Protuoksidativna i protuupalna učinkovitost flavonoida u osteoporozi izazvanoj retinoičnom kiselinom u štakora

Nemrava, Johann

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:725837

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

JOHANN NEMRAVA

PROTUOKSIDATIVNA I PROTUUPALNA UČINKOVITOST FLAVONOIDA U OSTEOPOROZI IZAZVANOJ RETINOIČNOM KISELINOM U ŠTAKORA

DOKTORSKI RAD

ZAGREB, 2016

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

JOHANN NEMRAVA

ANTIOXIDATIVE AND ANTI-INFLAMATORY EFFECTIVENESS OF FLAVONOIDS IN RETINOIC ACID INDUCED OSTEOPOROSIS IN RAT

DOCTORAL THESIS

ZAGREB, 2016

Ovaj je doktorski rad izrađen u *Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu*, pod vodstvom *Prof. dr. sc. Nade Oršolić*, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Od srca zahvaljujem mentorici, Prof. dr. sc. Nadi Oršolić, na stručnom vodstvu, svoj pruženoj pomoći, izuzetno korisnim savjetima, te na predanosti i ogromnom strpljenju i uloženom vremenu za vrijeme izrade ovoga doktorskog rada.

Hvala Vam!

Nadalje, zahvalio bih se svim članovima Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno – matematičkog fakulteta u Zagrebu na pruženoj pomoći i savjetima.

Također, zahvale mojoj obitelji i ljudima koji su bili potpora u ostvarenju ovoga rada Slađani Vodolšak, Ivici Balagoviću, Bojani Kranjčec, Nikoli Borojeviću i Marku Fučeku.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

PROTUOKSIDATIVNA I PROTUUPALNA UČINKOVITOST FLAVONOIDA U OSTEOPOROZI IZAZVANOJ RETINOIČNOM KISELINOM U ŠTAKORA

JOHANN NEMRAVA
Zavod za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu

SAŽETAK

Osteoporoza je bolest kostura karakterizirana smanjenjem koštane mineralne gustoće (BMD) i poremećajem mikroarhitekture koštanog tkiva. Rizik za osteoporozu može biti genetski ili stečeni. Stečenom riziku pridonose brojni lijekovi, uključujući 13-cis retinoičnu kiselinu (13cRA). U ovome radu dokazano je da 13cRA u dozi od 80 mg kg^{-1} tijekom 14 dana uspješno uzrokuje osteoporotske promjene u štakora putem mehanizama povećanog oksidativnog stresa (OS) i stvaranja reaktivnih radikala, smanjenja aktivnosti osteoblasta i povećanja aktivnosti osteoklasta, smanjenja razine estrogena i pojavnosti upalnih citokina koji aktiviraju osteoklaste i uzrokuju apoptozu osteoblasta, smanjenja aktivnosti receptora vitamina D, smanjenja apsorpcije Ca^{2+} u crijevima i povećanja izlučivanja Ca bubrezima i učincima na paratireoidni hormon. Kroz model osteoporoze prouzročen 13cRA (RMO) u ovom istraživanju prikazana su protuoksidativnna, protuupalna, fitoestrogenska i regenerativna svojstva flavonoida (krizina, proantocijanida, naringenina, ikarina i kvercetina) na osteoblaste i inhibiciju osteoklasta, što je pokazano odnosima između biljega OS, biokemijskim biljezima koštanog preokreta, mjerenjima koštane mase i geometrijskih odrednica bedrenih kosti, mjerenjima proupalnih citokina i histopatoloških oštećenja kosti. Učinci flavonoida uspoređeni su kroz navedene odrednice sa alendronatom, danas lijekom izbora u liječenju osteoporoze, a prikazana je i procjena oštećenja DNA kod RMO štakora nakon obrade flavonoidima i alendronatom. Dobiveni rezultati pokazuju mogućnost novog farmakoterapijskog pristupa u terapiji osteoporotičnih promjena u kojem laka dostupnost, ekonomska isplativost i nedostatak toksičnosti mogu biti prednost u primjeni flavonoida u odnosu na alendronat. Nadalje ovo istraživanje pridonosi boljem razumijevanju odnosa između prehrane i zdravlja te razvoja koncepta funkcionalne hrane s temeljnim ciljem postizanja boljeg zdravstvenog statusa, spriječavanja i liječenja bolesti.

Ključne riječi: Osteoporoza, 13-cis retinoična kiselina (13cRA), oksidativni stres (OS), reaktivni radikali, upalni citokini, osteoblasti i osteoklasti, flavonoidi

Mentor: Dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor u trajnom zvanju

Ocjenjivači: Dr. sc. Domagoj Đikić, izvanredni profesor

Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izvanredni profesor

Dr. sc. Svjetlana Terzić, znanstveni savjetnik

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

ANTIOXIDATIVE AND ANTI-INFLAMATORY EFFECTIVENESS OF FLAVONOIDS IN RETINOIC ACID INDUCED OSTEOPOROSIS IN RAT

JOHANN NEMRAVA

Division of Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

ABSTRACT

Osteoporosis is a skeletal disease characterized by decreased bone mineral density (BMD) and bone microarchitecture disorder. The risk of osteoporosis can be genetic or acquired. Numerous medications including 13-cis retinoic acid (13cRA) contribute to the acquired risk. In this PhD thesis it has been proved that 13cRA at a dose of 80 mg kg^{-1} during 14 days successfully causes osteoporotic changes in the rats through the mechanisms of increased oxidative stress (OS) and the formation of reactive radicals, reduced activity of osteoblasts and increased osteoclast activity, decreased estrogen levels and the appearance of inflammatory cytokines which activate osteoclasts and cause osteoblasts apoptosis, reduction in vitamin D receptor activity, decreased absorption of Ca^{2+} in the intestine, increase the Ca secretion by kidneys and the effects on the parathyroid hormone. Through the model of osteoporosis caused by 13cRA (RMO) in this study are shown antioxidative, anti-inflammatory, phytoestrogenic and regenerative features of flavonoids (chrysin, proanthocyanidins, naringenin, icariin and quercetin) on osteoblasts and osteoclasts inhibition, which has been shown by the relationships between markers of OS, biochemical markers of bone turnover, measurements of bone mass and geometric determinants of thigh bones, measurements of proinflammatory cytokines and histopathological bone damage. The effects of flavonoids are compared through these features with alendronate, nowadays the medication of choice to treat osteoporosis, and the evaluation of DNA damage at RMO rats after the treatment with flavonoids and alendronate is presented. The results show the possibility of a new pharmacological approach for the treatment of osteoporotic changes, where easy accessibility, cost-effectiveness and lack of toxicity may be an advantage in the application of flavonoids with respect to alendronate. Furthermore, this study contributes to a better understanding of the relationship between diet and health and development of the concept of functional foods with the fundamental aim of achieving better health status, prevention and treatment of disease.

Keywords: Osteoporosis, 13-cis retinoic acid (13cRA), oxidative stress (OS), reactive radicals, inflammatory cytokines, osteoblasts and osteoclasts, flavonoids

Supervisor: Nada Oršolić, PhD, Full Professor

Reviewers: Domagoj Đikić, PhD, Associate Professor

Sandra Radić Brkanac, PhD, Associate Professor

Svjetlana Terzić, PhD, Scientific Advisor

SADRŽAJ

1. UVOD.....1
1.1. Hipoteza istraživanja.....5
1.2. Ciljevi istraživanja 6

2. LITERATURNI PREGLED.....8
2.1. OSTEOPOROZA.....8
2.1.1. Koštani sustav.....8
2.1.2. Definicija osteoporoze.....15
2.1.3. Epidemiologija osteoporoze.....16
2.1.4. Rizični čimbenici za nastanak osteoporoze.....19
2.1.5. Podjela osteoporoze.....22
2.1.6. Dijagnoza osteoporoze.....25
2.1.7. Prevencija nastanka osteoporoze i njezinih posljedica……..…….……32
2.1.8. Farmakološka terapija osteoporoze.....33
2.2. POLIFENOLI.....39
2.2.1. Podjela polifenola.....40
2.3. FLAVONOIDI 40
2.3.1. Kemijska struktura i podjela flavonoida.....41
2.3.2. Farmakokinetika polifenola i flavonoida kao polifenolnih spojeva.....45
2.3.3. Biološka aktivnost flavonoida.....49
2.3.4. Krizin…….…….……59
2.3.5. Proantocijanidini……..……..60
2.3.6. Naringenin.....61
2.3.7. Ikarin……...62
2.3.8. Kvercetin……..…….…..63

2.4. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES.....66

2.4.1. Slobodni radikali i reaktivni spojevi.....66

2.4.2. Lipidna peroksidacija.....70

2.4.3. Oksidativni stres i protuoksidansi.....73

2.4.4. Oksidativni stres i osteoporoza.....76

2.5. VITAMIN A (RETINOIČNA KISELINA) ……..……..…..…….…...76

2.5.1. Fiziološka uloga vitamina A……..…….……76

2.5.2. Model osteoporoze u štakora izazvan retinoičnom kiselinom (RMO)……....…..……79

2.6. TESTOVI GENOTOKSIČNOSTI……..……....80

2.6.1. Komet test…….…..…….80

2.6.2. Mikronukleus test…….…...……82

3. MATERIJALI I METODE.....84

3.1. MATERIJALI…….84

3.1.1. Pokusne životinje…….……...…….…….....84

3.1.2. Pripravci korišteni u pokusu……..…….84

3.2. METODE ……..……..…….……85

3.2.1. Protokol pokusa…….…....85

3.2.2. Praćenje promjene mase životinja…….……..88

3.2.3. Mjerenje mineralne gustoće kosti (BMD; engl. *Bone Mineral Density*).....88

3.2.4. Fizikalna mjerenja kosti.....88

3.2.5. Histološka analiza bedrene kosti.....89

3.2.6. Biokemijski biljezi koštanog preokreta.....89

3.2.7. Hematološki i biokemijski parametri.....90

3.2.8. Određivanje upalnih citokina.....90

3.2.9. Enzimi oksidativnog stresa.....90
3.2.10. Vaganje maternica.....96
3.2.11. Procjena stupnja oštećenja DNA - testovi genotoksičnosti.....96
3.2.12. Statistička analiza.....97
4. REZULTATI…….98
4.1. OSTEOGENI UČINAK BIOAKTIVNIH FLAVONOIDA……..……..…98
4.1.1. Promjena tjelesne težine (TT) životinja tijekom pokusa.....98
4.1.2. Količina minerala u kostima (BMC; engl. *bone mineral content*).....101
4.1.3. Mineralna gustoća kosti (BMD; engl. *Bone Mineral Density*).....104
4.1.4. Rezultati fizikalnih mjerenja kosti.....107
4.1.4a. Indeksa težine bedrenih kostiju.....107
4.1.4b. Relativna težina bedrenih kostiju.....110
4.1.4c. Geometrijske koštane odrednice bedrenih kosti…….……...113
4.1.5. Histološka analiza bedrenih kostiju.....120
4.1.6. Rezultati biokemijskih biljega koštanog preokreta.....124
4.1.6a. Vrijednosti biljega koštane izgradnje – osteokalcina…….……...124
4.1.6b. Vrijednosti biljega koštane razgradnje,
C-terminalnog fragmenta tipa I kolagena (CTX) ili Beta CrossLapsa (β-CTx)……..…125
4.1.7. Razina 25-OH Vitamin D u serumu.....126
4.1.8. Razina kalcija i fosfora u serumu.....127
4.2. PROTUUPALNI UČINAK FLAVONOIDA.....129
4.2.1. Rezultati hematoloških i biokemijskih pokazatelja u punoj krvi i serumu.....129
4.2.2. Hematološki pokazatelji u krvi.....129
4.2.3. Biokemijski pokazatelji u krvi.....134
4.2.3a. Aktivnost enzima u krvi.....135
4.2.3b. Proteini, metaboliti i supstrati.....139

