteroida, PIX = pikseli, debljina ploče rasta prikazana je medijanima s interkvartilnim rasponom i minimumima i maksimumima, N=8, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, * = statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu.

Na slici 29. prikazane su debljine proliferativne zone glave femura mladih štakora nakon 7 dana primjene navedenih doza ciklezonida. Ciklezonid je statistički značajno smanjio debljinu proliferativne zone glave femura u svim dozama u odnosu na kontrolnu skupinu: 17 % u dozi od 0,3 mg/kg/danu; 33 % u dozi od 1 mg/kg/danu, 39 % u dozi od 3 mg/kg/danu, te 41 % u dozi od 10 mg/kg/danu.

Štoviše, statistička obrada je pokazala da postoji umjerena negativna korelacija (P < 0,0001, koeficijent korelacije = -0,6041) između primijenjenih doza i debljine proliferativne zone glave femura: za svaki dodatni mg/kg ciklezonida debljina proliferativne zone glave femura se smanjuje za 3,3883 piksela.

4.2. Metabolički i koštani biljezi nakon primjene prednizolona i ciklezonida

U preliminarnim pokusima smo se bavili uspostavljanjem modela hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima u kojem smo pratili metaboličke i koštane učinke tri različita glukokortikosteroida u 4 različite doze (0,3, 1, 3 i 10 mg/kg/danu). Histopatološka analiza koja je pokazala smanjenje debljine proliferativne zone glave femura bila je pokazatelj izazvane hipoplazije. Dobiveni rezultati su pokazali da beklometazon dipropionat nije statistički značajno utjecao niti na koncentraciju glukoze i triglicerida u serumu mladih štakora, niti na koncentraciju TRACP kao specifičnog biljega osteoklasta ni u jednoj od navedenih doza. Štoviše, beklometazon dipropionat nije uzrokovao značajno smanjenje debljine proliferativne zone glave femura, pa tako ne možemo tvrditi da je uopće došlo do razvoja hipoplazije pod utjecajem ovog glukokortikosteroida. Stoga smo u nastavnom istraživanju ovog rada odlučili životinje tretirati samo s prednizolonom i ciklezonidom te odrediti biokemijske biljege u serumu kako bi pronašli najbolje pokazatelje učinka glukokortikosteroida na metabolizam ugljikohidrata i lipida te na koštanu aktivnost. Također smo, s obzirom da kod primjene najniže doze glukokortikosteroida (0,3 mg/kg/danu) nije bilo značajnih učinaka na debljinu ploče rasta, odlučili izbaciti tu dozu.

4.2.1. Učinak prednizolona i ciklezonida na koncentraciju glukoze u serumu mladih štakora

U tablici 8. prikazane su vrijednosti koncentracije glukoze u serumu mladih štakora nakon primjene 3 različite doze dvaju glukokortikosteroida. Oba standarda, i prednizolon i ciklezonid su statistički značajno povisili koncentraciju glukoze (23 %, odnosno 35 %) samo u najvišoj koncentraciji, 10 mg/kg/danu, u odnosu na kontrolnu skupinu (10,8 (raspon 8,4-12,8) mmol/L i 11,7 (raspon 9,7-13,3) mmol/L u odnosu na 8,5 (raspon 8,2-9,3) mmol/L). Time su se i potvrdili rezultati dobiveni u preliminarnim pokusima.

Tablica 8. Koncentracija glukoze u serumu mladih štakora nakon subkutane primjene glukokortikosteroida.

	Glukoza (mmol/L)	% porasta	P
NK	8,5 (8,2-9,3)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
1	9,9 (8,4-10,3)	12	nz
3	10,0 (8,7-11,3)	14	nz
10	10,8 (8,4-12,8)	23	<0,05
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
1	8,7 (7,8-9,0)	-2	nz
3	9,2 (8,5-10,9)	10	nz
10	11,7 (9,7-13,3)	35	< 0,001

NK=negativna kontrola, koncentracija glukoze prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

4.2.2. Učinak prednizolona i ciklezonida na koncentraciju lipida u serumu mladih štakora

U tablici 9. prikazane su vrijednosti koncentracije triglicerida u serumu mladih štakora nakon primjene 3 različite doze dvaju glukokortikosteroida. Prednizolon je u dozi od 10 mg/kg/danu statistički značajno povisio (116 %) koncentraciju triglicerida u odnosu na kontrolnu skupinu (3,04 (raspon 2,02-4,21) mmol/L u odnosu na 1,43 (raspon 0,91-1,75) mmol/L) i time potvrdio rezultate iz preliminarnih pokusa. S druge strane, ciklezonid je povisio koncentraciju triglicerida u sve tri primijenjene doze, ali ta razlika nije bila statistički značajna za razliku od preliminarnih rezultata gdje je u dozama od 3 i 10 mg/kg/danu statistički značajno povisio koncentraciju triglicerida.

Tablica 9. Koncentracija triglicerida u serumu mladih štakora nakon primjene glukokortikosteroida.

	Trigliceridi (mmol/L)	% porasta	P
NK	1,43 (0,91-1,75)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
1	1,76 (0,72-2,95)	26	nz
3	1,91 (0,99-3,37)	46	nz
10	3,04 (2,02-4,21)	116	<0,01
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
1	2,21 (0,33-2,84)	34	nz
3	1,50 (0,47-4,81)	45	nz
10	1,95 (1,08-2,35)	31	nz

NK=negativna kontrola, koncentracija triglicerida prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

Tablica 10. Koncentracija kolesterola u serumu mladih štakora nakon primjene glukokortikosteroida.

	Kolesterol (mmol/L)	% porasta	P
NK	2,0 (1,9-2,3)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
1	1,9 (1,6-2,1)	-12	nz
3	1,8 (1,7-2,3)	-11	nz
10	2,5 (1,9-2,9)	16	nz
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
1	2,0 (1,5-2,8)	0	nz
3	2,9 (2,0-3,2)	26	nz
10	3,1 (1,9-3,9)	45	nz

NK=negativna kontrola, koncentracija kolesterola prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

U tablici 10. prikazane su vrijednosti koncentracije kolesterola u serumu mladih štakora nakon primjene 3 različite doze dvaju glukokortikosteroida. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da postoji porast koncentracije ukupnog kolesterola, pogotovo s primijenjenom dozom od 10 mg/kg/danu, ali niti jedan porast nije bio statistički značajan. Razlog što niti

jedan glukokortikosteroid niti u jednoj dozi nije značajno utjecao na koncentraciju kolesterola u odnosu na kontrolnu skupinu može biti rasap vrijednosti zbog premalog broja životinja korištenih u pokusu.

Tablica 11. Koncentracija HDL-kolesterola u serumu mladih štakora nakon primjene glukokortikosteroida.

	HDL-kolesterol (mmol/L)	**% porasta**	**P**
NK	1,2 (1,1-1,4)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
1	1,2 (0,9-1,3)	1	nz
3	1,0 (0,8-1,5)	-2	nz
10	1,5 (1,1-1,8)	35	nz
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
1	1,3 (0,8-1,9)	9	nz
3	1,9 (1,1-2,0)	40	nz
10	1,9 (1,3-2,4)	59	<0,05

NK=negativna kontrola, koncentracija HDL-kolesterola prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

U tablici 11. prikazane su vrijednosti koncentracije HDL-kolesterola u serumu mladih štakora nakon primjene 3 različite doze dvaju glukokortikosteroida. Prednizolon nije niti u jednoj dozi značajno utjecao na koncentraciju HDL-kolesterola u odnosu na kontrolnu skupinu, dok je ciklezonid u najvišoj dozi, 10 mg/kg/danu, statisatički značajno povisio (59 %) koncentraciju HDL-kolesterola u odnosu na kontrolnu skupinu (1,9 (raspon 1,3-2,4) mmol/L u odnosu na 1,2 (raspon 1,1-1,4) mmol/L).

Tablica 12. Koncentracija LDL-kolesterola u serumu mladih štakora nakon primjene glukokortikosteroida.

	LDL-kolesterol (mmol/L)	% porasta	P
NK	0,4 (0,3-0,4)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
1	0,3 (0,3-0,4)	-25	nz
3	0,3 (0,2-0,4)	-23	nz
10	0,5 (0,3-0,6)	15	nz
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
1	0,3 (0,2-0,4)	-18	nz
3	0,4 (0,3-0,7)	2	nz
10	0,6 (0,3-0,9)	45	nz

NK=negativna kontrola, koncentracija LDL-kolesterola prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, $P<0,05$, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

U tablici 12. prikazane su vrijednosti koncentracije LDL-kolesterola u serumu mladih štakora nakon primjene 3 različite doze dvaju glukokortikosteroida. Niti jedan glukokortikosteroid niti u jednoj dozi nije značajno utjecao na koncentraciju kolesterola u odnosu na kontrolnu skupinu.

4.2.3. Učinak prednizolona i ciklezonida na katalitičku koncentraciju ALP u serumu mladih štakora

U tablici 13. prikazane su vrijednosti katalitičke koncentracije alkalne fosfataze u serumu mladih štakora nakon primjene 3 različite doze dvaju glukokortikosteroida. Primjena oba standarda nije značajno utjecala na katalitičku koncentraciju alkalne fosfataze niti u jednoj od primijenjenih doza. To je potvrdilo rezultate dobivene u preliminarnim pokusima.

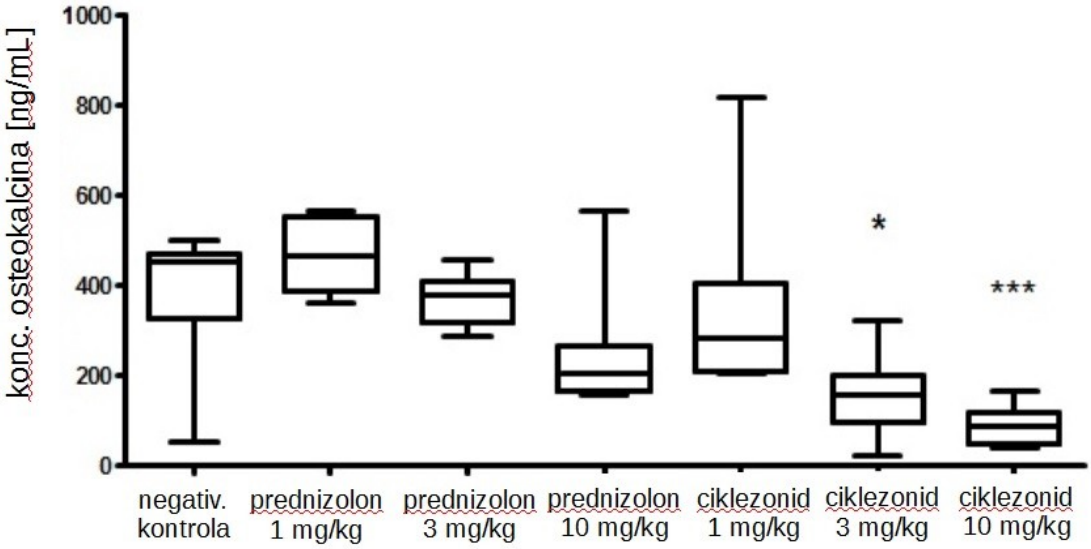
Tablica 13. Katalitička koncentracija ALP u serumu mladih štakora nakon subkutane primjene glukokortikosteroida.

	ALP (U/L)	% porasta	P
NK	427 (330-643)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
1	430 (277-583)	-3	nz
3	533 (335-678)	15	nz
10	425 (297-563)	-2	nz
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
1	436 (236-563)	-3	nz
3	385 (338-752)	5	nz
10	356 (291-447)	-19	nz

NK=negativna kontrola, katalitička koncentracija ALP prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

4.2.4. Učinak prednizolona i ciklezonida na koncentraciju osteokalcina u serumu mladih štakora

Na slici 30. prikazane su koncentracije osteokalcina određivane u serumu mladih štakora nakon 7 dana primjene navedenih doza glukokortikosteroida. Primjena prednizolona nije pokazala nikakvu značajnu razliku u odnosu na kontrolnu skupinu ni u jednoj dozi, za razliku od ciklezonida koji je u dozama od 3 i 10 mg/kg/danu statistički značajno smanjio koncentraciju osteokalcina u odnosu na kontrolnu skupinu: 157 ng/mL (raspon 19-322 ng/mL, P<0,05) i 88 ng/mL (raspon 37-166 ng/mL, P<0,001) u odnosu na kontrolnu skupinu: 453 ng/mL (raspon 49-502 ng/mL).



Slika 30. Učinak prednizolona i ciklezonida na koncentraciju osteokalcina u mladih štakora. Na apscisi su prikazane primijenjene doze glukokortikosteroida, koncentracija osteokalcina je prikazana medijanima s interkvartilnim rasponom i minimumima i maksimumima, N=8, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, * = statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu.

Štoviše, statistička obrada je pokazala da postoji umjerena negativna korelacija i kod primjene prednizolona (P = 0,0033, koeficijent korelacije = -0,5118) i kod primjene ciklezonida (P = 0,0002, koeficijent korelacije = -0,6173) između primijenjenih doza i koncentracije osteokalcine: za svaki dodatni mg/kg prednizolona koncentracija osteokalcina se smanjuje za 17,7113 ng/mL dok se za svaki dodatni mg/kg ciklezonida koncentracija osteokalcina smanjuje za 28,2853 ng/mL.

4.2.5. Učinak prednizolona i ciklezonida na katalitičku koncentraciju ACP u serumu mladih štakora

U tablici 14. prikazane su vrijednosti katalitičke koncentracije kisele fosfataze u serumu mladih štakora nakon primjene 3 različite doze dvaju glukokortikosteroida. Primjena prednizolona je statistički značajno smanjila (28 %, odnosno 36 %) katalitičku koncentraciju kisele fosfataze u dozama od 3 i 10 mg/kg/danu u odnosu na kontrolnu skupinu (50 (raspon 32-53) U/L i 39 (raspon 30-60) U/L u odnosu na 63 (raspon 56-78) U/L). Oba glukokortikosteroida su potvrdila rezultate iz preliminarnih pokusa gdje su u najvišim dozama također značajno utjecali na smanjenje katalitičke koncentracije ACP-a.

Tablica 14. Katalitička koncentracija ACP u serumu mladih štakora nakon primjene glukokortikosteroida.

	ACP (U/L)	**% porasta**	**P**
NK	63 (56-78)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
1	60 (41-66)	-11	nz
3	50 (32-53)	-28	<0,05
10	39 (30-60)	-36	<0,01
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
1	56 (50-75)	-11	nz
3	57 (36-71)	-15	nz
10	40 (28-50)	-38	<0,001

NK=negativna kontrola, katalitička koncentracija ACP prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

4.2.6. Učinak prednizolona i ciklezonida na katalitičku koncentraciju TRACP u serumu mladih štakora

U tablici 15. prikazane su vrijednosti katalitičke koncentracije tartarat rezistentne kisele fosfataze, kao biokemijskog biljega osteoklasta, u serumu mladih štakora nakon primjene 3 različite doze dvaju glukokortikosteroida. Primjena prednizolona potvrdila je rezultate dobivene u preliminarnim pokusima statistički značajno smanjivši (43 %, odnosno

37 %) katalitičku koncentraciju TRACP u odnosu na negativnu kontrolu (7 (raspon 6-9) U/L i 8 (raspon 5-11) U/L u odnosu na 13 (raspon 11-15) U/L). S druge strane, ciklezonid je snizio katalitičku koncentraciju TRACP u sve tri primijenjene doze i to čak ovisno o dozi, ali ta razlika nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolnu skupinu za razliku od preliminarnih pokusa gdje je u dozama od 3 i 10 mg/kg/danu značajno smanjio katalitičku koncentraciju TRACP.

Tablica 15. Katalitička koncentracija TRACP u serumu mladih štakora nakon primjene glukokortikosteroida.

	TRACP (U/L)	**% porasta**	**P**
NK	13 (11-15)		
Prednizolon (mg/kg/dan)			
1	12 (6-15)	-7	nz
3	7 (6-9)	-43	<0,001
10	8 (5-11)	-37	<0,01
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
1	12 (10-17)	-1	nz
3	12 (10-14)	-5	nz
10	10 (7-14)	-18	nz

NK=negativna kontrola, katalitička koncentracija TRACP prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijska ANOVA, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

4.2.7. Učinak prednizolona i ciklezonida na koncentraciju TRACP 5b izoforme u serumu mladih štakora

U tablici 16. prikazane su vrijednosti koncentracije 5b izoforme tartarat rezistentne kisele fosfataze, kao specifičnog biokemijskog biljega osteoklasta, u serumu mladih štakora nakon primjene 3 različite doze dvaju glukokortikosteroida. Prikazane su vrijednosti dobivene prilikom krvarenja životinja prije početka pokusa i kod žrtvovanja na kraju pokusa. Primjena prednizolona u dozi od 10 mg/kg/danu statistički je značajno smanjila koncentraciju TRACP 5b izoforme u odnosu na negativnu kontrolu (11 (raspon 7-14) U/L u odnosu na 18 (raspon 10-36) U/L). Ciklezonid je smanjio koncentraciju TRACP 5b izoforme u serumu u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ne statistički značajno. No, kad se pogleda koncentracija TRACP 5b u

odnosu na početnu koncentraciju u grupama od 3 i 10 mg/kg/danu primljenog ciklezonida, vidi se da ipak postoji trend smanjenja koncentracije TRACP 5b.

Tablica 16. Koncentracija TRACP 5b izoforme u serumu mladih štakora nakon primjene glukokortikosteroida.

TRACP 5b (U/L)	**Dan 1**	**Dan 8**	**P**
NK	14 (8-27)	18 (10-36)	
Prednizolon (mg/kg/dan)			
1	16 (11-25)	18 (11-30)	nz
3	14 (11-27)	18 (10-33)	nz
10	14 (11-21)	11 (7-14)	<0,05
Ciklezonid (mg/kg/dan)			
1	13 (10-18)	16 (9-19)	nz
3	16 (11-38)	16 (10-20)	nz
10	17 (14-23)	12 (9-25)	nz

NK=negativna kontrola, koncentracija TRACP 5b prikazana medijanima i rasponom, N=8, % porasta= vrijednosti razlike u postotcima u odnosu na NK, P<0,05, neparametrijski parni test, u usporedbi s negativnom kontrolom, nz = nema značajnosti

5. RASPRAVA

Kortikosteroidi se široko primjenjuju u mnogim granama medicine. Čini se da postoji opčinjenost njihovim terapijskim učincima, posebno u liječenju bolesti za koje nema etiološki djelotvornog lijeka. Mnogo je nejasnoća oko njihova djelovanja i s pravom se postavljaju pitanja o opravdanosti njihove primjene u mnogim patološkim stanjima. Brojne nuspojave liječenja kortikosteroidima, od kojih su neke ozbiljne i dugotrajne, a neke nisu kroz neko vrijeme čak niti zamjetljive, nameću poseban oprez u procjeni odnosa koristi prema opasnostima njihove primjene kod svake indikacije. Sredinom prošlog stoljeća glukokortikosteroidi su uvedeni u kliničku primjenu kako bi osigurali liječenje raznih upalnih bolesti kao što su astma i reumatoidni artritis (Reid, 1997). No, već tijekom prvih nekoliko godina prijavljeni su slučajevi lomova kostiju nakon najmanjih trauma u pacijenata koji su bili na terapiji glukokortikosteroidima. Otad su objavljene brojne studije na kojima se temelje preporuke o primjeni kortikosteroida, ali još i sad pouzdano ne znamo, s obzirom na moguće dugoročne štetne posljedice, koji je najbolji oblik lijeka, a koji način primjene, i u kojim su stanjima kortikosteroidi zaista indicirani (Crowley, 2003; Vidaeff, Doyle i Gilstrap, 2003; O'Shea i Doyle, 2001).