4.2.4. Razina upalnih citokina u serumu.....140

4.2.5. Rezultati mjerenja težine unutarnjih organa.....142

4.2.5a. Indeks težine organa.....142

4.2.5b. Relativna težina organa.....144

4.3. PROTUOKSIDATIVNI UČINAK FLAVONOIDA.....146

4.3.1. Vrijednosti lipidne peroksidacije jajnika, bubrega, slezene i jetre.....146

4.3.2. Vrijednosti ukupnog glutationa (GSH) jajnika, bubrega, slezene i jetre.....152

4.3.3. Vrijednosti enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

jajnika, bubrega, slezene i jetre.....157

4.3.4. Vrijednosti enzimske aktivnosti katalaze (CAT)

jajnika, bubrega, slezene i jetre.....162

4.4. FITOESTROGENSKI UČINAK FLAVONOIDA.....167

4.4.1. Indeks tjelesne težine maternice.....167

4.4.2. Relativna težina maternice.....170

4.5. GENOTOKSIČNI UČINAK FLAVONOIDA.....173

4.5.1. Rezultati mikronukleus testa.....173

4.5.2. Rezultati komet testa.....174

5. RASPRAVA.....181

5.1. Model osteoporoze u štakora izazvan retinoičnom kiselinom (RMO)……...…..…...181

5.2. Učinci flavonoida na osteoporotske promjene u RMO štakora i

njihova usporedba s alendronatom.....189

5.2.1. Učinak flavonoida i alendronata na vrijednosti TT i

težine organa u RMO štakora.....189

5.2.2. Učinci krizina u RMO štakora i usporedba s alendronatom.....193

5.2.3. Učinci proantocijanidina u RMO štakora i usporedba s alendronatom.....197

5.2.4. Učinci naringenina u RMO štakora i usporedba s alendronatom.....202

5.2.5. Učinci ikarina u RMO štakora i usporedba s alendronatom.....206

5.2.6. Učinci kvercetina u RMO štakora i usporedba alendronatom.....210

5.3. Procjena stupnja oštećenja DNA u RMO štakora nakon obrade flavonoidima i alendronatom.....214

6. ZAKLJUČCI.....222

7. CITIRANA LITERATURA…….225

8. ŽIVOTOPIS……..……255

1. UVOD

Organizam sisavca kao i čovjeka nalazi se pod stalnim djelovanjem slobodnih radikala koji nastaju tijekom normalnih metaboličkih procesa i imunosne obrane. U fiziološkim uvjetima aerobnog organizma stanice metaboliziraju oko 95% kisika (O_2) u vodu bez stvaranja toksičnih međuprodukata. Ostalih oko 5% metabolizira se nepotpunom redukcijom kisika u respiratornom lancu mitohondrija uz stvaranje vrlo toksičnih međuprodukata slobodnih radikala kisika (ROS; engl. *reactive oxygen species*), superoksidnih radikala (O_2•-) i hidroksi radikala (•OH). Osim u fiziološkim procesima u stanicama, ovi za organizam potencijalno opasni spojevi povećano se stvaraju u patološkim stanjima, primjerice, upale, tijekom akutnih i kroničnih bolesti te povećane fizičke aktivnosti prilikom vježbanja. Vanjski izvori slobodnih radikala mogu biti dim cigarete, lijekovi, prehrana, pesticidi, radioaktivno ozračivanje, UV-zračenje (Rodrigo 2009). Slobodni radikali kao vrlo reaktivne molekule doprinose u održavanju homeostaze u organizmu sudjelujući u fiziološkim reakcijama i staničnim funkcijama kao što su mitohondrijsko disanje, putevi proizvodnje prostaglandina i obrana domaćina (Halliwell i sur. 1999; Rodrigo 2009). Oksido - redukcijske reakcije čine temelj brojnih biokemijskih metaboličkih promjena u biološkim sustavima, međutim povećano stvaranje slobodnih radikala vodi narušavanju homeostaze, oštećenju stanica izravno ili neizravno preko različitih signalnih puteva (McCord 2000). U normalnim uvjetima postoji ravnoteža između formiranja i uklanjanja oksidansa iz organizma. Povećano stvaranje slobodnih radikala nastaje narušavanjem ravnoteže između prooksidanata i protuoksidanata, što posljedično vodi staničnoj smrti. Švedski znanstvenik C.W. Scheele prvi je u XVIII stoljeću pisao o kisiku kao štetnom elementu. On je predvidio kako je O_2 u čistom stanju, pri visokom tlaku i koncentraciji otrovan za životinje i druge životne oblike. Opstanak života na zemlji bogatoj kisikom ovisi o protuoksidacijskom staničnom sustavu koji zamjenjuje i uklanja produkte oksidacijskog stresa. Taj složeni sustav čine protuoksidativni enzimi (glutation peroksidaza, superoksid dismutaza i katalaza) i molekule (glutation, albumini, mokraćna kiselina, vitamini A, E, C i karotenoidi). Navedeni protuoksidansi sprečavaju stvaranje i/ili odstranjuju već stvorene slobodne radikale te ograničavaju stvaranje i širenje lančanih reakcija koje nastaju kada radikali reagiraju s neradikalima pri čemu nastaju novi, tzv. sekundarni slobodni radikali koji su obično manje reaktivni (Rodrigo 2009). Jedno od vrlo značajnih područja interesa u biološkoj i medicinskoj znanosti je da se procijeni i konačno odredi uloga slobodnih radikala u patofiziologiji različitih bolesti. Smatra se da aktivni slobodni radikali imaju ulogu u nastanku mnogih akutnih i kroničnih kliničkih stanja, poput akutne i kronične upale (reumatoidni artritis, vaskulitis),

neuroloških bolesti (moždani udar, Parkinsonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, Alzheimerova bolest), bolesti kardiovaskularnog sustava (ateroskleroza, hipertenzija), te malignih bolesti. Svim tim stanjima zajedničko je oštećenje biomolekula, tj. proteina, lipida i DNA, procesom oksidacije (Halliwell i sur. 1999).

U dosadašnjim istraživanjima utvrđena je poveznica između oksidativnog stresa (OS), povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva, i gubitka koštane mase, te povećane koštane lomljivosti kao značajki osteoporoze (Becker i sur. 2010). ROS smanjuje diferencijaciju osteoblasta i povećava osteoklastičnu aktivnost. Nedostatan protuoksidativni sustav tj. loša neutralizacija ROS-a doprinosi patogenezi osteoporoze, a protuoksidansi mogu smanjiti resorpciju kosti.

Osteoporoza je bolest kostura karakterizirana smanjenjem koštane mineralne gustoće (BMD; engl. *bone mineral density*) i poremećajem mikroarhitekture koštanog tkiva. Sve to vodi povećanoj koštanoj lomljivosti, te posljedičnom povećanom riziku za prijelome kostiju uz minimalnu traumu (Sambrook i sur. 2006). Prema brojnim epidemiološkim istraživanjima omjer koštane traume povezane s osteoporozom u žena i muškaraca iznad pedesete godine života iznosi 1:2 u žena i 1:5 u muškaraca. Produženjem života u današnje vrijeme osteoporoza predstavlja jedan od najvažnijih javno-zdravstvenih i društveno ekonomskih problema razvijenog svijeta, a također predstavlja značajan uzrok morbiditeta i nesposobnosti (Bonura 2009). Prema nedavnim podatcima iz EU 22 milijuna žena i 5,5 milijuna muškaraca ima osteoporozu. U EU prema jednom istraživanju iz 2010. g. zabilježeno je 3,5 milijuna prijeloma vezanih uz osteoporozu (17,7% kuk, 14,8% kralješnica). U SAD-u učestalost prijeloma vezanih uz osteoporozu je oko 1,5 milijuna godišnje (Becker i sur. 2010; Svedbom i sur. 2013). Osteoporoza može biti primarna, genetski uvjetovana kod koje je osnovni uzrok nepoznat, javlja se češće u žena, uglavnom starije životne dobi (razdoblje postmenopauze) i sekundarna koja ima svoje uzroke koji mogu biti endokrine bolesti (Cushingova bolest), kronične upalne bolesti (reumatoidni artritis), hematološke bolesti (multipli mijelom), a može se javiti i u određenim stanjima kao npr. kod dugotrajne imobilizacije. Uzrok joj mogu biti neki lijekovi kao npr. glukokortikoidi, antikonvulzivi, antiepileptici, inhibitori protonske pumpe, retinoidi i dr. (Lee 2007; Pitts i sur. 2011). Također postoje dokazi o povećanoj koštanoj resorpciji vezanoj uz aktivaciju limfocita T tijekom upale, uz pojavu upalnih citokina koji imaju utjecaj na koštane stanice (Zupan i Jeras 2012). Većina osteoporotičnih prijeloma nastaje u starijih žena te je značaj manjka estrogena neosporan u etiologiji sekundarne osteoporoze. Nedostatak estrogena stimulira T-limfocite da otpuštaju upalne citokine TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17

(promoviraju osteoklastičnu aktivnost), IL-7 (apoptoza osteoblasta) (Khosla i sur. 2011). Ovi učinci pro-upalnih citokina proučavani su na ovarijektomiziranim miševima najčešće rabljenom modelu osteoporoze. Miševi s nedostatkom T-stanica pokazali su otpornost na gubitak koštane mase koji je trebao uzrokovati umjetno izazvan manjak estrogena (Zupan i sur. 2012).

Prema NOF (National Osteoporosis Foundation) smjernicama liječenja osteoporoze koriste se lijekovi svrstani u dvije glavne kategorije: proturesorptivni lijekovi koji zaustavljaju razgradnju kosti i anabolički lijekovi koji potiču izgradnju kosti. Najbrojnija i najdulje upotrebljavana skupina lijekova su bifosfonati (alendronat, etidronat, risedronat i dr.) koji spadaju u proturesorptivne lijekove. U istoj skupini se nalazi hormonska nadomjesna terapija (HRT; engl. *Hormon replacement therapy*), selektivni modulatori estrogenskih receptora (SERMs; engl. *selective estrogen - receptor modulators*) i kalcitonin. U lijekove koji potiču izgradnju kosti ubraja se paratireoidni hormon koji stimulira osteoblaste, povećava apsorpciju kalcija u probavnom sustavu, te povećava bubrežnu reapsorpciju kalcija, međutim ima svoje nuspojave i ograničenost primjene.

Brojne nuspojave i ograničenu primjenu možemo naći i kod ostalih navedenih skupina lijekova, čija dugoročna primjena može izazvati ozbiljne neželjene učinke, koji ponekad zahtijevaju prekid terapije. Hormonska nadomjesna terapija povezuje se s povećanim rizikom pojave malignih tumora u estrogensko ovisnim tkivima što uključuje dojku, endometrij i ovarij te pojavu bolesti srca i krvožilnog sustava poput venske tromboembolije i cerebrovaskularnih bolesti. Također pri izboru farmakološke terapije za prevenciju i liječenje osteoporoze treba voditi računa osim o učinkovitosti lijeka i neželjenim pojavama i o pridruženim bolestima. Sve to otvara potrebu za daljnjim istraživanjem novog farmakološkog pristupa u liječenju osteoporoze, koji bi imao dobru učinkovitost uz minimalno neželjenih djelovanja.

Poznato je da okolišni čimbenici mogu pridonijeti razvoju osteoporoze. Brojni radovi ukazuju na protuoksidativno djelovanje komponenti iz povrća, te povezanost između povećanog unosa voća i povrća s povećanjem koštane mase (Chen 2006). Većina istraživanja vezana uz prehranu koncentrirana je na kalcij i vitamin D. Ovo istraživanje temelji se na flavonoidima, bioaktivnim polifenolnim spojevima biljaka koje čovjek koristi u svojoj prehrani, a imaju protuupalna i protuoksidativna svojstva. Istraživanja su pokazala da prehrana bogata flavonoidima smanjuje pojavnost kardiovaskularnih bolesti (Middleton i sur. 2000), smanjuje nastanak osteoporoze (Dang i sur. 2005), smanjuje ukupni kolesterol, LDL-lipoproteine i trigliceride u plazmi (Ricketts 2006).

U ovom istraživanju je korišten osteoporotični model štakora izazvan 13 cis-retinoičnom kiselinom (13cRA). Ovaj model koristi se u zadnjem desetljeću u procjeni djelovanja različitih tvari na koštani metabolizam, te je potisnuo korištenje kompliciranijeg ovariektomijskog modela osteoporoze u štakora, najčešće korištenog modela osteoporoze nastalog manjkom estrogena (Liao i sur. 2003). Intragastrična primjena visokih doza 13cRA u kratkom vremenskom razdoblju od 1 - 3 tjedna uspješno inducira osteoporozi slične promjene kod štakora, koje se očituju smanjenjem vrijednosti BMD u vratu bedrene kosti, količini Ca i P u kostima, sadržaju koštanog pepela, te promjenama fizikalnih karakteristika kosti (Fahmy i sur. 2009). 13cRA uzrokuje OS i stvaranje ROS-a koji potiskuju osteoblastičnu aktivnost a povećavaju aktivnost osteoklasta, što vodi smanjenju protuoksidativnih mehanizma i gubitku koštane mase. Nadalje, 13cRA smanjenjuje razinu estrogena, što dovodi do pojave upalnih citokina koji potiču osteoklastičnu aktivnost, a osteoblaste uvode u apopotozu; smanjuje aktivnost vitamin D receptora te apsorpciju kalcija u crijevima a potiče izlučivanje kalcija bubrezima i lučenje paratireoidnog hormona (Xu i sur. 2005; Sohair i sur. 2009).

Sličnosti u patofiziološkom odgovoru koštanog sustava u ljudi i štakora u sposobnosti indukcije koštanog gubitka u kratkom vremenskom razdoblju čini ovaj model osteoporoze u štakora vrijednim i prihvatljivim predkliničkim modelom, koji je idealan za proučavanje protuoksidativnih, protuupalnih, fitoestrogenskih i regenerativnih značajki flavonoida na osteoblaste i inhibiciju osteoklasta.

Ranije u tekstu je navedena povezanost sekundarne osteoporoze s manjkom estrogena koji dovodi do aktivacije T-limfocitnih stanica i lučenja upalnih citokina koji utječu na osteoblastičnu i osteoklastičnu aktivnost. Kemijski slični endogenom estrogenu su fitoestrogeni, heterogena skupina biološki aktivnih spojeva kojoj pripadaju različite skupine flavonoida. Ova strukturalna sličnost omogućava im vezanje za estrogenske receptore, te posljedično izazivanje različitih estrogenskih i protuestrogenskih učinaka. Izoflavonoidi kao podskupina flavonoidnih fitoestrogena imaju mnogostruke biološke učinke koji uključuju nekoliko fizioloških sustava (pored ostalog i koštani sustav), a čiji svi mehanizmi djelovanja nisu do kraja u potpunosti razjašnjeni (Pilšakova i sur. 2010). Ova fitoestrogenska podskupina spojeva prema dosadašnjim epidemiološkim, te animalnim i kliničkim istraživanjima *in vitro* i *in vivo* može prevenirati gubitak koštane mase povezane sa menopauzom, čiji mehanizam nije u potupnosti jasan (Coxam 2008). Prema dosadašnjim analizama o učinku izoflavonoidnih fitoestrogena temeljenim na malom broju relevantnih istraživanja i različitosti metodološkog pristupa, može se dati samo sugestija za uzimanje izoflavonoida koji imaju koristan učinak na

koštani sustav, jer još uvijek ne postoje jasne terapijske smjernice o njihovoj primjeni u preventivne ili kurativne svrhe kod osteoporoze (Cassidy i sur. 2006). Postojanje velikog broja flavonoidnih spojeva, njihove različite bioraspoloživosti, sadržaja i kombinacija u pripravcima korištenim u dosadašnjim *in vitro*, animalnim i kliničkim istraživanjima otežava precizno poznavanje učinaka pojedinih flavonoida. U ovom istraživanju ispitano je pet flavonoida (krizin, proantocijanidin, naringenin, ikarin i kvercetin) na osteoporotičnom modelu štakora izazvanom 13cRA, a njihov učinak praćen je preko biljega OS, biokemijskih biljega koštanog preokreta, BMD, protuupalnih citokina i histopatoloških oštećenja kosti.