U mnogim tkivima glukokortikoidi pokreću kataboličke procese. Tako, primjerice, pod njihovim utjecajem dolazi do razgradnje proteina u mišićima, koži, vezivnom, masnom i limfnom tkivu. S druge strane, u jetri glukokortikoidi stimuliraju enzime glukoneogeneze i povećavaju količinu glikogena i proteina. U suvišku oni dovode do hiperglikemije, hipertenzije, smanjuju rast i prirast tjelesne mase. Postoje brojni sintetski analozi glukokortikoida, kao što su prednizon, prednizolon, beklometazon, budezonid, ciklezonid i dr. Njihovo je protuupalno djelovanje puno jače u odnosu na prirodne kortikosteroide. Isto je toliko izraženiji i njihov učinak na metabolizam ugljikohidrata, dok je djelovanje na retenciju vode i soli oslabljeno.

Kao što je ranije spomenuto, glukokortikosteroidi su uvedeni u kliničku primjenu kako bi osigurali liječenje raznih upalnih bolesti kao što je, između ostalih, astma. Astma je najčešća kronična bolest u djece, a s obzirom da su glukokortikosteroidi najučinkovitiji protuupalni lijekovi, s vremenom su postali lijek izbora za sve pacijente s perzistirajućom astmom (Korenblat, 2010; Gentile i Skoner, 2010; Minisola i sur., 2008). Tu veliku

učinkovitost na upalu kod astme glukokortikosteroidi, kao što su prednizolon i beklometazon dipropionat, temelje na djelovanju na same gene koji se aktiviraju u upalnom procesu (Goto i sur., 2010). Iz literature je poznato da glukokortikosteroidi uvelike utječu na koštano tkivo (Eastell i sur., 2010), a kako je kost u djece strukturno slabija od kosti odrasle osobe (Benson i sur., 2010), postoji stalna mogućnost razvoja osteopenije kod djece na terapiji (Buehring i sur., 2013). Osteopenija je stanje u kojem je gustoća kosti smanjena**,** te se smatra pretečom osteoporoze. Osnovna odrednica osteopenije je slabljenje strukture, odnosno kvalitete kosti, a posljedica je poremećaja ravnoteže u procesu koštane pregradnje. Pregradnja kosti odvija se u dvije faze: prva faza je razgradnja (resorpcija) kosti**,** za koju su odgovorne specijalizirane koštane stanice osteoklasti, a druga faza je izgradnja kosti pod utjecajem osteoblasta (Kohrt i sur., 2004). Kost je metabolički aktivno tkivo u kojem se kontinuirano remodeliranje, odnosno koštana pregradnja, zbiva tijekom cijelog života, a posebnu ulogu ima kod djece u razvoju. Stoga je neophodno rano otkrivanje osteopenije za povoljnu prognozu tijeka bolesti. Samim time nameće se potreba za praćenjem metaboličkih i koštanih učinaka glukokortikosteroida tijekom terapije, odnosno pronalazak optimalnih biljega kojima bi se mogli pratiti učinci glukokortikosteroida. Općenito, učinak primjene glukokortikosteroida na koštane biljege manifestira se kao smanjenje koncentracije biljega koštane izgradnje (to se posebno odnosi na serumske koncentracije osteokalcina), te postoji trend povećanja, ili čak prolazi bez promjene koncentracije biljega koštane razgradnje. Nedosljednost utjecaja na biljege koštane razgradnje može se povezati s krivo izabranim vremenom u kojem su vršena mjerenja koncentracije u serumu (Minisola i sur., 2008). S druge strane, još uvijek nije potpuno poznato djeluju li glukokortikosteroidi na osteoklaste *in vivo* direktno kako bi produžili njihov životni vijek i pridonosi li to bržem gubitku koštane mase. Neka istraživanja su pokazala da glukokortikosteroidi produžuju životni vijek osteoklasta unatoč smanjenju broja prekursora osteoklasta. Štoviše, pokazalo se da glukokortikosteroidi direktno utječu na osteoklaste izazivajući rani gubitak koštane mase (Jia i sur., 2006).

Potreba za pronalaženjem što specifičnijih serumskih koštanih biljega javlja se iz razloga što oni osiguravaju puno ranije informacije o promjenama u organizmu, kao i o samom mehanizmu promjene. Koštani biljezi imaju višestruku funkciju: osim za otkrivanje osteoporoze i osteopenije, mogu se koristiti za predviđanje brzine propadanja koštanog tkiva, te za praćenje terapije (Eastell i Hannon, 2008). Nedavno se počela pridodavati veća pažnja

otkrivanju novih, specifičnijih serumskih biljega. Između ostalih, izrazito osjetljivi i specifični biljezi izgradnje kosti su osteokalcin i koštani izoenzim alkalne fosfataze, dok se kao biljezi koštane razgradnje koriste kisela fosfataza i tartarat rezistentna kisela fosfataza (TRAP/TRACP) kao specifični enzim osteoklasta (Garnero, 2008). Dvije izoforme TRACP enzima cirkuliraju u krvi, poznate kao TRACP5a, koja proizlazi iz makrofaga, i TRACP5b, koju izlučuju osteoklasti (Hallen i sur., 2003). Osteoklasti luče TRACP5b u krvotok kao aktivni enzim koji se inaktivira i razgrađuje prije nego se odstrani iz cirkulacije. Štoviše, neke studije su pokazale da izlučeni TRACP5b ukazuje na broj osteoklasta, a ne na njihovu aktivnost (Alatalo i sur., 2000).

S obzirom da, kako je već spomenuto, još uvijek nije potpuno poznato djeluju li glukokortikosteroidi na osteoklaste, osteoblaste ili pak na obje vrste koštanih stanica, kao i sami njihov mehanizam djelovanja, opsežnija istraživanja na ovom području znatno bi doprinijela boljem razumijevanju metaboličkih i koštanih učinaka glukokortikosteroida, mehanizma djelovanja, kao i eventualne promjene terapijskih pristupa (Pennisi, 2005) pri liječenju raznih upalnih bolesti, između ostalih i astme.

Pristup ovom istraživanju temelji se na uspostavi modela hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima u mladih štakora s promjenama u krvi i u kostima opisanim u literaturi. Neka dosadašnja istraživanja su pokazala da se biokemijska analiza koštanih biljega u serumu, histomorfometrija i denzitometrija koje se koriste kod ljudi mogu primjenjivati i na štakorima (Weinsiein i sur., 1998; Mangolas i Weinsiein, 1999; Jee i Yao, 2001) i na miševima. Oni su pokazali da mišji model može biti pouzdani životinjski model osteopenije izazvane glukokortikosteroidima i da oponaša promjene viđene u ljudi (Jee i Yao, 2001).

S obzirom da se osteopenija dokazuje denzitometrijom a u ovom istraživanju se histološkom procjenom, prema Belvisi i sur. (2001), pratila debljina ploče rasta glave femura, ne možemo reći da je uspostavljen model osteopenije nego govorimo o uspostavi modela hipoplazije fize. Vrlo je vjerojatno da je primjenom glukokortikosteroida uspješno izazvana osteopenija u mladih štakora ali da bi se to i dokazalo potrebno je napraviti dodatna istraživanja koja će kao metodu procjene oštećenja kosti koristiti denzitometriju.

U ovom radu, ranije opisana metodologija (Belvisi i sur., 2001), prilagođena je novom *in vivo* modelu kako bi se olakšala primjena supstanci životinjama, a da se ipak dobije željeni sistemski učinak. Najprije je napravljen jedan uvodni pokus (rezultati nisu pokazani) u kojem su supstance primjenjivane p.o. prema literaturi (Belvisi i sur., 2001) i s.c. kako bi se vidjelo može li se dobiti isti sistemski učinak. Na osnovu dobivenih rezultata odlučeno je da će se sve supstance aplicirati s.c. jer je na taj način sigurnije da je supstanca primjenjena u potpunosti. Odabrani su štakori starosti 4,5 – 5,5 tjedana na početku pokusa, budući da ta dob štakora odgovara dječjoj dobi u ljudi (Sengupta, 2013).

Nakon što je u prvoj fazi ovog istraživanja uspostavljen model hipoplazije fize, u drugoj fazi se pristupilo optimizaciji modela, odnosno proširena je paleta biljega koji pokazuju utjecaj glukokortikosteroida na metabolizam lipida te na biljege koštane izgradnje i razgradnje.