Buduća predklinička i klinička istraživanja trebala bi omogućiti dodatne spoznaje o učinkovitosti i mehanizmima djelovanja pojedinačnih flavonoida u točno određenim dozama i tako donijeti daljnje dokaze da su flavonoidi potencijalna alternativa dosadašnjim lijekovima koji djeluju na koštani metabolizam poput alendronata. Neki podatci ukazuju da je alendronat lokalni iritant koji uzrokuje upalu kroz infiltraciju neutrofila i oksidativna oštećenja u tkivima, posebno u gornjem gastrointestinalnom sustavu, uključujući upalu jednjaka, suženje jednjaka, vrijeda na želucu, jetri i bubregu, zatajenje bubrega, oštećenju probavnog sustava te povećanu pojavnost tumora dojke u žena u postmenopauzi (Sambrook i sur. 2006; Chiang i sur. 2012). Temeljem navedenog flavonoidi bi mogli biti učinkovita i ekonomski isplativa zamjena za alendronate.

1.1. Hipoteza istraživanja

1. Aktivni slobodni radikali imaju ulogu u nastanku mnogih akutnih i kroničnih kliničkih stanja među koja se ubraja i sekundarna osteoporoza, a kojima je zajedničko oštećenje biomolekula procesom oksidacije.

2. Oksidativni stres (OS) karakteriziran stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva, uzrokuje smanjenje koštane mineralne gustoće (BMD; engl. *bone mineral density*) i poremećaj mikro arhitekture koštanog tkiva, te posljedično tome povećanu koštanu lomljivost.

3. Slobodni radikali kisika (ROS; engl. *reactive oxygen species*) smanjuju diferencijaciju osteoblasta i povećavaju osteoklastičnu aktivnost.

4. Intragastrična primjena visokih doza (80 mg kg^{-1}) 13-cis retinoične kiseline (13cRA) u kratkom vremenskom razdoblju od 1-3 tjedna uspješno inducira osteoporozi slične promjene u štakora, preko oksidativnog stresa i pojave reaktivnih kisikovih spojeva, smanjenja razine

estrogena i pojave upalnih citokina, smanjenja aktivnosti vitamin D receptora i preko regulacije izlučivanja paratireoidnog hormona.

5. Sličnost u patofiziološkom odgovoru koštanog sustava u ljudi i štakora u sposobnosti indukcije koštanog gubitka u kratkom vremenskom razdoblju čini Retinoični model osteoporoze u štakora (RMO) vrijednim i prihvatljivim predkliničkim modelom, koji je idealan za proučavanje protuoksidativnih, protuupalnih, proestrogenskih i regenerativnih značajki spojeva koji djeluju na komponente oksidativnog stresa kao značajnog patogena u sekundarnoj osteoporozi.

6. Flavonoidi (krizin, proantocijanidin, naringenin, ikarin i kvercetin) sa svojim protuoksidativnim, protuupalnim i fitoestrogenskim značajkama, pojačanom aktivacijom VDR receptora, apsorbcije kalcija i aktivacijom osteoblasta mogu smanjiti toksične učinke 13cRA i gubitak koštane mase i pomoći u održavanju koštane homeostaze.

7. Flavonoidi (krizin, proantocijanidin, naringenin, ikarin i kvercetin) su učinkoviti u liječenju drugih oblika stečene osteoporoze prouzročene oksidativnim stresom, smanjenjenom razinom estrogena i posljedičnom sintezom proupalnih citokina koji vode povećanju broja i aktivnosti osteoklasta te pojačanoj resorpciji kosti, smanjenju čvstoće, rasta i razine okoštavanja kosti.

8. Primjena flavonoida (krizina, proantocijanidina, naringenina, ikarina i kvercetina) ne uzrokuje genotoksična oštećenja u RMO štakora.

9. Flavonoidi (krizin, proantocijanidin, naringenin, ikarin i kvercetin) predstavljaju potencijalnu dobru, učinkovitu i ekonomski isplativu alternativu dosadašnjim lijekovima koji djeluju na koštani metabolizam, a koji pokazuju brojne nuspojave i imaju ograničenost primjene.

1.2. Ciljevi istraživanja

1. Potvrditi jasnu poveznicu između oksidativnog stresa (OS) karakteriziranog stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i sekundarne osteoporoze.

2. Utvrditi kako ROS smanjuju diferencijaciju osteoblasta i povećavaju osteoklastičnu aktivnost, te povezati ovu patogenezu sa smanjenjem koštane mineralne gustoće (BMD) i poremećajem mikro arhitekture koštanog tkiva.

3. Utvrditi da li intragastrična primjena 13cRA 80 mg kg^{-1} u kratkom vremenskom periodu preko mehanizama oksidativnog stresa, smanjivanja razine estrogena, djelovanja na VDR receptore i paratireoidni hormon, dovodi do osteoporotičnih promjena u štakora.

4. Potvrditi da je retinoični model osteoporoze (RMO) u štakora vrijedan predklinički model za proučavanje protuoksidativnih, protuupalnih, proestrogenskih i regenerativnih značajki spojeva koji djeluju na komponente oksidativnog stresa kao značajnog patogena u sekundarnoj osteoporozi.

5. Istražiti učinkovitost flavonoida u liječenju stečene osteoporoze prouzročene s 13cRA na modelu štakora kroz protuoksidativnu, protuupalnu, fitoestrogensku i regenerativnu djelotvornost svakog od pojedinačnih flavonoida (krizina, proantocijanidina, naringenina, ikarina i kvercetina).

6. Naći poveznicu između biljega OS, biokemijskih biljega koštanog preokreta, BMD, proupalnih citokina i histopaloloških oštećenja kosti u RMO u štakora.

7. Razjasniti ulogu proupalnih citokina u gubitku koštane mase kao mogući važan terapeutski cilj u liječenju osteoporoze.

8. Utvrditi razliku u osteoprotektivnoj učinkovitosti svakog od pojedinačnih flavonoida (krizina, proantocijanidina, naringenina, ikarina i kvercetina) i danas široko primjenjivanog u liječenju osteoporoze, proturesorptivnog lijeka bifosfonata Alendronata u RMO u štakora.

9. Temeljem mogućih pozitivnih učinaka flavonoida na narušenu homeostazu koštanog tkiva i gubitak koštane mase prouzročen lijekovima uključujući 13cRA dati zaključak da li flavonoidi (krizin, proantocijanidin, naringenin, ikarin i kvercetin) predstavljaju jednu potencijalnu mogućnost za liječenje osteoporoze u kliničkoj praksi, a koja bi bila cijenom dostupnija i sa daleko manje nuspojava od trenutnih lijekova poput alendronata.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. OSTEOPOROZA

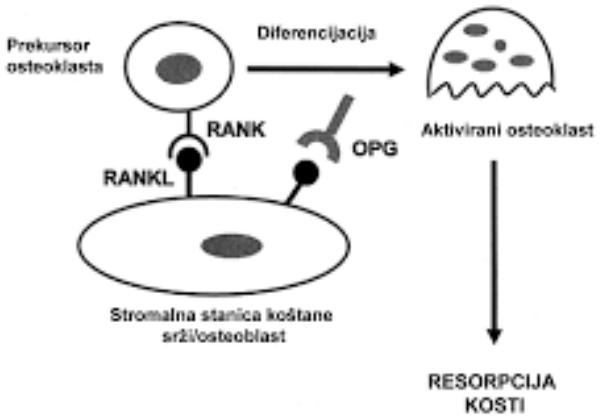
2.1.1. Koštani sustav

Koštani sustav u organizmu ima višestruku ulogu. Služi kao potpora tijelu i hvatište mišićima te tako omogućava kretanje, mehanički štiti organe u tjelesnim šupljinama, mjesto je stvaranja krvnih stanica i biokemijski regulator koncentracije kalcija i drugih minerala u organizmu. Koštanu masu čini ukupna količina koštanog tkiva u kosturu, od čega većinu čini elastična, proteinska potporna tvar, kolagen i najvažniji mineral kalcij, koji daje čvrstoću. Ako sustavno gledamo građu kosti osnovne sastavnice koštanog tkiva su koštane stanice i međustanična tvar takozvani koštani matriks kojeg sačinjava organska komponenta (35% koštanog matriksa) i anorganska komponenta (65% koštanog matriksa). Anorganska komponenta daje kosti tvrdoću, krutost te snagu protiv djelovanje sila tlaka, a najveći dio sačinjava kalcijev fosfat u obliku kristala hidroksiapatita [$Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$]. Organska komponenta sastoji se od kolagena i nekolagenskih proteina. Kolagen tip I najzastupljenija je komponenta organskog matriksa i kosti daje elastičnost, fleksibilnost i snagu protiv djelovanje sila vlaka. Ostatak organskog matriksa čine nekolageni proteini od kojih su najzastupljeniji osteokalcin i osteonektin koji specifično vezuju kalcij, osteopontin, sijaloprotein i trombospodin važni u adheziji stanica i koštanog matriksa, proteoglikani (glukozamini: hondroitin sulfat i heparin sulfat), alkalna fosfataza, fibronektin, vitronektin, matriks gla-protein (MGP), protein S (Lee i sur. 2001). Morfološki i funkcionalno u građi kosti razlikujemo spužvastu (trabekularnu) kost i kompaktnu (kortikalnu) kost. Površinu kosti izgrađuje kompaktna kost koja ima četiri puta veću masu od spužvaste kosti; 80-90% kompaktne kosti je mineralizirano, a građena je od tijesno zbijenih i pravilno raspoređenih koštanih lamela. Primarno ima mehaničku i zaštitnu funkciju. Spužvasta kost izgrađuje unutrašnjost duge ili cjevaste kosti u kojoj je najzastupljenija na epifizama, dok se kralješci kao kratke kosti najvećim dijelom sastoje od spužvaste kosti. Spužvasta kost građena je od koštanih gredica čiji položaj prati smjer djelovanja sile na kost. Takva građa čini kost laganom, elastičnom i čvrstom strukturom koja podupire tijelo te se opire djelovanju sila tlaka i vlaka na kost. Šupljine u spužvastom tkivu ispunjene su koštanom srži koja proizvodi većinu krvnih stanica, te je ono mjesto gdje se odvija najveći dio koštanog metabolizma (Lee i sur. 2001).

Ranije se smatralo da je kost potpuno adinamična struktura, danas je poznato da su procesi trajne izgradnje i razgradnje kosti vrlo intenzivni (Kaštelan 2000). U održavanju i prilagodbi strukture i metabolizma koštanog tkiva sudjeluju tri vrste stanica osteoblasti, osteoklasti i osteociti (Marcus i sur. 2010). Osteoblasti su stanice aktivne u izgradnji koštanog tkiva, dok osteoklasti svojim resorptivnim djelovanjem razaraju koštano tkivo (Cvek 2008). Dinamika formiranja nove kosti i resorpcije stare kosti tzv. remodeliranje kosti, regulirana je brojnim okolišnim signalima, uključujući kemijske, mehaničke, električne i magnetske. Diferencijaciju iz mezenhimalnih matičnih stanica u stanice osteoblastične linije, kao i utjecaj na njihov rast i diferencijaciju posreduju čimbenici rasta, hormoni i citokini. Među najznačanijim osteoprogenitorskim čimbenicima rasta su čimbenik rasta fibroblasta (FGF; engl. *Fibroblast growth factor*), transformirajući čimbenik rasta-β1 (TGF-β1; engl. *Transforming growth factor* - β1) i inzulinu sličan čimbenik rasta (IGFs; engl. *Inuslin-like growth factor*). FGF je važan čimbenik u neovaskularizaciji. TGF-β je polipeptid koji stimulira replikaciju prekursorskih stanica osteoblastične linije i ima direktno stimulirajući učinak na sintezu koštanog kolagena i može inducirati apoptozu osteoklasta. IGFs je polipeptid koji se sintetizira u mnogim tkivima, uključujući i kost gdje djeluje kao lokalni regulator staničnog metabolizma. Od ostalih osteoprogenitornih čimbenika tu je čimbenik rasta trombocita (PDGF; engl *platelet-derived growth factor*), stimulira replikaciju koštanih stanica te posljedično sintezu košatnog kolagena, koštani morfogenetski proteini (BMP; engl. *bone morphogenetic proteins*) imaju izrazit osteoinduktivni učinak (Lian i sur. 1999). O hormonima i citokinima biti će riječi u daljnem tekstu.

Osteoblastična aktivnost karakterizirana je proizvodnjom proteina koštanog matriksa, uključujući kolagen tipa I (najzastupljeniji izvanstanični protein kosti), osteokalcin, osteopontin, osteonektin i drugih. Proizvedeni koštani matriks (osteoid) služi kao podloga za mineralizaciju i proizvodnju zrele kosti (Katagiri i sur. 2002; Pietschmann 2012). Osteoblasti nadalje luče čimbenik stimulacije kolonije makrofaga (M-CSF; engl. *macrophage colony-stimulating factor*) koji privlači prekursore osteoklasta te potiče njihovu diferencijaciju (Marcus i sur. 2010). Direktan fizički doticaj osteoblasta i prekursora osteoklasta nužan je za osteoklastogenezu (Takahashi i sur. 1999). Nakon potpunog sazrijevanja i izlučivanja mineraliziranog matriksa, osteoblasti se diferenciraju u osteocite završno diferencirani tip osteoblasta; najzreliji tip smješten u lakunama matriksa, od kojih svaka lakuna sadrži samo jedan osteocit. Osteociti nemaju sposobnost lučenja matriksa. Služe kao mehanosenzorne stanice koje osiguravaju prijenos mehaničkih i metaboličkih signala i svojim metabolizmom

održavaju koštani matriks (Junqueira i sur. 2005; Pietschmann 2012). Osteoblasti i osteociti imaju receptore za citokine, PTH, 1,25-dihidroksivitamin D3 i estrogen koji su ključni regulator i u koštanoj pregradnji. Stromalne osteoblastne stanice glavni su izvor čimbenika koji potiče kolonije (CSF; engl. *Colony-stimulating factor*) i Interleukina-6 (IL-6) familije citokina koji su jaki stimulatori koštane resorpcije te koji sudjeluju u osteoklastogenezi u ranoj i kasnoj fazi. Osteoblasti luče ligand za receptor koji aktivira nuklearni čimbenik-B (RANKL; engl. *Receptor activation of NF-κβ ligand*) koji se veže na receptor koji aktivira nuklerani čimbenik-B (RANK; engl. *receptor activator of NF-κβ*) na membrani osteoklasta uzrokujući aktivaciju osteoklasta i njihovo umnožavanje s pojačanom koštanom resorpcijom. Osim toga osteoblasti luče i osteoprotergin (OPG) koji se također veže na RANK receptore osteoklasta te time inhibira resorpciju kosti (Slika 1). Ekspresija OPG/RANK/ liganda u osteoblastima je pod kontrolom 1,25(OH)2D3, IL-11 i prostaglandina E2 (PGE2), stimulatora koštane resorpcije. Na taj način ovi ligandi reguliraju formaciju osteoklasta (Lian i sur. 1999).



Slika 1. RANK/RANKL/OPG sustav (Preuzeto od Klobučar i sur. 2011)

Osteoklasti su višejezgrene stanice, podrijetlom od monocitno/makrofagne stanične linije, karakteristične po postojanju nabranog ruba i prisutnosti H^+-ATPaze koja je zadužena za zakiseljavanje aktivnog područja resorpcije na dijelu gdje je membrana naborana, a luče i katepsin K, odgovoran za razgradnju proteina matriksa (Katagiri i sur. 2002). Dio citoplazme oko nabranog ruba naziva se svijetla zona, bogata aktinskim filamentima i mjesto je adhezije osteoklasta za koštani matriks. Zajedno s nabranim rubom stvara mikrookoliš za razgradnju kosti (Junqueira i sur. 2005). Mehanizam regulacije osteoklastične aktivacije nije do kraja razjašnjen. Dva su bitna signalna mehanizma za diferencijaciju osteoklasta. Jedan ide putem makrofagnog čimbenika koji potiče rast kolonija (M-CSF; engl. *macrophage colony-stimulating factor*) kojeg izlučuju okolne stromalne stanice, a drugi se aktivira putem

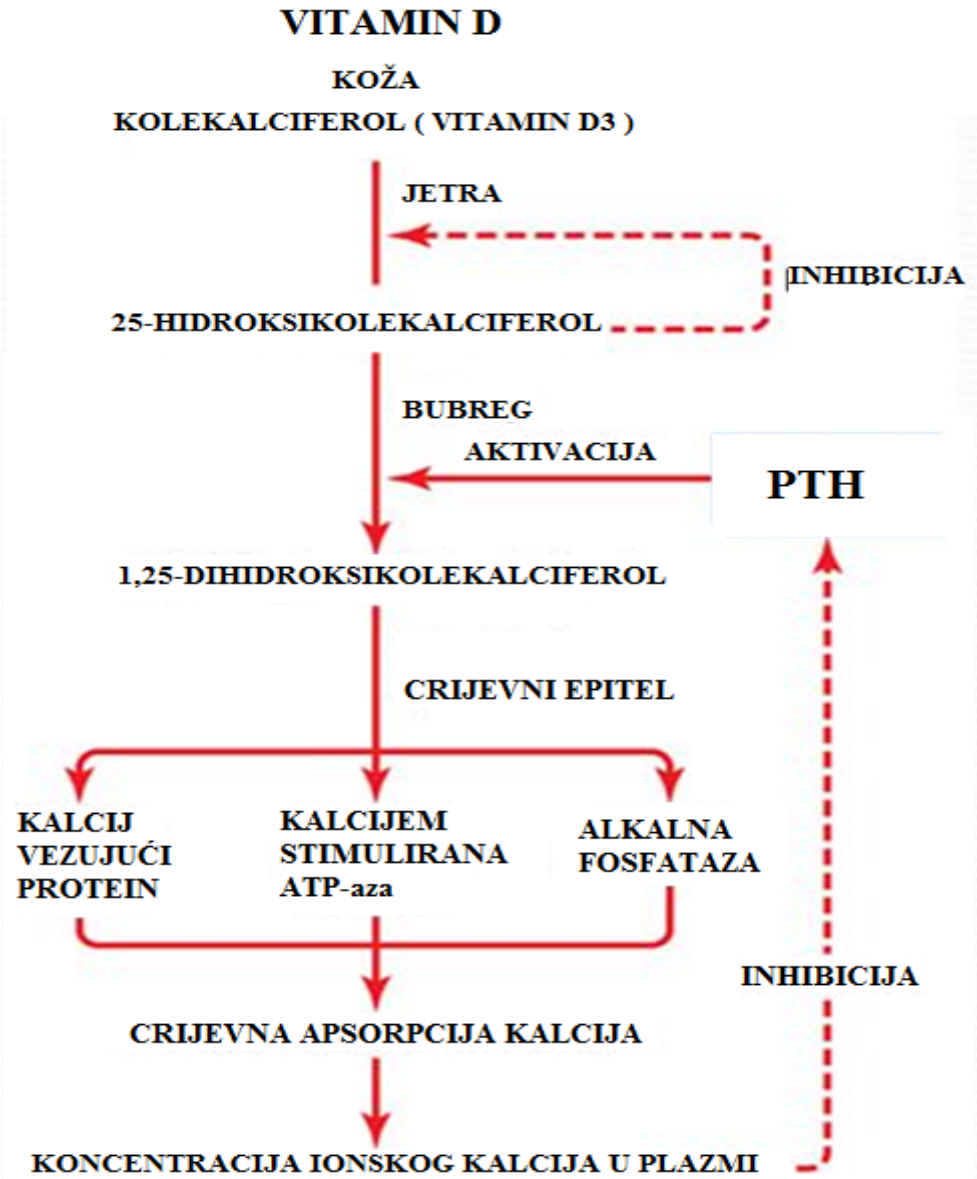
cirkulirajuće molekule koja se veže za RANK receptor na membrani osteoklasta, kako je gore obješnjeno. Osteoklastičnu aktivnost reguliraju sustavni hormoni poput paratireoidnog hormona (PTH), aktiviranog vitamina D i kalcitonina, te lokalni čimbenici koji nastaju u koštanom mikrookolišu: interleukin-1(moćan stimulator osteoklasta), limfotoksin, TNF (stimulacija osteoklasta), CSF-1, IL-18, OPG (inhibcija koštane resorpcije), RANKL (pojačanje koštane resorpcije), IL-6 (slabiji stimulator osteoklasta), interferon-γ (inhibitor osteoklastične resorpcije), TGF-β (ihibitor osteoklastičnog formiranj) (Lian i sur. 1999).

Glavni čimbenik regulacije metabolizma kosti i homeostaze minerala u tijelu je PTH (paratiroidni hormon) kojeg izlučuju Paratiroidne žlijezde (epitelna tjelešca) smještene iza štitne žlijezde (Marcus i sur. 2010). PTH se veže na receptore osteoblasta te ih potiče na stvaranje čimbenika koji stimuliraju osteoklaste. Time se postiže povećanje broja i aktivnosti osteoklasta te pospješuje apsorpcija mineraliziranog koštanog matriksa i otpuštanje kalcija u krv. PTH također djeluje i na apsorpciju kalcija iz probavnog sustava, za što je potreban vitamin D. Također, osteoblasti na stimulaciju PTH-om mogu odgovoriti lučenjem kolagenaze i plazminogenih aktivatora koji pospješuju djelovanje osteoklasta (Marcus i sur. 2010). Hormon kalcitonin iz štitne žlijezde ima suprotan učinak tj. inhibira resorpcijsko djelovanje osteoklasta i otpuštanje kalcija te pospješuje osteogenezu (Junqueira i sur. 2005).

Uloga vitamina D vrlo je bitna u koštanom metabolizmu jer je vitamin D odgovoran za učinkovitu apsorpciju kalcija u crijevima. Sa fiziološkog gledišta uloga vitamina D je u održavanju koncentracije kalcija u serumu unutar fiziološki normalnih granica, a kalcij je važan za normalan razvoj i rast kostura. Dostatan unos kalcija kritičan je za postizanje optimalne koštane mase, te mora biti prisutan u topivom i ioniziranom obliku prije nego se može apsorbirati (Cashman 2007). Vitamin D sintetizira se najvećim dijelom u koži procesom fotosinteze gdje pod utjecajem UV-B zraka, iz 7-dehidrokolesterola nastaje previtamin D koji se konvertira u provitamin D (cis i trans obliku). Cis oblik provitamina D pretvara se u vitamin D 25(OH)D. U jetri se vrši hidroksilacija vitamina D u 25(OH)D koji se izlučuje u krv gdje se veže za protein koji veže vitamina D (DBP; engl. *vitamin D binding protein*). Vezan za DBP putem krvi dolazi u bubreg gdje se pod utjecajem 5 hidroksivitamin D-1α-hidroksilaze koju luče stanice proksimalnih kanalića, pretvara u 1,25(OH)2D3 (kalcitriol) koji je najaktivniji oblik vitamina D (Slika 2). Aktivni oblik viamina D ubrzava aktivnu apsorpciju kalcija kroz enetrocite dvanaesnika i jejunuma, djeluje na sabirne kanaliće bubrega stimulirajući reapsorpciju kalcija, a njegovo djelovanje na koštani sustav odvija se putem receptora za

vitamin D (VDR) prisutnih na osteoblastima koji nakon aktivacije stimuliraju osteoklaste te izazivaju resorpciju kosti čime se regulira količina Ca u krvi.

Djelovanje vitamina D, PTH i razine kalcija u serumu je povezano mehanizmima povratne sprege (Slika 2). Povišena razina kalcija dovodi do inhibiranja stvaranja i lučenja PTH. Vitamin D direktno preko VDR receptora inhibira lučenje PTH, a indirektno putem hiperkalcemije. Niska vrijednost kalcija dovodi do pojačane sinteze i otpuštanja PTH koji stimulacijom aktivnosti 1α-hidroksilaze potiče sintezu kalcitriola u proksimalnim bubrežnim kanalićima koji uzrokuje pojačanu apsorpciju Ca iz tankog crijeva i reapsorpciju u bubregu i dovodi do resorpcije kosti putem indirektne aktivacije osteoklasta.



Slika 2. Aktivacija vitamina D i njegova uloga u regulaciji plazmatske koncentracije kalcija (Preuzeto i prilagođeno iz Guyton and Hall, Textbook of Medical Physiology, 12 edition)

Ukoliko postoji deficit vitamina D u organizmu, crijeva mogu apsorbirati oko 10 do 15% kalcija unesenog prehranom. No u slučajevima kada vitamina D ima dostatno, tanko crijevo apsorbira i do 30% kalcija iz hrane. Tijekom perioda naglog rasta, laktacije ili trudnoće, apsorpcija se može popeti i do 50%. Ukoliko nema dovoljno kalcija da zadovolji potrebe tijela, vitamin D posreduje u otpuštanju kalcija iz zaliha koje su spremljene u kostima (Burckhardt i sur. 2004).

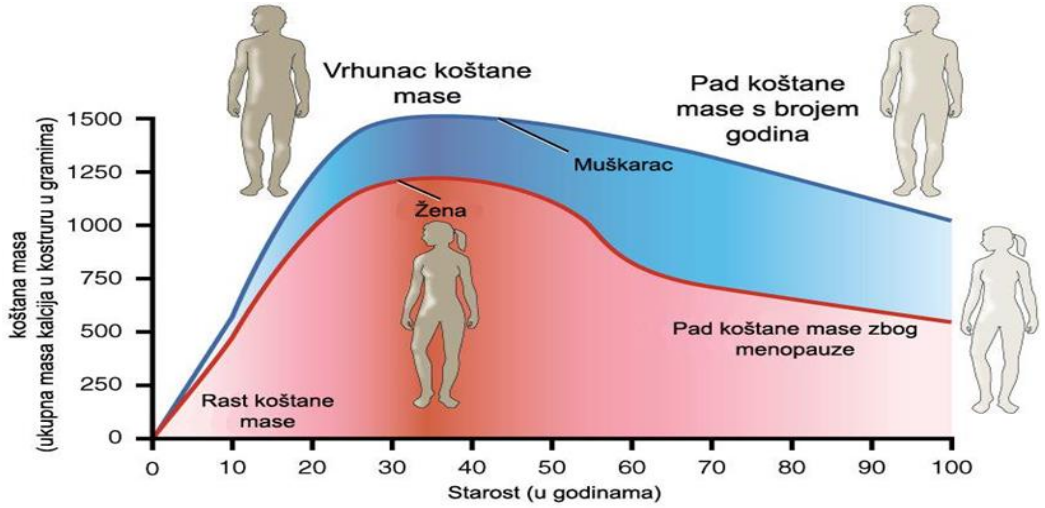
Spolni hormoni imaju važnu regulatornu ulogu u razvoju kostura i homeostazi koštanog sustava. Mnoge stanice u koštanom sustavu eksprimiraju receptore za ženske spolne hormone estrogene, između ostalih i osteoblasti i osteoklasti (Marcus 2010). Estrogeni su steroidni hormoni čija se važnost uočava prilikom značajnog gubitka koštane mase tijekom menopauze. Dokazano je kako nedostatak estrogena stimulira T-limfocite da otpuštaju upalne citokine TNF-α, IL-1, IL-6 (promoviraju osteoklastičnu aktivnost), IL-7 (apoptoza osteoblasta) (Khosla 2011). Pokazano je također da odstranjenje jajnika (ovarijektomija) dovodi do povećane razine IL-1α, IL-6, prostaglanadina E2 te TNF-α (Bismar i sur. 1995). U stanju nedostatka estrogena dolazi do povećane razine RANKL a smanjenja OPG što dovodi do povećanja aktivacije osteoklasta te posljedičnog povećanja razgradnje kosti. Prema zadnjim istraživanjima smatra se da estrogen ima istovremeno protu-katabolički i anabolički učinak na kost. On djeluje putem 2 receptora; estrogen receptor α (ERα) i estrogen receptor β (ERβ), a čini se da je ERα primarni medijator učinka estrogena na koštani sustav (Lee i sur. 2003; Raisz 2005). Kontroliranjem apoptoze estrogeni utječu i na životni vijek osteoblasta i osteoklasta, gdje se u njihovom nedostatku skraćuje životni vijek osteoblasta, a produžuje životni vijek osteoklasta. Kod muškaraca je glavni spolni hormon testosteron pa je djelovanje na kost posredovano vezivanjem na receptor androgena, no učinak se ipak većinom ostvaruje nakon pretvorbe u estrogen putem specifične aromatazae prisutne u osteoblastima (Giljević 2008).