Ispitivanje opetovane primjene beklometazon dipropionata, prednizolona i ciklezonida u mladih štakora pokazalo je jasnu razliku između sposobnosti sustavno davanih glukokortikosteroida da utječu na metabolizam i rast kosti u odnosu na ostale metaboličke učinke. Dok su sva tri ispitivana glukokortikosteroida pokazala gotovo usporedive suzbijajuće učinke na indeks tjelesne mase timusa, sve ostale mjerene varijable su različito promijenjene pod utjecajem primjenjenih glukokortikosteroida, i to redoslijedom: ciklezonid > prednizolon > beklometazon dipropionat, s iznimkom alkalne fosfataze, koja je ostala nepromijenjena pod utjecajem sve tri supstance u testiranim dozama.

Pomanjkanje paralelizma u promjenama uzrokvanim trima ispitivanim glukokortikosteroidima na indeks tjelesne mase timusa u odnosu na tjelesnu masu, glukozu i trigliceride ne mora nužno odražavati razlike u receptorima–posredovanom mehanizmu glukokortikosteroida u različitim tkivima. Imajući na umu važnost jetre za metaboličke promjene u koncentraciji glukoze, lipida i steroida, lokalne farmakokinetičke razlike, uzrokovane subkutanim putem primjene, mogu barem djelomično biti odgovorne za promjene uzrokovane u tkivima. Indeks tjelesne mase timusa izravan je pokazatelj sposobnosti glukokortikosteroida za transaktivaciju, s obzirom da je aktivacija gena posredovana glukokortikosteroidima apsolutan uvjet za apoptozu timocita (Herold, McPherson i Reichardt,

2006). Iako je transaktivacija vjerojatno bila uključena u metabolički odgovor, stimulacija interakcije glukokortikosteroidnih receptora s različitim nizvodnim transkripcijskim faktorima u timocitima i hepatocitima mogla je doprinijeti opaženim varijacijama u osjetljivosti tkiva na glukokortikosteroide (Herold, McPherson i Reichardt, 2006; De Martino i sur., 2004).

Sljedeće značajno otkriće je da ciklezonid, unatoč tomu što je prekursorski lijek, ima potentne sustavne učinke u usporedbi s ostalim kortikosteroidima, kada se daje subkutano. Aktivni metabolit ciklezonida, desizobutiril – ciklezonid, ima sličnu relativnu sposobnost vezivanja za glukokortikosteroidni receptor kao i aktivni metabolit beklometazon dipropionata (Seeto i sur., 2000), s time da je ta sposobnost vezivanja visoka u usporedbi s ostalim glukokortikosteroidima (Derendorf, 2007; Derendorf i sur., 2006). To bi pomoglo u pojašnjavanju izraženih učinaka koji su uočeni kod subkutane primjene ciklezonida. S druge strane, kada se primjenjuje inhalacijskim putem kod asmatičnih pacijenata, čestice ciklezonida dolaze puno učinkovitije do pluća, za razliku od beklometazon dipropionata, koji se oslobađa u značajnijim količinama u orofaringsu, dovodeći tako do sustavne distribucije (Derendorf i sur., 2006). Kod asmatičnih pacijenata ciklezonid stoga ima manje sustavnih štetnih utjecaja. Relativno niska potentnost subkutano primjenjenog beklometazon dipropionata za uzrokovanje metaboličkih promjena u ovoj studiji može biti povezana s njegovom velikom brzinom metaboliziranja nakon sustavne primjene u mladih štakora (Chanoine i sur., 1991).

Ovi farmakodinamički i kinetički faktori moraju se uzeti u obzir kada se zna da su samo dva od testiranih glukokortikosteroida, prednisolon i ciklezonid, a ne beklometazon dipropionat, imali značajan utjecaj na metabolizam i rast kosti u dozama davanim subkutano. U jedinoj drugoj studiji sa štakorima s kojom smo bili upoznati, u kojoj je sedam različitih glukokortikosteroida davanih preko kože bilo ispitivano na sustavnu toksičnost (ispitivala se tjelesna masa, masa nadbubrežnih žlijezda, limfni čvorovi i koža) beklometazon dipropionat je također bio najmanje toksičan (Shimo i sur., 1982).

Prijašnje su studije, temeljene uglavnom na histologiji, pokazale da, kod glodavaca glukokortikosteroidi imaju izražajniji učinak na izgradnju nego na razgradnju kostiju (Miller,

Bowman i Jee, 1995; McClaughlin i sur., 2002). Međutim, u ovoj studiji serumska alkalna fosfataza (ALP), često korišteni nespecifični biljeg aktivnosti osteoblasta (Eastell i Hannon, 2008), nije bio pod utjecajem niti jednog od ispitivanih glukokortikosteroida, dok su serumske koncentracije ACP i TRACP, biljezi koji odražavaju aktivnost osteoklasta (Eastell i Hannon, 2008) bile značajno inhibirane primjenom prednizolona i ciklezonida. Ovi podaci ukazuju na to da je razlika između učinaka tri ispitivana glukokortikosteroida na kost mogla također uključivati različitu osjetljivost osteoklasta na kortikosteroide.

Možemo reći da ciklezonid, iako prekursorski lijek, još uvijek pokazuje potentnu sustavnu aktivnost kod štakora, uzrokujući tipične glukokortikosteroidne učinke, uključujući inhibiciju rasta kosti. Prednisolon pokazuje sličan, iako manje potentan, raspon sustavne aktivnosti dok beklometazon dipropionat pokazuje slabu aktivnost u uzrokovanju sustavnih metaboličkih učinaka, ipak zadržavajući sposobnost inhibicije timusa. Razlika između učinaka glukokortikosteroida na rast i razvoj kosti može biti povezana s različitom osjetljivošću osteoklasta na tri ispitivana kortikosteroida.

U preliminarnim pokusima ovog rada bavili smo se uspostavljanjem modela hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima u kojem smo pratili metaboličke i koštane učinke tri različita glukokortikosteroida u 4 različite doze (0,3, 1, 3 i 10 mg/kg/danu). Histopatološka analiza koja je pokazala smanjenje debljine proliferativne zone glave femura bila je pokazatelj izazvane hipoplazije. Dobiveni rezultati su pokazali da beklometazon dipropionat nije statistički značajno utjecao niti na koncentraciju glukoze i triglicerida u serumu mladih štakora, niti na koncentraciju TRACP kao specifičnog biljega osteoklasta ni u jednoj od navedenih doza. Štoviše, beklometazon dipropionat nije uzrokovao značajno smanjenje debljine proliferativne zone glave femura, pa tako ne možemo tvrditi da je uopće došlo do razvoja hipoplazije pod utjecajem ovog glukokortikosteroida. Stoga smo u nastavnom istraživanju ovog rada, kako bi pronašli najbolje metaboličke i koštane biljege učinaka glukokortikosteroida, odlučili životinje tretirati samo s druga dva glukokortikosteroida, prednizolonom i ciklezonidom. Također smo, s obzirom da kod primjene najniže doze glukokortikosteroida (0,3 mg/kg/danu) nije bilo značajnih učinaka na metaboličke i koštane biljege, odlučili izbaciti tu dozu.

Dobiveni rezultati jasno su potvrdili rezultate dobivene u preliminarnim pokusima. Oba ispitivana glukokortikosteroida su pokazala utjecaj na metabolizam ugljikohidrata značajno povisivši koncentraciju glukoze u serumu, u najvišoj dozi. Što se tiče utjecaja na metabolizam lipida, rezultati su nedosljedni. Prednizolon je značajno povisio koncentraciju triglicerida, a ciklezonid koncentraciju HDL-kolesterola u najvišim dozama, dok nisu pokazali nikakav učinak na koncentracije kolesterola i LDL-kolesterola u serumu. To bi se moglo objasniti činjenicom da nema jednoznačnog djelovanja kortikosteroida na metabolizam lipida (Juretić, 2004). Štoviše, postoje i navodi u literaturi koji govore o nedosljednosti učinka glukokortikosteroida na metabolizam lipida (Macfarlane, Forbes i Walker, 2008).

Iz literature je poznato da glukokortikosteroidi imaju izražen učinak na izgradnju kostiju (Miller, Bowman i Jee, 1995; McClaughlin i sur., 2002). Kao i u preliminarnim pokusima, i u nastavnom istraživanju ovog rada, serumska alkalna fosfataza nije bila pod utjecajem ispitivanih glukokortikosteroida, te se nije pokazala kao pouzdan biljeg aktivnosti osteoblasta. Iako alkalna fosfataza može poslužiti kao biljeg u praćenju metabolizma kostiju (Coss i sur., 2000) ona ipak nije specifičan i dovoljno pouzdan pokazatelj aktivnosti osteoblasta u mladih štakora. S druge strane, koncentracija osteokalcina, kao specifičnog biljega koštane izgradnje, značajno je smanjena pod utjecajem ciklezonida, što ukazuje na smanjenu funkciju osteoblasta koja je potvrđena i u literaturi (Eastell i sur., 2010). Iz toga se može zaključiti da je osteokalcin puno bolji pokazatelj smanjene funkcije, odnosno aktivnosti osteoblasta.

Suprotno nekim istraživanjima koja govore da glukokortikosteroidi uzrokuju povećanje aktivnosti osteoklasta (Minisola i sur., 2008), rezultati dobiveni u ovoj studiji su pokazali da glukokortikosteroidi znatno smanjuju koncentraciju ACP, TRACP i TRACP 5b izoforme, kao biljega osteoklasta (Eastell i Hannon, 2008) odražavajući time smanjenu aktivnost osteoklasta. Neka istraživanja su, sukladno tome, pokazala da glukokortikosteroidi direktno utječu na osteoklaste izazivajući rani gubitak koštane mase (Jia i sur., 2006). Rezultati dobiveni u našem istraživanju pokazali su da je prednizolon u potpunosti utjecao na osteoklaste značajno smanjivši koncentracije svih biljega osteoklasta (ACP, TRACP i TRACP 5b izoforma) u najvišoj dozi, 10 mg/kg/danu.