Koštana masa se izgrađuje u mladosti i doba spolne zrelosti. Izgradnja koštane mase tijekom života opada, tako da već nakon 30. godine razgradnja dostiže izgradnju. Nakon 40. godine svi gube 0,5% koštane mase, a nakon ulaska u menopauzu u žena se taj postotak udvostručuje (Slika 3). Na kvalitetu koštanog tkiva u kasnijem životnom razdoblju osobito utječe veličina koštane mase u mladosti, tj. vršna koštana masa (PMB; engl. *Peak Bone Mass*). PMB definira se kao maksimalna koštana gustoća koja se dostiže između 20. i 25. godine života (North American Menopause Society 2006). Istraživanja su pokazala de se oko 95 - 100% PBM-a postiže u kasnom pubertetu a trajni dodatni porast nalazimo još od 20 do 29 godine (Recker i sur. 1992). Uz veću vršnu masu manja je vjerojatnost razvoja osteoporoze i prijeloma kosti. Čimbenici koji određuju vršnu masu su gensko naslijeđe, spol (žene su ugroženije), etnička

pripadnost (Afrikanke su otpornije), hormoni, unos kalcija i vitamina D u organizam te tjelesna aktivnost (Švarc 2007). Gonadotropni hormoni imaju vodeću ulogu u regulaciji koštane mase. Porast gonadotropnih hormona u pubertetu povezan je s naglim rastom koštane mase u fiziološkim uvjetima a njegov nedostatak u adolescenciji onemogućava postizanje PBM za 20 - 30% u odnosu na očekivanu. U periodu između dosezanje vršne koštane mase i prije početka menopauze, koštana razgradnja i koštana izgradnja približno su podjednake te su promjene u koštanoj masi minimalne (Bonura 2009). U prvim godinama nakon menopauze koštana resorpcija započinje s ubrzanom razgradnjom kosti, vodeći gubitku koštane mase. Iako se koštana razgradnja poslije smanjuje, gubitak koštane mase kontinuirano se nastavlja kroz postmenopauzalni period (North American Menopause Society 2006). U prosjeku do 80-te godine žena izgubi prosječno oko 30% njene vršne koštane mase (Looker i sur. 1998).

Pad koštane mase povezan sa godinama može se pridodati oksidativnom stresu (OS) karakteriziranom stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) za koje je utvrđeno da reduciraju osteoblastogenezu, i uzrokuju oštećenja brojnih biomolekula, što je povezano sa prirodnim procesom starenja. O ulozi oksidativnog stresa i antioksidanasa na koštani metabolizam biti će govora u drugom poglavlju.

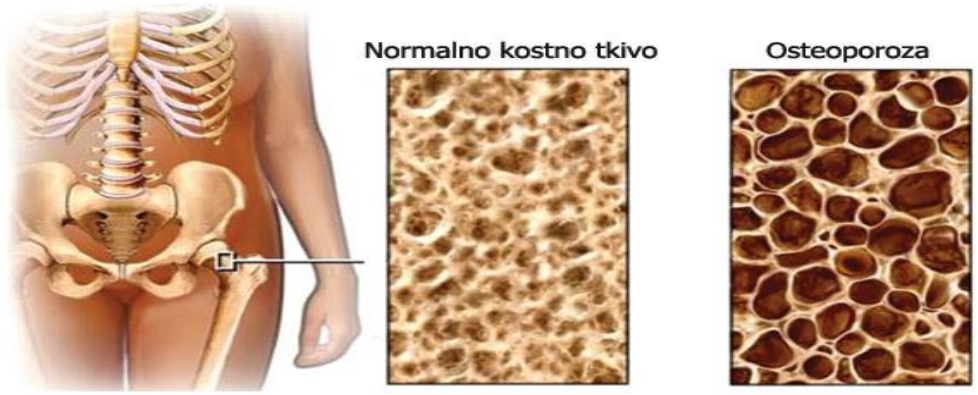
Postizanje optimalne vršne koštane mase važno je zbog prevencije osteoporoze, a prema epidemiološkim istraživanjima povećanje PMB od 10% može smanjiti rizik za nastanak prijeloma kuka za 30% (World Health Organization 2003).



Slika 3. Prikaz dinamike koštane mase žene i muškarca kroz godine (Preuzeto sa stranice https://pbs.twimg.com/media/B4qrP2LIEAAk6QX.jpg:large)

2.1.2. Definicija osteoporoze

Postoje brojne definicije osteoporoze. Prema definiciji Nacionalnog instituta za zdravlje SAD-a, osteoporoza jest bolest povećane lomljivosti kostiju koju karakterizira mala koštana gustoća (T vrijednost manja od -2,5) i poremećena mikroarhitektura kosti. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO; engl. *World Health Organisation*) 1994 godine jasno je definirala i objavila kriterije za dijagnozu osteoporoze temeljene na mjerenju mineralne gustoće kosti (BMD; engl. *bone mineral density*) denzitometrijom (DXA; engl. *dual-energy x-ray absorptiometry*). Prema tim kriterijima, bolesnik s vrijednosti BMD koja je 2,5 standardne devijacije (SD) ili više ispod srednje vrijednosti BMD za mladu prosječnu populaciju (T-score –2,5 ili manji) ima dijagnozu osteoporoze. Ako je BMD između 1 i 2,5 SD ispod srednjeg BMD za referentnu populaciju (T-score između –1 i –2,5) postavlja se dijagnoza osteopenije. Ako je BMD 1 SD ispod BMD za referentnu populaciju (T-score –1 ili veći) nalaz je normalan. Ukoliko postoji prijelom zbog smanjene gustoće kosti, neosvisno o T-score postavlja se dijagnoza osteoporoze. WHO je 2004. godine objavila rizične čimbenike za nastanak osteoporotičnog prijeloma. To su BMD u području vrata bedrene kosti, starost, raniji osteoporotični prijelomi, glukokortikoidna terapija, pozitivna obiteljska anamneza za prijelom kuka, pušenje, povećano konzumiranje alkohola, te sekundarna osteoporoza (reumatoidni artritis). Navedene definicije se temelje na danas široko dostupnom denzitometrijskom mjerenju mineralne gustoće kosti i mineralnog sadržaja kosti, a govore o osteoporozi (grčki osteon = kost, poros = rupičast) kao bolesti kostura karakteriziranoj smanjenjem BMD i poremećajem mikroarhitekture koštanog tkiva (Slika 4). Sve to vodi povećanoj koštanoj lomljivosti, te posljedičnom povećanom riziku za prijelome kostiju uz minimalnu traumu (Sambrook i sur. 2006).



Slika 4. Prikaz normalne kosti i kosti zahvaćene osteoporozom (Preuzeto sa stranice http://www.pikanal.rs/wp-content/uploads/2015/10/336298_1.jpg)

Arheološka istraživanja utvrdila su postojanje osteoporoze već kod sjevernoameričkih Indijanaca, koji su živjeli 2 – 2,5 tisuće godina prije Krista, međutim ova bolest nije bila poznata do kraja 19. st. Prvi epidemiološki podaci o učestalosti osteoporoze postoje iz 1941. godine, kad je Fuller Albright na 42 ispitanika proučavao povezanost rase i gubitka koštane mase. Svoj medicinski i socijalni značaj dobila tek u šezdesetim godinama 20. st., kada se znatno povećao broj stanovnika starije dobi u razvijenim zemljama Europe i Amerike i kada su se stekle mogućnosti za biokemijska i radiološka istraživanja na višoj razini. U današnje vrijeme značajno je povećan interes za čimbenike rizika u nastanku ove bolesti i koštanih prijeloma vezanih za nju (Aganović 1993; Vasiljeva 2003).

Osteoporoza kao najzastupljenija metabolička bolest kostiju napreduje obično bez simptoma, koštani gubitak teško je otkriti jer oko 50% bolesnika nema kliničkih smetnji i često se dijagnosticira tek nakon dramatična događaja, kao što je prijelom kralješka, bedrene kosti ili podlaktice, deformiteta, izrazito smanjenje pokretljivosti te invaliditeta (Švarc 2007). Prema brojnim epidemiološkim istraživanjima omjer koštane traume povezane s osteoporozom u žena i muškaraca iznad pedesete godine života iznosi 1 : 2 u žena i 1 : 5 u muškaraca. Starenjem populacije učestalost osteoporoze raste, ubraja se među najčešće kronične bolesti populacije, a uz često neprepoznatu kliničku sliku poprima značajke tihe epidemije. U današnje vrijeme borba protiv ove bolesti zasniva se na prevenciji, koja je prije svega zasnovana na općim mjerama i promjeni životnih navika (prehrana, tjelesna aktivnost) s ciljem sprečavanja nastanka bolesti i farmakološkoj terapiji, u slučajevima kada je bolest već prisutna.

2.1.3. Epidemiologija osteoporoze

Produženjem života u današnje vrijeme osteoporoza predstavlja jedan od najvažnijih javno-zdravstvenih i društvenoekonomskih problema razvijenog svijeta, a također predstavlja značajan uzrok morbiditeta i nesposobnosti (Sambrook 2006). Uglavnom se pojavljuje kod ljudi starije životne dobi, koji boluju i od drugih kroničnih bolesti, češća je u žena a znatan gubitak kosti počinje nakon menopauze. Zastupljenost osteoporoze raste s dobi, od 6% s 50 godina, do 50% nakon 80 godina (Looker i sur. 1998). Prema kriterijima koje definira WHO procjena je da 15% stanovništva bijele rase starijeg od 50 godina te oko 70% stanovništva starijeg od 80 godina ima osteoporozu (WHO 2003). Prema podatcima IOF-a (IOF; engl. *International Osteoporosis Foundation*), procjenjuje se da od osteoporoze boluje najmanje 200 milijuna žena u svijetu, trećina žena u dobi između 60 i 70 godine te dvije trećine starijih od 80

godina (IOF 2006). Trećinu oboljelih čine muškarci, shodno tome žene imaju znatno veći rizik od obolijevanja od osteoporoze. Postmenopauzalna osteoporoza najčešći je oblik ove bolesti a najznačajniji uzročni čimbenik je gubitak estrogena u menopauzi. Podložnije obolijevanju su žene koje su rano ušle u menopauzu ili su im kirurški prije 45.-e godine, uklonjeni jajnici. Osteopenija i osteoporoza mogu se pojaviti i u reprodukcijskom dobu žene, i to u hipoestrogeničnim stanjima kao što su amenoreja, laktacija, te jatrogene amenoreje (Šimić i sur. 2007). Na povećanu sklonost u žena upućuju nizak rast, neuravnotežen menstrualni ciklus, anoreksija, alkoholizam i pušenje. Kod muškaraca najčešći uzroci osteopenije i osteoporoze su pad razine testosterona i alkoholizam, a povećanu sklonost pokazuju nizak rast, slabi bedreni mišići, te bolesti koje snižavaju razinu testosterona. Zbog primarnog nedostatka androgenih hormona, muškarci s osteoporozom su gracilno građeni. Kosti su duge, mišići slabi i česta je kifoza (zakrivljenost srednjeg dijela kralješnice, pored rebara) (Matovinović 1970).

Temeljni problem ove bolesti čine osteoporotični prijelomi koji nastaju spontano ili uz minimalnu traumu. S kliničkog stanovišta posebno su važni vertebralni te prijelomi u području kuka jer su izravno povezani s povećanim mortalitetom. Prema velikim epidemiološkim istraživanjima jedna od dvije žene, te jedan od četiri muškaraca iznad pedesete godine zadobiti će osteoporotični prijelom tijekom života što čini značajan uzrok morbiditeta i nesposobnosti (Bonura 2009; Lewiecki i sur. 2009). Smatra se da će oko 30% žena i 12% muškaraca do kraja života zadobiti osteoporotični prijelom neke kosti (Ioannidis i sur. 2004).

Vertebralni prijelomi rezultiraju smanjenjem visine, bolnošću, smanjenim kapacitetom pluća, povećanim rizikom od padova, poremećajima spavanja te povećanom ovisnošću o pomoći drugih osoba. Procjenjuje se da 30% žena starijih od 50 godina ima jedan ili više vertebralnih prijeloma (Dennison i sur. 2000). Iako su osteoporotični prijelom kralješka najčešći, ostali koštani prijelomi (vrat bedrene kosti, palčana kost i dr.) čine 73% svih prijeloma (Burge i sur. 2007).

Kod prijeloma bedrene kosti oko polovica bolesnika nakon dugotrajne imobilizacije nikada se više ne vrati na prijašnji nivo pokretnosti (mobilnosti), 80% ne može samostalno izvesti barem jednu svakodnevnu aktivnost, a čak oko 25% bolesnika treba dugoročnu skrb (Cooper 1997; Bonura 2009). Nadalje procjena je da 6 mjeseci nakon ovakvog prijeloma stopa mortaliteta (rizik smrti) iznosi oko 10% do 20% od očekivane (Pasco i sur. 2005). Prijelom vrata bedrene kosti nosi 2,5 puta do 2,3 puta povećani rizik od nastanka naknadnog prijeloma kralješka odnosno vrata bedrene kosti (Klotzbuecher i sur. 2000).

Epidemiološka istraživanja u SAD-u pokazuju učestalost prijeloma vezanih uz osteoporozu oko 1,5 milijuna godišnje. Pojavnost osteoporotičnih prijeloma u SAD u 1995 godini bila je oko 1,5 milijuna, od toga 750.000 vertebralnih prijeloma, 250.000 prijeloma kuka, 250.000 prijeloma u području ručnog zgloba te 250.000 prijeloma drugih lokalizacija. U EU prema jednom istraživanju iz 2010. g. zabilježeno je 3,5 milijuna prijeloma vezanih uz osteoporozu (17,7% kuk, 14,8% kralješnica) (Riggs i sur. 1995; Becker 2010; Svedbom 2013).

Prijelomi vezani uz osteoporozu predstavljaju veliki ekonomski trošak zbog velikog broja posjeta liječniku i hospitalizacija, a izuzmemo li socio-ekonomsku stranu osteoporotični prijelomi odgovorni su za znatan morbiditet, smanjenje kvalitete života zbog boli, gubitka ili otežane mobilnosti te gubitka neovisnosti i samopouzdanja (Pasco i sur. 2005). U Europi će se broj ljudi u životnoj dobi od 65 i više godina povećati s oko 68 milijuna 1990. godine na više od 133 milijuna 2050. godine, a u Aziji od oko 145 milijuna na preko 894 milijuna. Samo taj demografski trend dovest će do povećanja broja prijeloma kuka s oko 1,7 milijuna 1990. godine na procijenjenih 6,3 milijuna 2050. godine. Kada se zbroje statističke procjene za cijeli svijet i kada se uzme u obzir da će u visoko razvijenim zemljama (Europa i Sjeverna Amerika) trend povećanja broja osteoporotičnih prijeloma biti zaustavljen zahvaljujći prevenciji i liječenju (a već sada se uočava zaustavljanje toga trenda), dok se procjenjuje da će se u ostatku svijeta broj osteoporotičnih prijeloma kuka povećavati po stopi od 3% na godinu, tada se 2050-te može očekivati više od 21 milijun prijeloma kuka (Pećina i sur. 2007).

Ako gledamo epidemilološke podatke vezane uz pojavnost osteoporoze i njezinih posljedica ovisno o zemljopisnom položaju i rasi postoje znatne razlike. U svijetu je veća učestalost bolesti nađena u stanovništvu azijskih zemalja, dok je u Australiji učestalost manja u odnosu na europsko i sjevernoameričko stanovništvo bijele rase. Općenito, učestalost osteoporoze među bijelim stanovništvom Europe i SAD-a kreće se između 10% i 15%, dok među ženskim stanovništvom Azije (Jordan, Kina) iznosi i do 30% (Cvijetić i sur. 2007).

U Hrvatskoj nije poznata pojavnost osteoporotičnih prijeloma i prevalencija osteoporoze, ali provedena epidemiološka istraživanja mogu dati uvid u opsežnost ovog problema. U Hrvatskoj je danas 27% stanovništva u životnoj dobi iznad 60 godina, a preko 17% populacije je starije od 65 godina. U odnosu na broj stanovništva iz 2001. godine u Hrvatskoj se očekuje 200.000 bolesnika s osteoporozom i 400.000 s osteopenijom gdje 2/3 čine žene 1/3 muškarci (Giljevic 2005; Pećina i sur. 2007). Jedno od većih epidemiloških istraživanja rađeno na rizičnoj populaciji Hrvatske (14.324 ispitanika) a temeljem ultrazvučnog (UZV) mjerenja gustoće petne kosti pokazalo je da samo 16,8% ispitanika ima uredan nalaz, u 38,2% nađena je osteoporoza

a u 45% osteopenija od kojih su 95,2% bile žene, prosječne dobi od 60 godina. U muškaraca u dobi od 20 do 99 godina pokazano je da 16,2% muškaraca starijih od 50 godina ima osteoporozu te da se vršne vrijednosti koštane mase postižu u trećem desetljeću života (Kralik i sur. 2007). Prema drugom istraživanju a temeljem denzitometrijskog mjerenja na 10.308 bolesnika, u periodu od 2002. do 2004. prosječne dobi 60,2 godine dobili su se također podaci o učestalosti osteoporoze u Hrvatskoj. Navedeno istraživanje pokazalo je da 31,5% bolesnika ima osteoporozu, 45,8% osteopeniju te 22,7% uredan denzitometrijski nalaz (Giljevic 2005). Sve to ukazuje da je prevalencija osteoporoze u Hrvatskoj slična odnosno istovjetna onoj u razvijenim zemljama. Kaštelan i sur. su 2006 godine objavili ECUM istraživanje koje je dalo prve rezultate o učestalosti osteoporoze u muškoj populaciji Hrvatske (Kaštelan i sur. 2006).

Iako nije poznata učestalost osteoporotičnih prijeloma u RH, epidemiološki podaci objavljeni 2007. godine ukazuju na ozbiljosti problema koji se može porediti s onima iz razvijenih zemalja. Prema tom istraživanju u Hrvatskoj je 2005. bilo 5489 bolesnika s prijelomom kuka od kojih su 382 (6,96%) umrla od komplikacija vezanih za prijelom, a 97,38% umrlih bolesnika bilo je starije od 65 godina (Pećina i sur. 2007).

2.1.4. Rizični čimbenici za nastanak osteoporoze

Rizične čimbenike za nastanak osteoporoze i pojavnost koštanog prijeloma možemo podijeliti na one na koje ne možemo znatno utjecati takozvane neizmjenjive i na one na koje možemo utjecati, takozvane potencijalno izmjenjive čimbenike. Također treba navesti bolesti i stanja koja doprinose povećanom gubitku koštanoga tkiva, te lijekove vezane uz ovu patologiju, a o čemu će biti govora u poglavlju o sekundarnoj osteoporozi (Tablica 1 i 2).

U novije vrijeme, oksidacijski stres i slobodni radikali smatraju se odgovornima za procese starenja i razvoj osteoporoze o čemu će se opširno govoriti u poglavlju o oksidativnom stresu.

Neizmjenjivi čimbenici

U neizmjenjive čimbenike na prvom mjestu treba spomenuti <u>stariju životnu dob i ženski spol</u>.

Manjak estrogena povezan je je s brzom redukcijom u mineralnoj gustoći kostiju, a u muškaraca manjak testosterona ima usporediv, no manje izražen učinak (Poole i sur. 2006). Manjak

estrogena rezultira neravnotežom u koštanoj pregradnji koja vodi progresivnom gubitku trabekularne kosti zbog povećane osteoklastogeneze.

Pojačano stvaranje funkcionalnih osteoklasta najvjerojatnije nastaje kao rezultat povećanom izlaganju (djelovanju) osteoklastogeničnih proupalnih citokina kao što su interleukin-1, TNF koji su negativno regulirani estrogenom. Direktan učinak estrogena na ubrzanje osteoklastičke apoptoze pridonosi proizvodnji transformirajućeg čimbenika rasta β (TGF-β) (Sambrook i sur. 2006). U ovu skupinu možemo navesti: žene od 65 godina koje nisu na supstitucionoj terapiji estrogenim hormonima i imaju čimbenike rizika za frakturu (fraktura kuka u prethodnoj porodičnoj generaciji (npr. majka), neaktivan način života ili produžena imobilizacija, pušenje cigareta, unos nedovoljne količine kalcija prehranom -mala tjelesna masa), menopauza koja se pojavila prije 45. godine života a žena nije bila na hormonskoj terapiji, produžena amenoreja (Muratović 2016).

Etničke skupine pokazuju različitu pojavnost osteoporoze. Premda osteoporoza nastupa u ljudi svih etničkih skupina, ljudi europskog i azijskog podrijetla imaju veću predispoziciju za razvoj osteoporoze (Cvijetić i sur. 2007).

Nasljedni čimbenik također može biti čimbenik rizika. Povijest osteoporoze u obitelji ukazuje na veći rizik od obolijevanja; nizak BMD je nasljedan. Prema podacima najmanje trideset gena povezano je s razvojem osteoporoze (Raisz 2005). Kćeri majki s osteoporozom imaju manju koštanu masu od kćeri majki bez osteoporoze, međutim još se ne zna da li je to posljedica naslijeđa ili zajedničke izloženosti čimbenicima okoliša (Aganović 1993).

Spontane frakture kao čimbenik rizika u osoba s nasljednim čimbenicima dva puta povećavaju prijelom u usporedbi s drugima istih godina i spola (WHO Scientific Group 2003).

Potencijalno izmjenjivi čimbenici

Tu ubrajamo čimbenike na koje možemo djelovati i prevenirati nastanak i razvoj bolesti.

Nepravilna prehrana i loše životne navike vezane uz unos štetnih tvari u organizam ubrajaju se u čimbenike rizika na koje možemo utjecati. Male količine alkohola ne povećavaju rizik od osteoporoze i mogu čak biti korisne, ali kronično pijanstvo (unos alkohola veći od tri promila dnevno), posebno u mladim godinama, jako povećava rizik (Ilich i sur. 2000).

Nizak unos dijetnog kalcija i/ili fosfora, magnezija, cinka, i željeza ima negativan utjecaj na koštani metabolizam. Magnezij i fosfor, primjerice, nužni su za apsorpciju kalcija. Bakar je bitan za izmjenu tvari u koštanom tkivu, a mangan za izmjenu tvari u hrskavici. Nedostatak fluora i vitamina A, K, C i D mogu također biti čimbenici rizika. Pretjerano nizak pH u krvi može biti povezan s prehranom i može biti izrazito štetan za kost (Ilich i sur. 2000).

Smatra se da je nizak unos proteina povezan s manjom masom kostiju tijekom adolescencije i nižim BMD-om u starijih (Hannan i sur. 2000). Pretjerana konzumacija proteina u prehrani pak uzrokuje ekstrahiranje kalcija iz kostiju i izlučivanja urininom, što također uzrokuje osteoporozu (Sellmeyer i sur. 2001).

Pušenje duhana inhibira aktivnost osteoblasta. Pušenje takoder uzrukuje povećanu razgradnju egzogenog estrogena, smanjuje tjelesnu težinu i potiče raniju menopauzu, što sve pridonosi manjoj mineralnoj gustoći kostiju (WHO Scientific Group 2003).

Remodeliranje kostiju događa se kao odgovor na fizički stres. U starijih ljudi fizička aktivnost pomaže zadržati masu kostiju. Kontrolirana fizička aktivnost (hodanje, šetanje, vježbanje) može znatno povećati koštanu masu (Kaštelan 2000). Fizička neaktivnost ljudi vodi u velik gubitak koštane mase, a isto se može dogoditi pri letu u svemir. Imobilizacija također uzrokuje gubitak koštane mase. Gubitak koštane mase događa se u ljudi koji su nepokretni i vezani za kolica ili krevet. Nekada lokalizirana osteoporoza nastupa nakon duže imobilizacije slomljenog uda u gipsu (WHO Scientific Group 2003).

Navedenim čimbenicima mogu se dodati prekomjerno uživanje crne kave, pušenje cigareta visok unos fosfata, nedovoljna izloženost suncu (vitamin D), premala tjelesna težina (BMI<19 kg/m^2), nerotkinje (Kaštelan 2000; Pećina i sur. 2007).

Tablica 1. Rizični čimbenici za nastanak osteoporoze

Nasljedni i konstitucijski	**Bolesti**
- obiteljska predispozicija	- anoreksijska nervoza
- ženski spol	- hipogonadizam (manjak spolnih hormona)
- starija životna dob	- šećerna bolest ovisna o inzulinu
- gracilna konstitucija	- gracilna konstitucija
- kasna menarha	- hiperparatireoidizam
- prerana menopauza	- Cushingov sindrom
- prethodni prijelomi	- poremećaji gastrointestinalnog sustava
Način života	- reumatoidni artritis
- pušenje	- kronična bubrežna insuficijencija
- neaktivnost	- osteogenesis imperfekta
- nedovoljna izloženost suncu (vitamin D)	**Lijekovi**
- nerotkinje	- kortikosteroidi
- premala tjelesna težina (BMI<19 kg/m2	- antacidi
Prehrana	- antikonvulzivi
- mali unos kalcija hranom	- antikoagulansi (heparin)
- alkohol	- kemoterapija
- crna kava	- diuretici koji izazivaju kalciuriju
- prekomjerni unos bjelančevina	- fenotijazinski derivati
- diuretici koji izazivaju kalciuriju	

(Preuzeto od Kaštelan, 2000)

2.1.5. Podjela osteoporoze

Osteoporozu dijelimo na **Primarnu** koja može biti involucijska i idiopatska. U involucijsku se ubrajaju postmenopauzalna i senilna. U idiopatsku se ubrajaju juvenilna osteoporoza i osteoporoza u trudnoći. **Sekundarna osteoporoza** nastaje kao posljedica jasno definiranih uzroka (Tablica 2).

Tablica 2: Klasifikacija osteoporoze

I. PRIMARNA OSTEOPOPOROZA	
1. Involucijska osteoporoza	
a) postmenopauzna (tip I)	
b) senilna (tip II)	
2. Idiopatska osteoporoza	
a) juvenilna osteoporoza	
b) osteoporoza u trudnoći	
II. SEKUNDARNA OSTEOPOROZA	
ENDOKRINI UZROCI	NASLJEDNE BOLESTI
Cushingov sindrom	Osteogenesis imperfecta
Hipogonadizam	Homocistinurija
Hipertireoza	Ehlers-Danlosov sindrom
Hiperparatiroidizam	Marfanov sindrom
Šećerna bolest	Riley-Dayov sindrom
Akromegalija	Bolesti odlaganja glikogena
Hiperprolaktinemija	Anemija srpastih stanica
Anoreksija nervoza	Talasemija
	Hipofostazija
IJATROGENI UZROCI	
Kortikosteroidi	OSTALO
Heparin	Alkohol
Kemoterapija	Multipli mijelom
Tiroksin	Gastrointestinalne bolesti
Agonisti LH-RH	Kronična jetrena bolest
	Kronični opstruktivni bronhitis
	Reumatoidni artritis
	Malnutricija
	Karcinom
	Sistemska mastocitoza
	Hemokromatoza
	Imobilizacija

(Preuzeto od Koršić 1993)

Primarna osteoporoza

Predstavlja najčešći oblik osteoporoze o kojoj govorimo ako ne postoji jasno definirani osnovni uzrok. Ona je genetski uvjetovana, nastaje kao posljedica hormonskih promjena ili starenja (Bonura 2009).