Iako su se sva tri određivana biljega pokazala kao dobri pokazatelji učinka glukokortikosteroida na aktivnost osteoklasta, ostaje pitanje djeluju li glukokortikosteroidi tako da smanjuju životni vijek osteoklasta ili uzrokuju smanjenje broja prekursora osteoklasta.

U svrhu dokazivanja ovih pretpostavki i boljeg razumijevanja učinka glukokortikosteroida na metabolizam i rast i razvoj kostiju potrebno je izvršiti još pokusa. No, u ovom radu je uspješno uspostavljen model hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima što je i bio jedan od ciljeva. Razvijeni model je jednostavan i reproducibilan, a mali broj životinja potreban u pokusu čini ga prihvatljivim s obzirom na postavke znanosti o dobrobiti laboratorijskih životinja. Koncentracija glukoze u serumu se pokazala kao dobar biljeg učinka glukokortikosteroida na metabolizam ugljikohidrata, dok se koncentracija triglicerida pokazala kao najbolji pokazatelj učinka na metabolizam lipida. Što se tiče učinka glukokortikosteroida na koštane biljege, osteokalcin se jedini pokazao kao dobar pokazatelj aktivnosti osteoblasta, dok bi sva tri biljega, ACP, TRACP i TRACP 5b, mogla biti dobri pokazatelji aktivnosti osteoklasta.

6. ZAKLJUČCI

1. Uspostavljen je model hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima u mladih štakora soja Sprague-Dawley, starih 4,5 – 5,5 tjedana na početku pokusa izazvan subkutanom primjenom kortikosteroida kroz 7 dana.

2. Model je pogodan za ispitivanje djelovanja glukokortikosteroida. Jednostavan je i reproducibilan, a mali broj životinja potreban u pokusu čini ga prihvatljivim s obzirom na postavke znanosti o dobrobiti laboratorijskih životinja.

3. Ciklezonid, usprkos tome što je prekursorski lijek, pokazuje potentnu sustavnu aktivnost kod štakora u usporedbi s ostalim kortikosteroidima, kada se daje subkutano, uzrokujući tipične glukokortikosteroidne učinke, uključujući inhibiciju rasta kosti.

4. Prednizolon pokazuje raspon sustavne aktivnosti sličan ciklezonidu, iako manje potentan, dok beklometazon pokazuje slabu aktivnost u uzrokovanju sustavnih metaboličkih učinaka, ipak zadržavajući sposobnost inhibicije timusa.

5. Učinak glukokortikosteroida na rast i razvoj kosti u mladih štakora moguće je pratiti mjerenjem debljine proliferativne zone glave femura.

6. Potvrđena je hipoteza da učinak glukokortikosteroida na kost i metabolizam ovisi o vrsti i dozi primjenjenog glukokortikosteroida.

7. Glukokortikosteroidi smanjuju prirast tjelesne mase, te mijenjaju metabolizam glukoze i lipida u mladih štakora. Koncentracija glukoze je dobar pokazatelj učinka glukokortikosteroida na metabolizam ugljikohidrata, dok je koncentracija triglicerida bolji pokazatelj od kolesterola za procjenu učinka glukokortikosteroida na metabolizam lipida.

8. Učinak glukokortikosteroida na metabolizam koštanog tkiva može se pratiti određivanjem biokemijskih biljega koštane pregradnje u krvi životinja. Osteokalcin je pokazatelj aktivnosti osteoblasta za razliku od alkalne fosfataze kojom se ne mogu

pratiti promjene u koštanoj izgradnji. Kisela fosfataza, tartarat rezistentna kisela fosfataza i njezina 5b izoforma pokazatelji su aktivnosti osteoklasta te mogu poslužiti za procjenu intenziteta koštane razgradnje.

7. LITERATURA

Alatalo, S.L.; Penq, Z.; Janckila, A.J.; Kaija, H.; Vihko, P.; Väänänen, H.K.; Hallen, J.M. (2000) A novel immunoassay for the determination of tartarate-resistant acid phosphatase 5b from rat serum. *Journal of Bone and Mineral Research,* 15, str. 1337-1345.

Allen, D.B. (2002) Inhaled Corticosteroid Therapy for Asthma in Preschool Children: Growth Issues. *Pediatrics,* 109 (2), str. 373-380.

Alonso-Coello, P.; Garcia-Franco, A.; Guyatt, G.; Moynihan, R. (2008) Drugs for pre-osteoporosis: prevention or disease mongering? *British Medical Journal*, 336 (7636), str. 126-129.

Angel, N.Z.; Walsh, N.; Forwood, M.R.; Ostrowski, M.C.; Cassady, A.I.; Hume, D,A. (2000) Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover. *Journal of Bone and Mineral Research,* 15 (1), str. 103–110.

Bagdade, J.D.; Yee, E.; Albers, J.; Pykalisto, O.J. (1976) Glucocorticoids and triglyceride transport: Effects on triglyceride secretion rates, lipoprotein lipase, and plasma lipoproteins in the rat. *Metabolism,* 25 (5), str. 533-542.

Baumbach, G.A.; Saunders, P.T.; Ketcham, C.M.; Bazer, F.W.; Roberts, R.M. (1991) Uteroferrin contains complex and high mannose-type oligosaccharides when synthesized in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 105 (2), str. 107–117.

Beck-Nielsen, H.; Alford, F.; Hother-Nielsen, O. (2005) Insulin resistance in glucose disposal and production in man specifi c references to metabolic syndrome and type 2 diabetes. U: Kumar, S. i O´Rahilly, S. (ur.). *Insulin Resistance*. John Wiley and Sons, Ltd., str. 155-178.

Belvisi, M.G.; Bundschuh, D.S.; Stoeck, M.; Wicks, S.; Underwood, S.; Battram, C.H.; Haddad, el-B.; Webber, S.E.; Foster, M.L. (2005) Preclinical profile of ciclesonide, a novel corticosteroid for the treatment of asthma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 314, str. 568-574.

Belvisi, M.G.; Wicks, S.L.; Battram, C.H.; Bottoms, S.E.; Redford, J.E.; Woodman, P.; Brown, T.J.; Webber, S.E.; Foster, M.L. (2001) Therapeutic benefit of a dissociated glucocorticoid and the relevance of in vitro separation of transrepression from transactivation activity. *Journal of Immunology*, 166 (3), str. 1975-1982.

Benson, M.; Fixen, J.; Macnicol, M.; Parsch, K. i sur. (2010) *Children's orthopaedics and Fractures.* 2. izd. London: Springer.

Brotman, D.J.; Girod, J.P.; Garcia, M.J. i sur. (2005) Eects of short-term glucocorticoids on cardiovascular biomarkers. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90 (6), str. 3202-3208.

Buehring, B.; Viswanathan, R.; Binkley, N.; Busse, W. (2013) Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update on effects and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132 (5), str. 1019-1030.

Burstone, M.S. (1959) Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 7 (1), str. 39–41.

Canalis, E. i Delany, A.M. (2002) Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966, str. 73-81.

Chanoine, F.; Grenot, C.; Heidmann, P.; Junien, J.L. (1991) Pharmacokinetics of butixocort 21-propionate, budesonide, and beclomethasone dipropionate in the rat after intratracheal, intravenous, and oral treatments. *Drug Metabolism and Disposition*, 19, str. 546-553.

Chciałowski, A. i Płusa, T. (2004) Ciclesonid - new generation of inhaled glucocorticosteroid. *Wiadomosci Lekarskie*, 57 (1-2), str. 70-73.

Christensson, C.; Thorén, A. i Lindberg, B. (2008) Safety of inhaled budesonide: clinical manifestations of systemic corticosteroid-related adverse effects. *Drug Safety*, 31, str. 965-988.

Coss, D.; Yang, L.; Benson Kuo, C.; Xu, X.; Luben, R.A.; Walker, A.M. (2000) Effects of prolactin on osteoblast alkaline phosphatise and bone formation in the developing rat. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 279, str. E1216–E1225.

Crowley, P. (2003) Prophylactic corticosteroids for preterm delivery (Cochrane review). U: *The Cochrane library.* 3. izd. Oxford: Update Software.

Cundy, T.; Reid, I.R. i Grey, A. (2008) Metabolic bone disease. U: Marshall, J.W. i Bangert, S. *Clinical Biochemistry. Metabolic and Clinical Aspects.* 2. izd. London, New York, Oxford: Churchill Livingstone, Elsevier Edinburgh.

Čepelak, I. i Čvorišćec, D. (2009) Biokemijski biljezi pregradnje kostiju. *Biochemia Medica,* 19 (1), str.17-35.

Ćurković, B. (2007) Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 58, str. 19-24.

Daley, C.A.; Abbott, A.; Doyle, P.; Nader, G.; Larson, S. (2004) *A literature review of the value-added nutrients found in grass-fed beef products*. California State University, Chico, College of Agriculture.

De Martino, M.U.; Alesci, S.; Chrousos, G.P.; Kino, T. (2004) Interaction of the glucocorticoid receptor and the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII): implications for the actions of glucocorticoids on glucose, lipoprotein, and xenobiotic metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024, str. 72-85.