1) Involucijska osteoporoza

Oblik je primarne osteoporoze koja se javlja u osoba starije životne dobi. U kliničkoj slici razlikujemo dva tipa involucijske osteoporoze – tip 1 koji se pojavljuje isključivo u žena, 15 - 20 godina nakon posljednje menstruacije, pa se još naziva postmenopauzni; te tip 2 koji se pojavljuje i u žena i muškaraca starijih od 70 godina (Koršić 1993).

a) Tip I-postmenopauzalna osteoporoza, najzastupljeniji je tip, a karakterizira ga niska razina estrogena u krvi. Zbog nedostatka estrogena dolazi do ubrzane pregradnje kosti, a ravnoteža u metabolizmu kostiju se pomiče prema osteoklastima. Resorpcija kosti je povećana, izlazak kalcija iz kosti je veći od njegova ulaska, pa je razina PTH i 1,25(OH)2D3 također snižena. Razina kalcija organizma postaje negativna. U osoba s ovim oblikom osteoporoze ustanovljen je nedostatak kalcija zbog premalog sadržaja kalcija u hrani i premale apsorpcije kalcija iz hrane. Višak glukokortikoidnih hormona nad androgenim hormonima pridonosi razgradnji kosti i smanjenoj sintezi vitamina D koji je potreban za apsorpciju kalcija i sintezu kosti. Zbog toga bolesnici s osteoporozom trebaju 20 - 30% više kalcija u hrani (≥ 500 mg na dan) nego normalne osobe da bi održale normalnu ravnotežu kalcija. Slične metaboličke promjene zapažene su u vrlo starih osoba s normalnim kostima, pa zato neki smatraju da osobe s osteoporozom u menopauzi imaju kostur za 25 g. stariji od stvarne kronološke dobi (Matovinović 1970). Zahvaćena je uglavnom trabekularna kost, a najčešći su kompresivni prijelomi kralješaka koji nastaju prilikom minimalne traume ili kod naglog pokreta tijela, podizanja težeg tereta, iako se mogu javiti i spontano. Bolest se često pojavljuje kao nagla bol u leđima.

b) Tip II- Senilna osteoporoza nastaje u visokoj životnoj dobi, obično iznad 70. godine života a zahvaća oba spola. Karakterizirana je smanjenom aktivnosti osteoblasta, te također smanjenom funkcijom bubrežnog enzima 25(OH) D1α hidroksilaze uz posljedično smanjeno stvaranje 1,25 dihidroksi vitamina D3 (1,25(OH)2D3), što vodi smanjenoj apsorpciji kalcija iz crijeva i sekundarnom hiperparatireoidizmu te povećanoj razgradnji kosti (Koršić i sur. 2008). Zahvaćena je kortikalna i trabekularna kost, a prijelomi bedrene kosti karakteristična su pojava senilne osteoporoze.

2) Idiopatska osteoporoza

Rijedak je oblik primarne osteoporoze, nepoznata uzroka koji se pretežito javlja u mlađih odraslih osoba (Rezaković 2008). Razlikujemo dva oblika idiopatske primarne osteoporoze, juvenilna osteoporoza i osteoporoza u trudnoći.

a) Juvenilna osteoporoza nejasne je patogeneze, javlja se kod adolescenata i mlađih muškaraca i žena. Karakteristike bolesti su prijelomi dugih kostiju. Zbog bolnih kompresivnih prijeloma metafiza potkoljenica hod je oprezan i spor. Bolesnici obaju spolova zaostaju u rastu, a u slučaju prijeloma kralješaka dolazi do razvoja grbe, trup je kratak. Bolest je vrlo rijetka, uzrok je možda privremeni zastoj u aktivnosti osteoblasta. U slučaju postojanja navedene simptomatologije svakako treba isključiti uzroke sekundarne osteoporoze tipa Cushingova sindroma, Osteogenesis inmperfecta, akutne leukemije i druge.

b) Osteoporoza u trudnoći rijetka je pojava i u ponovljenoj trudnoći se ne mora javiti. Za vrijeme trudnoće može doći do prijeloma kralješaka, boli u leđima te smanjivanja visine žene. Bol obično prolazi nekoliko mjeseci nakon porođaja, makar kost može ostati smanjene gustoće.

Sekundarna osteoporoza

Sekundarna osteoporoza ima svoje uzroke koji mogu biti endokrine bolesti (Cushingova bolest), kronične upalne bolesti (reumatoidni artritis), hematološke bolesti (multipli mijelom), a može se javiti i u određenim stanjima kao npr. kod dugotrajne imobilizacije. Uzrok joj mogu biti neki lijekovi kao npr. glukokortikoidi, antikonvulzivi, antiepileptici, inhibitori protonske crpke, retinoidi i dr. Patogenetski mehanizam obično je dobro poznat, a klasificira se ovisno o uzrocima na endokrine, genetske, ijatrogene i ostale oblike (Koršić 1993; Fitzpatrick 2002) (Tablica 1 i 2).

2.1.6. Dijagnoza osteoporoze

Dijagnoza osteoporoze najčešće se temelji na denzitometriji što je prema nekim autorima pogrešno. Denzitometrija nije metoda koja će nam odrediti s velikom točnošću rizik nastanka prijeloma. U procjeni rizika nastanka osteoporotičnih prijeloma denzitometrija (DXA; engl. *Dual Xray Absorptiometry*) prema tim autorima ima isto značenje kao, primjerice određivanje visokoga krvnog tlaka u procjeni nastanka moždanog udara. U postavljanju dijagnoze

osteoporoze i rizika nastanka njenih komplikacija važno je uzeti u obzir: 1. anamnezu, 2. klinički pregled, 3. rendgenogram torako-lumbalne kralješnice, 4. osnovne laboratorijske pretrage: krvna slika, Ca, Ca u mokraći, P i alkalna fosfataza, 5. denzitometriju (Pećina i sur. 2007).

Standardna radiografija pomaže u diferencijalnoj dijagnozi gdje nalaz poput kliničkog asimptomatskog prijeloma kralješka upozorava na rizik prijeloma ostalih kralježaka ili ostalih kosti na poznatim predilekcijskim mjestima. Kvantitativna kompjuterizirana tomografija (CT) pokazuje osobito stanje spongiozne kosti i može mjeriti stvarnu volumetrijsku gustoću kosti. Nedostatci CT-a su zračenje i cijena pretrage u usporedbi s DXA. Skeletalni status u osteoporozi može biti mjeren i kvantitativnom ultrazvučnom metodom baziranoj na atenuaciji brzine ultrazvučnih valova pri prolasku kroz petnu kost. Ova metoda ne može biti primijenjena izravno u dijagnozi osteoporoze, ali može poslužiti kao metoda probira utvrđivanja rizika prijeloma u žena poodmakle životne dobi i općenito kao metoda probira rizične skupine za nastanak, odnosno postojanje osteoporoze. Najlakši je način postavljanja dijagnoze osteoporoze, na temelju mjerenja koštane mineralne gustoće (BMD; engl. *Bone Mineral Density*), da se definira prag za normalne vrijednosti, a to je mlada zdrava populacija. Potom se na temelju odstupanja u obliku standardnih devijacija (SD) od te normalnih vrijednosti, napravi klasifikacija kao što je to učinila Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) i modificirala Međunarodna zaklada za osteoporozu (engl. *International Osteoporosis Foundation*) uz primjenu DXA. Kada se upotrebljavaju standardne devijacije u odnosu na mladu zdravu populaciju, to se mjerenje referira kao T-score (Pećina i sur. 2007). Prema preporuci SZO, BMD služi i za procjenu rizika nastanka osteoporotičnog prijeloma kao i praćenja učinkovitosti antiosteoporotičke terapije. Za žene u postmenopauzi i muškarce starije od 50. godina osteoporoza se definira smanjenjem prosječne vrijednosti BMD-a vrata bedrene kosti ili slabinske kralježnice od 2,5 standardne devijacije (SD) ili više u odnosu na prosječnu vrijednost za mladu odraslu populaciju zdravih žena (bijele rase) (Kanis i sur. 1994). Uredan nalaz je kada BMD ne odstupa za 1 SD od normalne vrijednosti, što se izražava kao BMD je veći ili jednak -1 SD. Niska koštana masa ili osteopenija dijagnosticira se kad je BMD, odnosno T-score između -1 i -2,5 SD, a osteoporoza je prisutna kada je T-score ispod -2,5 SD. Teška osteoporoza je stanje kada je T-score ispod -2,5 SD uz postojanje jednog ili više osteoporotičnih prijeloma. Postoje razlike u uspješnosti predviđanja prijeloma s obzirom na tehniku mjerenja i mjesto mjerenja BMD-a. Tako je najpouzdanije predviđanje za mjerenje u području kuka, naravno za sam prijelom kuka (1,5 do 3,0 gradijent rizika prijeloma za svaku SD), ali i za prijelome drugih

kostiju. Denzitometrija područja lumbalne kralješnice pouzdanija je za predviđanje prijeloma kralješka, ali je za predviđanje prijeloma ostalih kosti manje pouzdana od denzitometrije vrata femura (kuka).

Ultrazvučna denzitometrija ne zaostaje mnogo za DXA u predviđanju rizika prijeloma osteoporotičnih kostiju. U procjeni rizika nastanka osteoporotičnih prijeloma kosti važni su i biokemijski pokazatelji metabolizma kosti, tj. pokazatelji (biljezi) resorpcije i izgradnje kosti, među kojima je jedan od pokazatelja izgradnje kosti totalna alkalna fosfataza, a resorpcije kosti hidroksiprolin. Uz biokemijske pokazatelje u procjeni rizika nastanka prijeloma treba uzeti i sve navedene kliničke rizične čimbenike – od ženskog spola, do neprikladne prehrane i pušenja. Poznavajući i znajući metode određivanja rizične skupine za osteoporotične prijelome kosti, postavlja se pitanje strategije načina otkrivanja individua s povećanim rizikom prijeloma kosti. Ne postoji jedinstveno stajalište o potrebi masovnog probira (engl. *screening*), već prevladava mišljenje o potrebi individualnog pristupa (engl. *a case finding strategy*) kada se pojavi pacijent s prijelomom ili se nađe pacijent s izrazitim čimbenicima rizika za nastanak prijeloma. Treba promatrati pacijenta određene životne dobi i u pogledu tzv. 10-godišnje vjerojatnosti nastanka osteoporotičnog prijeloma određene lokalizacije. U Švedskoj je za 70-godišnje muškarce s osteoporozom vjerojatnost nastanka prijeloma kuka u sljedećih 10 godina života 10,59%, a za žene 21,7%. Postavlja se i pitanje dužine medikamentoznog liječenja i s time u vezi pitanje isplativosti (engl. *cost/effective*) liječenja. Izračun isplativosti liječenja temelji se na slijedećim parametrima: životnoj dobi, postignutom T-scoru tijekom denzitometrije i krivulje vjerojatnosti nastanka prijeloma u sljedećih 10 godina života. Postoji mišljenje da se dijagnoza osteoporoze temelji na odrađivanju BMD-a s pomoću DXA, a potreba intervencije (liječenja) na temelju izračunavanja vjerojatnosti nastanka osteoporotičnog prijeloma (Pećina i sur. 2007).

Metode mjerenja koštane mase

Postoji više metoda mjerenja gustoće minerala u kostima (BMD) i količine minerala u kostima (BMC; engl. *bone mineral content*), koje se podudaraju s koštanom masom, na temelju kojih se može s visokom sigurnošću procijeniti koštana masa i dijagnosticirati osteoporoza. Te metode koriste različite izvore energije, primjerice x-zračenje, foto-energiju, ultrazvuk.

Dvoenergetska apsorpciometrija X-zraka (DXA**;** engl. *dual x-ray absorptiometry*) je danas zlatni standard u dijagnostici i liječenju osteoporoze zbog svoje preciznosti, jednostavnosti, široke dostupnosti te minimalnog zračenja. DXA je metoda koja se koristi x-zrakama dvije

jačine u vrlo maloj dozi koje se propuštaju kroz kost, iza kosti senzori mjere x-zrake koje su prošle kroz kost, a rezultat se obrađuje u elektroničkom računalu. Razlika energije propuštenih i apsorbiranih x-zraka omogućuje procjenu gustoće minerala kosti koja se izražava u apsolutnim vrijednostima u g/cm^2) i kao T vrijednost [odstupanje izmjerene vrijednosti BMD-a od vršne koštane mase mladih osoba izraženo u standardnim devijacijama (SD)] (Bonura 2009). Z–vrijednost predstavlja odstupanje dobivene vrijednosti od očekivane u odnosu na spol, životnu dob te se izražava u postotcima (%) i SD-u. BMD se mjeri u području slabinske kralježnice, vrata bedrene kosti (kuk) i donje trećine palčane kosti. Pretraga traje 10 - 15 minuta, ne zahtijeva nikakvu pripremu, osim odstranjenja metalnih dijelova s odjeće. Izvodi se sjedeći i držeći podlakticu na ležaju aparata ili ležeći na njemu.

Kvantitativni ultrazvuk (QUZV) je metoda koja posredno mjeri koštanu masu i strukturu kosti temeljem brzine i atenuacije ultrazvučnih valova. Kao najprikladnije mjesto za mjerenje najčešće se koristi petna kost zbog svoje dostupnosti i velikog sadržaja spužvaste kosti (90%). Ultrazvučno mjerenje mineralne gustoće kosti dobro se podudara s rezultatima DXA, nema x-zračenja, ali nije pogodno za praćenje učinka liječenja u kliničkom radu s bolesnicima zbog velikog osciliranja rezultata, pa se više koristi u epidemiološkim istraživanjima (Stewart i sur. 2000; Khaw i sur. 2004).

Biokemijski biljezi koštane pregradnje

Danas je u upotrebi niz biokemijskih biljega pregradnje kostiju, uključujući biljege izgradnje i razgradnje kostiju. Oni su enzimi ili bjelančevine koji nastaju tijekom izgradnje ili razgradnje koštanog tkiva a mjere se u serumu ili urinu.

Oni pružaju klinički korisne dokaze normalnih i patoloških procesa, koji odražavaju aktivnosti koštanih stanica u skeletu.

Općenito se dijele na:

a) enzimske biljege izgradnje (vezane uz aktivnost osteoblasta) i razgradnje kostiju (vezane uz aktivnost osteoklasta);

b) proteine koštanog matriksa i razgradne produkte organskoga skeletnog matriksa koji se otpuštaju u cirkulaciju za vrijeme izgradnje ili razgradnje kostiju; te

c) biljege anorganskoga koštanog matriksa (kalcij i fosfor, koji prije svega odražavaju homeostazu kalcija/fosfora i koji u ovom pregledu neće biti razmatrani).