Derendorf, H. (2007) Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of inhaled ciclesonide. *Journal of Clinical Pharmacology*, 47, str. 782-789.

Derendorf, H.; Nave, R.; Drollmann, A.; Cerasoli, F.; Wurst, W. (2006) Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids to asthma. *European Respiratory Journal*, 28, str. 1042-1050.

Derrickson, B.H. i Tortora, G.J. (2005) *Principles of anatomy and physiology*. New York: Wiley.

D'ippolito, G.; Schiller, P.C.; Ricordi, C.; Roos, B.A.; Howard, G.A. (1999) Age-Related Osteogenic Potential of Mesenchymal Stromal Stem Cells from Human Vertebral Bone Marrow. *Journal of Bone and Mineral Research,* 14 (7), str. 1115–1122.

Eastell, R.; Chen, P.; Saag, K.G.; Burshell, A.L.; Wong, M.; Warner, M.R.; Krege, J.H. (2010) Bone formation markers in patients with glucocorticoid-induced osteoporosis treated with teriparatide or alendronate. *Bone,* 46 (4), str. 929-934.

Eastell, R. i Hannon, R.A. (2008) Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *Proceedings of the Nutrition Society*, 67 (2), str. 157-162.

Ehrlich, P.J. i Lanyon, L.E. (2002) Mechanical Strain and Bone Cell Function: A Review. *Osteoporosis International,* 13 (9), str. 688–700.

Fiel, S.B. i Vincken, W. (2006) Systemic corticosteroid therapy for acute asthma exacerbations. *Journal of Asthma*, 43 (5), str. 321–331.

Garcia-Marcos, L.; Ros-Lucas, J.A. i Sanchez-Solis, M. (2008) Inhaled corticosteroids in asthmatic children: are they as safe in infants and preschoolers as in older children? A review. *Current Drug Safety*, 3, str. 35-45.

Garen, A. i Levinthal, C. (1960) A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of E. coli. I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 38, str. 470–483.

Garnero, P. (2008) Biomarkers for osteoporosis management: utility in diagnosis, fracture risk prediction and therapy monitoring. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 12 (3), str. 157-170.

Garnero, P.; Buchs, N.; Zekri, J.; Rizzoli, R.; Coleman, R.E.; Delmas, P.D. (2000) Markers of bone turnover for the managament of patients with bone metastases from prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 82, str. 858-864.

Gentile, D.A. i Skoner, D.P. (2010) New asthma drugs: small molecule inhaled corticosteroids. *Current Opinion in Pharmacology*, 10 (3), str. 260-265.

Gerich, J.E.; Meyer, C.; Woerle, H.J.; Stumvoll, M. (2001) Renal gluconeogenesis: its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care,* 24, str. 382-391.

Goto, K.; Chiba, Y.; Sakai, H.; Misawa, M. (2010) Mechanism of inhibitory effect of prednisolone on RhoA upregulation in human bronchial smooth muscle cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33 (4), str. 710-713.

Halleen, J.M.; Alatalo, S.L.; Suominen, H.; Cheng, S.; Janckila, A.J.; Väänänen, H.K. (2003) Tartarate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18, str. 134-139.

Halleen, J.M.; Tiitinen, S.L.; Ylipahkala, H.; Fagerlund, K.M.; Väänänen, H.K. (2006) Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clinicl Laboratory*, 52 (9-10), str. 499-509.

Hayman, A.R.; Jones, S.J.; Boyde, A.; Foster, D.; Colledge, W.H.; Carlton, M.B.; Evans, M.J.; Cox, T.M. (1996) Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development,* 122 (10), str. 3151–3162.

Henneicke, H.; Gasparini, S.J.; Brennan-Speranza, T.C.; Zhou, H.; Seibel, M.J. (2014) Glucocorticoids and bone: local effects and systemic implications. *Trends in Endocrinology & Metabolism,* 25 (4), str. 197-211.

Herold, M.J.; McPherson, K.G. i Reichardt, H.M. (2006) Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, str. 60-72.

Hong, D.; Chen, H.X.; Ge, R.S.; Li, J.C. (2008) The biological roles of extracellular and intracytoplasmic glucocorticoids in skeletal cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 111, str. 164-170.

Hrvačić, B.; Šitum, K.; Đurić, K.; Bošnjak, B.; Ferenčić, Ž.; Brajša, K.; Marković, S.; Glojnarić, I. (2015) Relative potencies of three glucocorticoids to induce hypoplasia of the physis and concomitant biochemical alterations in the rat. *Drug and Chemical Toxicology*, 38 (3), str. 272-277.

Janckil, A.J.; Takahashi, K.; Sun, S.Z.; Yam, L.T. (2001) Tartarate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clinical Chemistry*, 47 (1), str. 74-80.

Jee, W.S. i Yao, W. (2001) Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *Journal of Musculoskeletal and Neuronalal Interactions*, 1 (3), str. 193-207.

Jia, D.; O'Brien, C.A.; Stewart, S.A.; Manolagas, S.C.; Weinstein, R.S. (2006) Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density. *Endocrinology,* 147 (12), str. 5592-5599.

Juretić, E. (2004) Suvremene dvojbe oko kortikosteroidne terapije u perinatologiji: Novije spoznaje o adrenokortikalnoj funkciji u novorođenčadi. *Pediatria Croatica,* 48, str. 4.

Kim, H.J.; Zhao, H.; Kitaura, H.; Bhattacharyya, S.; Brewer, J.A.; Muglia, L.J.; Patrick Ross, F.; Teitelbaum, S.L. (2007) Glucocorticoid and the osteoclast. *Annals of the New York Academy of Sciences,* 1116, str. 335-339.

Kim, K.W.; Roh, J.K.; Wee, H.J.; Kim, C. (2016) *Cancer Drug Discovery: Science and History*. Dordrecht: Springer.

Kohrt, W.M.; Bloomfield, S.A.; Little, K.D.; Nelson, M.E.; Yingling, V.R. (2004) American College of Sports Medicine Position Stand: physical activity and bone health. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 36 (11), str. 1985-1996.

Korenblat, P.E. (2010) Ciclesonide and the treatment of asthma. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 11, str. 463-479.

Leah, E. (2009) *Cholesterol*. Lipidomics Gateway.

Lee, A.J.; Hodges, S. i Eastell, R. (2000) Measurement of osteocalcin. *Annals of Clinical Biochemistry,* 37, str. 432-446.

Lee, N.K.; Sowa, H.; Hinoi, E.; Ferron, M.; Ahn, J.D.; Confavreux, C.; Dacquin, R.; Mee, P.J.; McKee, M.D.; Jung, D.Y.; Zhang, Z.; Kim, J.K.; Mauvais-Jarvis, F.; Ducy, P.; Karsenty, G. (2007) Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell,* 130 (3), str. 456–469.

Lee, S.H. (2015) Mechanisms of Glucocorticoid Action in Chronic Rhinosinusitis. *Allergy, Asthma & Immunology Research,* 7 (6), str. 534–537.

Looker, A.C.; Bauer, D.C.; Chesnut, C.H. 3rd; Gundberg, C.M.; Hochberg, M.C.; Klee, G. i sur. (2000) Clinical use of biochemical markers of bone remodeling: current status and future directions. *Osteoporosis Intertnational,* 11, str. 467-480.

Ljusberg, J.; Ek-Rylander, B. i Andersson, G. (1999) Tartrate-resistant purple acid phosphatase is synthesized as a latent proenzyme and activated by cysteine proteinases. *Biochemical Journal*, 343 (1), str. 63–69.

Ljusberg, J.; Wang, Y.; Lång, P.; Norgård, M.; Dodds, R.; Hultenby, K.; Ek-Rylander, B.; Andersson, G. (2005) Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (31), str. 28370–28381.

Macfarlane, D.P.; Forbes, S. i Walker, B.R. (2008) Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *Journal of endocrinology,* 197, str. 189–204.

Manolagas, S.C. i Weinstein, R.S. (1999) New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14 (7), str. 1061-1066.

Maxam, A.M. i Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods in Enzymology*, 65 (1), str. 499–560.

McLaughlin, F.; Mackintosh, J..; Hayes, B.P.; McLaren, A.; Uings, I.J.; Salmon, P.; Humphreys, J.; Meldrum, E.; Farrow, S.N. (2002) Glucocorticoid-induced osteopenia in the mouse as assessed by histomorphometry, microcomputed tomography, and biochemical markers. *Bone,* 30 (6), str. 924-930.

McMaster, A. i Ray, D.W. (2007) Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects. *Experimental Physiology*, 92, str. 299-309.

McPherson, E.M. (2007) *Pharmaceutical Manufacturing Encyclopedia*. 3. izd. Burlington: Elsevier.

Metelko, Ž. i Crkvenčić, N. (2004) Sindrom metaboličke inzulinske rezistencije i metabolizam ugljikohidrata. *Medicus,* 13 (2), str. 41-49.

Miller, S.C.; Bowman, B.M. i Jee, W.S.S. (1995) Available animal models of osteopenia – small and large. *Bone,* 17, str. 117S-123S.

Minisola, S.; Del Fiacco, R.; Piemonte, S.; Iorio, M.; Mascia, M.L.; Fidanza, F.; Cipriani, C.; Raso, I.; Porfiri, M.L.; Francucci, C.M.; D'Erasmo, E.; Romagnoli, E. (2008) Biochemical markers in glucocorticoid-induced osteoporosis. *Journal of Endocrinological Investigation*, 31 (7), str. 28-32.

Moller, N.; Rizza, R.A.; Ford, G.C.; Nair, K.S. (2001) Assessment of postabsorptive renal glucose metabolism in humans with multiple glucose tracers. *Diabetes,* 20, str. 747-751.

Mukker, J.K.; Singh, R.S. i Derendorf, H. (2016) Ciclesonide: A Pro-Soft Drug Approach for Mitigation of Side Effects of Inhaled Corticosteroids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105 (9), str. 2509-2514.

Nanjee, M.N. i Miller, N.E. (1989) Plasma lipoproteins and adrenocortical hormones in men – positive association of low density lipoprotein cholesterol with plasma cortisol concentration. *Clinica Chimica Acta*, 180 (2), str. 113-120.

Netter, F.H. (1987) *Musculoskeletal system: anatomy, physiology, and metabolic disorders*. Summit, New Jersey: Ciba-Geigy Corporation.

O'Regan, D.; Welberg, L.L.; Holmes, M.C.; Seckl, J.R. (2001) Glucocorticoid programming of pituitary - adrenal function: mechanisms and physiologic consequences. *Seminars in Neonatology*, 6, str. 319-329.

O'Shea, T.M. i Doyle, L.W. (2001) Perinatal glucocorticoid therapy and neurodevelopmental outcome: an epidemiologic perspective. *Seminars in Neonatology,* 6, str. 293-307.

Peckett, A.J.; Wright, D.C. i Riddell, M.C. (2011) The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*, 60 (11), str. 1500-1510.

Pennisi, P.; D'Alcamo, M.A.; Leonetti, C.; Clementi, A.; Cutuli, V.M.; Riccobene, S.; Parisi, N.; Fiore, C.E. (2005) Supplementation of L-arginine prevents glucocorticoid-induced reduction of bone growth and bone turnover abnormalities in a growing rat model. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 23 (2), str. 134-139.

Peter, J.; Nijweidi, E.H.B. i Feyen, J.H.M. (1986) Cells of Bone: Proliferation, Differentiation, and Hormonal Regulation. *Physiological Reviews,* 66 (4), str. 855-886.

Puchacz, E.; Lian, J.B.; Stein, G.S.; Wozney, J.; Huebner, K.; Croce, C. (1989) Chromosomal localization of the human osteocalcin gene. *Endocrinology,* 124 (5), str. 2648–2650.

Reaven, E.P.; Kolterman, O.G. i Reaven, G.M. (1974) Ultrastructural and physiological evidence for corticosteroid-induced alterations in hepatic production of very low density lipoprotein particles. *Journal of Lipid Research*, 15 (1), str. 74-83.

Reid, I.R. (1997) Glucocorticoid osteoporosis - mechanisms and management. *European Journal of Endocrinology*, 137 (3), str. 209-217.

Rhodes, C.; Stryer, L. i Tasker, R. (1995) *Biochemistry.* 4. izd. San Francisco: W.H. Freeman.

Rosen, C.J. (2005) Clinical practice. Postmenopausal osteoporosis. *The New England Journal of Medicine,* 353 (6), str. 595–603.

Ross, I.L. i Marais, A.D. (2014) The influence of glucocorticoids on lipid and lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *South African Medical Journal*, 104 (10), str. 671-674.

Salentijn, L. (2007) *Biology of Mineralized Tissues: Cartilage and Bone*. Columbia University College of Dental Medicine post-graduate dental lecture series.

Seeto, C.; Namkung-Matthai, H.; Jayrams, S.; Foe, K.; Brown, K.F.; Hughes, J.M.; Mason, R.S.; Armour, C.L.; Seale, J.P. (2000) Differential potency of beclomethasone esters in-vitro on human T-lymphocyte cytokine production and osteoblast activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52 (4), str. 417-423.

Sengupta, P. (2013) The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4 (6), str. 624–630.

Shimo, T.; Takahara, Y.; Noguchi, Y.; Mukawa, A.; Kato, H.; Ito, Y. (1982) Comparative toxicity test of dexamethasone valerate (DV-17) and other steroid ointments in rats [na japanskom]. *Journal of Toxicological Sciences,* 7 (1), str. 15-33.

Skoner, D.P. (2016) Inhaled corticosteroids: Effects on growth and bone health. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 117 (6), str. 595-600.

Staels, B.; van Tol, A.; Chan, L.; Verhoeven, G.; Auwerx, J. (1991) Variable effects of different corticosteroids on plasma lipids, apolipoproteins, and hepatic apolipoprotein mRNA levels in rats. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology,* 11 (3), str. 760-769.

Tamás, L.; Huttová, J.; Mistrk, I.; Kogan, G. (2002) Effect of Carboxymethyl Chitin-Glucan on the Activity of Some Hydrolytic Enzymes in Maize Plants. *Chemical Papers*, 56 (5), str. 326–329.

Tauchmanovà, L.; Rossi, R.; Nuzzo, V.; del Puente1, A.; Esposito-del Puente, A.; Pizzi, C.; Fonderico, F.; Lupoli, G.; Lombardi, G. (2001) Bone loss determined by quantitative ultrasonometry correlates inversely with disease activity in patients with endogenous glucocorticoid excess due to adrenal mass. *European Journal of Endocrinology,* 145, str. 241-247.

Ton, F.N.; Gunawardene, S.C.; Lee, H.; Neer, R.M. (2005) Effects of low-dose prednisone on bone metabolism. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20, str. 464–470.

Turner, P.V.; Brabb, T.; Pekow, C.; Vasbinder, M.A. (2011) Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50 (5), str. 600-613.

Van Raalte, D.H.; Ouwens, D.M. i Diamant, M. (2009) Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? *European Journal of Clinical Investigation*, 39, str. 81- 93.

Vidaeff, A.C.; Doyle, N.M. i Gilstrap. L.C. III. (2003) Antenatal corticosteroids for fetal maturation in women at risk for preterm delivery. *Clinics in Perinatology*, 30, str. 825-840.

Weinstein, R.S.; Jilka, R.L.; Parfitt, A.M.; Manolagas, S.C. (1998) Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *Journal of Clinical Investigation*, 102 (2), str. 274-282.

Weiss, M.J.; Henthorn, P.S.; Lafferty, M.A.; Slaughter, C.; Raducha, M.; Harris, H. (1986) Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 83 (19), str. 7182–7186.

Weldon, D. (2009) The effects of corticosteroids on bone growth and bone density. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 103, str. 3-11.

Winter, J.S.D. (2004) Fetal and neonatal adrenocortical physiology. U: Polin, R.A.; Fox, W.W. i Abman, S.H. (ur.). *Fetal and neonatal physiology*. Philadelphia: Saunders, str. 1915-1925.

You. J.; Yellowley, C.E.; Donahue, H.J.; Zhang, Y.; Chen, Q.; Jacobs, C.R. (2000) Substrate Deformation Levels Associated With Routine Physical Activity Are Less Stimulatory to Bone Cells Relative to Loading-Induced Oscillatory Fluid Flow. *Journal of Biomechanical Engineering,* 122 (4), str. 387–394.

8. ŽIVOTOPIS

Kristina Šitum rođena je 24. rujna 1978. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu i srednju školu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, smjer Medicinske biokemije u Zagrebu upisala je 1997. godine. Diplomski rad pod nazivom nazivom "Priprava nacionalnog HBsAg standarda " izradila je na Zavodu za transfuzijsku medicinu pod stručnim vodstvom mr. sc. Ivanke Mihaljević i obranila ga 2003. godine. Dobitnica je stipendije grada Zagreba, a tijekom studija nagrađena je Dekanovom nagradom za studentski istraživački rad. Kao apsolvent je honorarno bila zaposlena na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu, kao asistent iz kolegija Biologija stanice. 2005. godine upisala je poslijediplomski doktorski studij na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu.

Od 2003. do 2006. godine bila je zaposlena u PLIVA Istraživačkom institutu u Zagrebu, kao istraživač-biokemičar, gdje je sudjelovala u brojnim pretkliničkim ispitivanjima u području toksikologije. 2006. godine zaposlena je u GlaxoSmithKline Istraživačkom centru Zagreb d.o.o., kao istraživač-biokemičar, gdje je radila do 2009. godine, kada je zaposlena u Roche Diagnostics GmbH u Zagrebu, kao prodajni predstavnik. Od 2011. do 2014. godine bila je zaposlena u KBC "Sestre milosrdnice" gdje je odradila pripravnički radni staž, a od 2014. godine do danas zaposlena je u vlastitoj tvrtci.

Tijekom svog istraživačkog rada objavila je 6 znanstvenih radova, od toga 5 u časopisima koje citira *Current contents*, te 2 kongresna posterska priopćenja.

Od ožujka 2003. do veljače 2013. godine bila je član Hrvatskog društva medicinskih biokemičara i Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.

Objavljeni znanstveni radovi:

Hrvačić B, **Šitum K**, Đurić K, Bošnjak B, Ferenčić Ž, Brajša K, Marković S, Glojnarić I. Relative potencies of three glucocorticoids to induce hypoplasia of the physis and concomitant biochemical alterations in the rat. Drug Chem Toxicol. 2015;38(3):272-7.

Bokulić A, Garaj-Vrhovac V, Brajsa K, Ethurić K, Glojnarić I, **Šitum K**. The effect of apigenin on cyclophosphamide and doxorubicin genotoxicity in vitro and in vivo. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng 2011;46(5):526-33.

Ivetić Tkalčević V, Bošnjak B, Pašalić I, Hrvačić B, **Šitum K**, Dominis-Kramarić M, Glojnarić I, Eraković Haber V. The anti-inflammatory activity of clarithromycin inhibits TNFá production and prolongs survival following lipopolysaccharide administration in mice. Int J Antimicrob Agents 2008;32(2):195-6.

Ivetić Tkalčević V, Čužić S, Brajša K, Mildner B, Bokulić A, **Šitum K**, Perović D, Glojnarić I, Parnham MJ. Enhancement by PL 14736 of granulation and collagen organization in healing wounds and the potential role of egr-1 expression. European Journal of Pharmacology. 2007;570:212-221.

Šitum K, Bokulić A, Ivetić-Tkalčević V, Parnham MJ, Čužić S, Đurić K, Glojnarić I, Ševeljević-Jaran D, Brajša K. Comparison of systemic inflammatory and hematology parameters in normal C57BI/6 and genetically diabetic db/db mice during local wound repair. Biochemia Medica 2007;17:85-93.

Ivetić Tkalčević V, Bošnjak B, Hrvačić B, Bosnar M, Marjanović N, Ferenčić Ž, **Šitum K**, Čulić O, Parnham MJ, Eraković V. Anti-inflammatory activity of azithromycin attenuates the effects of lipopolysaccharide administration in mice. Eur J Pharmacol. 2006;539(1-2):131-8.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu Disertacija
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Područje: Biomedicina i zdravstvo
Polje: Farmacija
Grana: Medicinska biokemija

UČINAK GLUKOKORTIKOSTEROIDA NA METABOLIZAM KOSTI U MLADIH ŠTAKORA

KRISTINA ŠITUM

GlaxoSmithKline Istraživački centar Zagreb d.o.o.
Prilaz baruna Filipovića 29
10000 Zagreb

SAŽETAK

Kost u djece je strukturno različita od kosti odrasle osobe. Njihova kost je slabija, ali manje krhka. Rast kosti započinje formiranjem hrskavičnog modela. Zatim žile nadiru u hrskavicu, donoseći pluripotentne matične stanice koje započinju stvaranje primarnog centra osifikacije. Sekundarni centri osifikacije se stvaraju na oba kraja dugih kosti. Između primarnih i sekundarnih centara osifikacije razvija se fiza, odnosno epifizna ploča rasta. Tijekom djetinjstva se sekundarni centri osifikacije ujedinjuju s primarnima i na taj način kost raste.

Koštano tkivo u dinamičkom je procesu neprestana trošenja i obnavljanja, pa je ravnoteža u razgradnji i stvaranju nove kosti preduvjet za zdravo koštano tkivo. Slabljenje kvalitete kosti posljedica je poremećaja ravnoteže u procesu koštane pregradnje. Pregradnja kosti odvija se u dvije faze. Prva je razgradnja (resorpcija)**,** za koju su odgovorne specijalizirane koštane stanice osteoklasti. Druga faza je izgradnja kosti pod utjecajem osteoblasta koji udubine nastale razgradnjom ispunjavaju kolagenom. Ciklus koštane pregradnje završava mineralizacijom kosti**.** Sadržaj minerala u kosti definira se kao koštana gustoća. Osteopenija je stanje u kojem je gustoća kosti smanjena**,** te se smatra pretečom osteoporoze. Osim što je osteopenija znak normalnog starenja, do nje može doći, između ostalog, i zbog dugotrajne primjene glukokortikosteroida.

Glukokortikosteroidi su protuupalni lijekovi koji se, između ostalog, koriste i za smanjenje i sprečavanje upale dišnih puteva kod astme. Budući je astma najčešća kronična bolest u djece, javlja se potreba za praćenjem metaboličkih i koštanih učinaka glukokortikosteroida tijekom terapije. Cilj ovog rada je uspostava modela hipoplazije fize izazvane glukokortikosteroidima i pronalaženje optimalnih biokemijskih biljega njihovih metaboličkih i koštanih učinaka.

Iako je poznato da inhalacijski glukokortikosteroidi imaju sustavni učinak na metabolizam kostiju, postoji malo informacija o usporedbi njihove relativne potentnosti. Stoga je istražen utjecaj tri standardna glukokortikosteroida na rast i promjenu metabolizma kosti u odnosu na ostale sustavne učinke kod štakora. Beklometazon dipropionat, prednizolon i ciklezonid, davani mladim muškim Sprague-Dawley štakorima sedam dana subkutano u dozama od 0.3 - 10 mg/kg dnevno, su ovisno o dozi inhibirali indeks tjelesne mase timusa (za 57%, 44% i 76% s 3 mg/kg). Ciklezonid i manje učinkovit prednisolon također su inhibirali rast femura (za 41% i 18% s 10 mg/kg), značajno smanjujući povećanje tjelesne mase (oboje za 100% s 10 mg/kg), te serumske koncentracije ACP i TRACP (za >30% s 10 mg/kg); oba su povećala serumske razine glukoze i triglicerida. Na serumsku ALP nije bilo utjecaja. Beklometazon dipropionat je imao malen ili nikakav učinak na ove dodatne varijable. Iako ne pokazuje jasno sustavno djelovanje na metabolizam kosti nakon inhalacije kod asmatičnih pacijenata, ciklezonid pokazuje izraženo inhibirajuće djelovanje na rast kosti kod subkutane primjene u štakora. Razlike u djelovanju u usporedbi s ostala dva glukokortikosteroida mogu se povezati s farmakokinetičkim svojstvima i utjecajem na resorpciju kosti.

(104 stranica, 30 slika, 16 tablica, 102 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta
Ključne riječi: osteopenija, beklometazon dipropionat, prednizolon, ciklezonid, serumske fosfataze
Mentori: Dr. sc. Ines Glojnarić, viša znanstvena suradnica, Fidelta d.o.o.
Dr. sc. Koraljka Đurić, znanstvena suradnica, Poliklinika Sunce
Ocjenjivači: Izv. prof. dr. sc. Nada Vrkić, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Prof. dr. sc. József Petrik, Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Dr. sc. Tihomir Balog, znanstveni savjetnik, Institut Ruđer Bošković
Rad prihvaćen dana: 20. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Domain: Biomedicine and Health
Field: Pharmacy
Branch: Medical biochemistry

Doctoral Thesis

GLUCOCORTICOSTEROID EFFECTS ON BONE METABOLISM IN YOUNG RATS

KRISTINA ŠITUM

GlaxoSmithKline Research centre Zagreb Ltd.
Prilaz baruna Filipovića 29
10000 Zagreb

ABSTRACT

Bone in children is structurally different from adult bone. It is weaker but less brittle. Bone growth starts with cartilage formation. Then vessels invade the cartilage, delivering pluripotent stem cells, which initiate the formation of a primary center of ossification. Secondary ossification centers are formed at each end of long bone, and between the primary and secondary ossification centers the growth plate, or physis, develops. Bone grows as secondary and primary ossification centers unite.

Bone tissue is in dinamic process of constant deteriorating and regeneration. Weakening of bone quality is a result of imbalance in a process of bone remodelling. Bone remodelling has two stages: bone resorption with the osteoclasts, bone cells which resorb the bone, and bone formation with osteoblasts, bone cells which form the bone. The bone remodelling cycle ends with bone mineralisation. The content of mineral in bones is defined as bone density. Osteopenia is a condition with decreased bone density. Apart being a sign of normal aging, osteopenia can be induced with prolonged use of glucocorticosteroids.

Glucocorticosteroids are antiinflammatory medications prescribed, among others, for reducing and prevention inflammation of respiratory pathways in asthma. Since asthma is the most common chronic disease in children, need for monitoring metabolic and bone effects of glucocorticosteroids during therapy is appearing. The goal of this work is establishment of glucocorticosteroid induced hypoplasia of the physis and finding the optimal markers of their metabolic and bone effects.

Although inhaled glucocorticoids are known to have systemic effects on bone metabolism, there is little comparative information on their relative potencies. The effects of three standard glucocorticoids in causing changes in bone metabolism and growth, therefore, were investigated in relation to other systemic effects in the rat. Given to male Sprague-Dawley rats, subcutaneously (s.c.), at doses of 0.3 – 10 mg/kg daily for 7 days, beclomethasone dipropionate, prednisolone and ciclesonide all dose-dependently inhibited thymus body mass index (by 57%, 44% and 76% at 3 mg/kg). Ciclesonide, potently and prednisolone, less effectively, also inhibited femoral bone growth (by 41% and 18% at 10 mg/kg), significantly reducing body weight gain (both by 100% at 10 mg/kg), and serum concentrations of ACP and TRACP (by >30% at 10 mg/kg); both increased serum glucose and triglyceride levels. Serum ALP was not affected. Beclomethasone dipropionate had little or no effect on these additional variables. Although lacking clear systemic activity on bone metabolism following inhalation by asthma patients, ciclesonide shows pronounced bone growth inhibiting activity on s.c. administration to the rat. Differences in activity from the other two glucocorticoids may be related to pharmacokinetic properties and actions on bone resorption.

(104 pages, 30 figures, 16 tables, 102 citats, original is in Croatian language)
Stored in: The library of Faculty of Pharmacology and Biochemistry, A. Kovačića 1, Zagreb, Croatia
Key words: osteopenia, beclomethasone dipropionate, prednisolone, ciclesonide, serum phosphatases
Supervisors: Ines Glojnarić, PhD, Associate Research Scientist, Fidelta Ltd.
Koraljka Đurić, PhD, Assistant Research Scientist, Polyclinic Sunce
Reviewers: Associate Professor Nada Vrkić, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Professor József Petrik, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Senior Research Scientist Tihomir Balog, PhD, Ruđer Bošković Institute
Accepted: 20 September 2017