U Tablicama 3 i 4 prikazani su biljezi koštane pregradnje koji se danas koriste, njihovo tkivno podrijetlo, fiziološki uzorak u kojem se mjeri njihova koncentracija/aktivnost te raspoložive analitičke metode (Tablica 3 i 4) (Čepelak i sur. 2009).

Tablica 3. Biljezi izgradnje kostiju

BILJEG	TKIVNO PODRIJETLO	UZORAK ZA ANALIZU	ANALITIČKA METODA
Ukupna alkalna fosfataza (ALP); specifičan biljeg kod ljudi koji nemaju bolesti jetre i žučnih vodova	Kost, jetra	Serum	Kolorimetrija
Koštana alkalna fosfataza (B-ALP); specifični produkt osteoblasta	Kost	Serum	Kolorimetrija, elektroforeza, IRMA, EIA
Osteokalcin (OC); specifični produkt osteoblasta, postoji više reaktivnih formi u krvi, neke mogu nastati tokom koštane resorpcije	Kost, trombociti	Serum	RIA, ELISA, IRMA, ECLIA
C-terminalni propeptid prokolagena tipa I (PICP) ; produkt osteoblasta i fibroblasta	Kost,koža, meka tkiva	Serum	RIA, ELISA
N-terminalni propeptid prokolagena tipa I (PINP); produkt osteoblasta i fibroblasta	Kost, koža	Serum	RIA, ELISA

Kratice: IRMA, imunoradiometrijski test (engl. *immunoradiometric assay*); EIA, enzimski imunotest (engl. *enzyme immunoassay*); RIA, radioimunotest (engl. *radio immuno assay*); ELISA, enzimsko imunokemijska metoda (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*); ECLIA, elektrokemiluminescentna munokemijska metoda (engl. *electrochemiluminiscence immunoassay*) (Preuzeto i prilagođeno od Čepelak i sur. 2009)

Tablica 4. Biljezi razgradnje kostiju

BILJEG	TKIVNO PODRIJETLO	UZORAK ZA ANALIZU	ANALITIČKA METODA
Hidroksiprolin (OHP); prisutan u novostvorenom i starom kolagenu	Koža,kost, hrskavica, meka tkiva	Urin	Kolorimetrija, HPLC
Piridinolin (PYD); uglavnom prisutan u starom kolagenu	Kost, hrskavica, tetive	Urin	HPLC, ELISA
Deoksipiridinolin (DPD); uglavnom prisutan u starom kolagenu	Kost	Urin	HPLC, ELISA
Telopeptidi kolagena tipa I (CTX, NTX)	Sva tkiva koja sadrže kolagen tipa I	Urin, serum	ELISA, RIA, ECLIA, ICMA
Hidroksilizin-glikozidi (Hyl-Glyc)	Kost,koža, meka tkiva, serum, komplement	Urin	HPLC, ELISA
Koštani sijaloprotein (BSP); izražava aktivnost osteoklasta	Kost, hipertrofična hrskavica	Serum	RIA, ELISA
Tartarat-rezistentna kisela fosfataza (TR-ACP)	Kost, krv	Plazma, serum	Kolorimetrija, RIA,ELISA
γ-karboksi glutaminska kiselina (GLA)	Kost, krv	Serum, urin	HPLC

Kratice: HPLC, Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*); ELISA, enzimsko imunokemijska metoda (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*); RIA, radioimunotest (engl. *radio immuno assay*); ECLIA, elektrokemiluminescentna munokemijska metoda (engl. *electrochemiluminiscence immunoassay*); ICMA, imunokemiluminometrijska metoda (engl. *immunochemiluminometric assay*) (Preuzeto i prilagođeno od Čepelak i sur. 2009)

Poznata temeljna prednost biokemijskih biljega u odnosu na mjerenje mineralnog sadržaja kosti i statičku histomorfometrijsku analizu biopsije kosti jest činjenica da njihovom uporabom dobivamo informaciju o statusu koštane pregradnje. Biokemijski su biljezi uz to i neinvazivna pretraga u usporedbi sa statičkom histomorfometrijskom analizom. Informacija o dinamičkom stanju metabolizma kostiju mogla bi ranije ukazati na neke patološke promjene u kostima, odnosno na rizik nastanka nekih bolesti kostiju. Mjerenjem koncentracije/aktivnosti biokemijskih biljega moguće je nadalje dobiti bržu informaciju o terapijskom odgovoru u odnosu na mjerenje koštane mase. Značajne promjene biokemijskih biljega mogu se, naime, otkriti već nakon 1-3 mjeseca djelotvorne terapije, dok se promjena koštane mase može odgovarajuće procijeniti tek nakon 1. ili 2. godine. Potrebu za pronalaženjem specifičnih biokemijskih biljega naglašava i primjena novih, vrlo učinkovitih lijekova, koji snažno djeluju na metabolizam kostiju. Zajedno s mjerenjem koštane mase pokazuju se korisnima i u prognozi bolesti. Nedvojbeno je do sada pokazano da su neki od biljega ili kombinacije biljega, navedeni u Tablicama 3. i 4. korisni u populacijskim i epidemiološkim ispitivanjima te praćenju učinka antiresorpcijske terapije. Međutim, s obzirom na neprestani razvoj novih, specifičnijih postupaka za njihovo mjerenje, konačna procjena njihove kliničke korisnosti u obradi bolesnika još je uvijek u tijeku. Preporuke su stoga i nadalje da se maksimalna pažnja posveti pitanju trebaju li se i kako uopće koristiti biljezi, te standardizaciji predanalitičkih i analitičkih postupaka mjerenja koštanih biljega (Čepelak i sur. 2009).

Koštana histomorfometrija

Za razliku od ostalih dijagnostičkih metoda, histomorfometrija jedina omogućava precizno proučavanje i mjerenje kosti na tkivnom i staničnom nivou. Osim toga, omogućava i mjerenje dinamike koštanog metabolizma (dinamička histomorfometrija). U istraživačke svrhe može se provesti na praktički svakom dijelu skeleta, no najčešće se provodi na trupu kralješka i proksimalnom okrajku femura. U kliničkom radu obično se provodi transilijakalna biopsija. Ne zahtijeva ekstenzivan kirurški zahvat, a bolesnici ga obično dobro podnose. Osigurava dobivanje veće količine spongiozne kosti te obje kortikalne kosti. Uzorak kosti dobiven biopsijom odmah se fiksira (70% etanol, apsolutni metanol ili 10% puferirani formalin). Uzorak se po fiksaciji i dehidrataciji kroz alkohole rastućih koncentracija, nedekalciniran uklapa u plastične monomere koji polimerizacijom postaju tvrdi poput same kosti, te na taj način omogućuju njeno rezanje, umanjujući mogućnost pucanja i nabiranja rezova uzoraka. Mikrotomom koji je opremljen posebnim nožem za rezanje tvrdih tkiva i kosti (tungsten

karbidni nož, dijamantni ili stakleni noževi) režu se serijski rezovi debljine 5 do 20 μm i boje različitim histološkim metodama koje omogućuju pregled određenih strukturalnih elemenata koštanog tkiva. Sam postupak mjerenja određenih histomorfometrijskih parametara vodi se osnovnim zakonitostima stereometrijskih mjerenja i preduvjet je za točnost opisa rezultata histomorfometrije. To se prvenstveno odnosi na broj odabranih vidnih polja i broj histoloških rezova određenog koštanog uzorka, te njihova međusobna udaljenost koja mora biti unaprijed utvrđena. Zatim se pristupa samom mjerenju koje se danas većinom izvodi pomoću različitih računalnih programa koji omogućuju kvantitativnu analizu mikroslike (Zoričić 2008).

Histomorfometrija ima dijagnostičku vrijednost kao metoda kojom se određuje kvaliteta kosti tj. njena unutarnja struktura za razliku od primjerice DXA, kojom se dobiva količina kosti koja nije jedina odrednica mehaničke čvrstoće i jakosti kosti. Zbog izuzetno visoke cijene, kompliciranosti postupka, nedostupnosti te dugog vremena do dobivanja rezultata ne spada u rutinske dijagnostičke metode i koristi se kod slučajeva koji ne reagiraju dobro na primijenjenu terapiju kao i u nejasnim etiologijama poremećaja koštanog metabolizma. Najveća joj je primjena u pretkliničkim i kliničkim istraživanjima lijekova u terapiji osteoporoze, te drugih poremećaja koštanog metabolizma (Kulak i sur. 2010).

2.1.7. Prevencija nastanka osteoporoze i njezinih posljedica

Prevencija kao skup mjera kojima sprečavamo nastanak, odnosno razvoj osteoporoze i njezinih posljedica je ponajprije stvar primarne zdravstvene zaštite i liječnika opće medicine koji vodi svoga pacijenta i općenito je pitanje učinkovite javnozdravstvene akcije u podizanju svijesti naroda o značenju osteoporoze i o mogućnostima izbjegavanja čimbenika rizika za nastanak osteoporotičnih prijeloma. Nefarmakološke mjere usmjerene su uklanjanju čimbenika koji pogoduju gubitku koštane mase. To su pravilna prehrana i dostatan unos kalcija i vitamina D. Kalcij smanjuje brzinu pregradnje kosti te usporava gubitak koštane mase, a vitamin D je nužan za apsorpciju kalcija iz probavnog sustava. Glavni izvor kalcija u hrani su mlijeko i mliječni proizvodi. Preporučeni dnevni unos elementarnog kalcija za ženu u menopauzi je 1200 mg (US Department of Health and Human Services, 2004), što je puno više od prosječnog dnevnog unosa za tu dob. Hrana bogata vitaminom D je prvenstveno riba (tuna, sardine, skuša, bakalar, haringa, losos), škampi, goveđa jetra, žumanjak jajeta, sir i mliječni proizvodi, neke vrste gljiva te kvasac.

Budući da današnja prehrana i zapadnjački način života rezultiraju unosom nedovoljno uravnoteženih i kvalitetnih nutrijenata, te da je unos ribe maksimalno smanjen, svakako se

preporuča dodatan unos vitamina D putem prehrambenih dodataka. Od nedostatka vitamina D posebno su ugrožene starije osobe, osobito one koje se zadržavaju unutar zatvorenih prostorija (nedovoljna izloženost suncu) te osobe s neadekvatnom prehranom, malapsorpcijom i kroničnim bolestima jetre i bubrega. Dnevna potrebna doza vitamina D za ososbu od 50 do 70 godina je 500 I.J. a za osobe starije od 70 godina 600 I.J. Većina istraživanja vezana uz prehranu koncentrirana je na kalcij i Vitamin D, međutim brojni radovi ukazuju na povezanost između povećanog unosa voća i povrća s povećanjem koštane mase. Tu svakako treba spomenuti flavonoide o kojima će biti riječi u slijedećim poglavljima i na kojima se temelji ovo istraživanje. Oni su bioaktivni polifenolni spojevi pronađeni u mnogim biljkama koje čovjek koristi u svojoj prehrani (Tucker 1999; Dang 2005; Chen 2006; Zalloua 2006; Prynne 2006; Rahmani i sur. 2009).

Prestanak pušenja i prekomjernog uživanja alkohola važne su preventivne mjere. Vrlo važno je voditi brigu o lijekovima koje bolesnik uzima. Vrlo oprezno treba propisivati anksiolitike, sedative, hipnotike i diuretike jer su to lijekovi koji mogu dovesti do ortostatske hipotenzije te povećati rizik od pada i prijeloma. Oprezno treba postupati s lijekovima koji ubrzavaju gubitak koštane mase kao što su glukokortikoidi, antikonvulzivi, hormoni štitnjače te agonisti hormona koji oslobađa gonadotropine (LH-RH – agonisti).

Tjelesna aktivnost usporava ili zaustavlja gubitak koštane mase, a kontinuirana tjelesna aktivnost, prilagođena željama i sposobnostima osobe korisna je preventivna mjera. Tjelesnom aktivnošću poboljšava se mišićna te održava neuromuskularna koordinacija a smanjuje se rizik od pada i prijeloma. Potrebno je prilagoditi i okoliš bolesnika kako bi se izbjegli čimbenici koji povećavaju rizik od pada (skliski podovi, slaba rasvjeta, stepenice) (Pećina i sur. 2007; Rahmani i sur. 2009).

2.1.8. Farmakološka terapija osteoporoze

Lijekovi za osteoporozu se dijele prema načinu djelovanja u dvije skupine: antiresorptivne, tj. lijekove koji sprečavaju razgradnju kosti te osteoanbolike, tj. stimulatore stvaranja kosti.

U antiresorptivne lijekove ubrajaju se bisfosfonati (alendronat, etidronat, risedronat, ibandronat i dr.) koji predstavljaju tzv. "zlatni standard" u liječenju osteoporoze, selektivni modulatori estrogenskih receptora ili tzv. SERM-ovi (SERMs; engl. *selective estrogen receptor modulators*) (raloksifen), hormonska nadomjesna terapija (HRT; engl. *hormon replacement therapy*), kalcitonin.

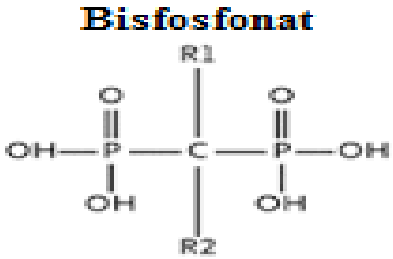
U anaboličke lijekove spada rekombinirani paratiroidni hormon (PTH; engl. *parathyroid hormon*) - teriparatid, fluorid i stroncijev ranelat (Rahmani i sur. 2009; Gates i sur. 2009; Body i sur. 2010).

Bisfosfonati

To su nehormonski antiresorpcijski lijekovi, snažni inhibitori resorpcije kosti, posebice na mjestima pojačane pregradnje. Trenutno su prvi lijek izbora u liječenju osteoporoze. Primjenjuju se kroz tjedni (alendronat, risedronat), odnosno mjesečni (ibandronat) oblik, a razvijeni su i bisfosfonati za intravensku primjenu (pamidronat, zolendronat, ibandronat).

Struktura i podjela

Prema kemijskoj građi, bisfosfonati su analozi anorganskog pirofosfata P-O-P u kojih je jedan atom kisika veze zamijenjen ugljikom P-C-P (Slika 5). Kao posljedica takve strukture bisfosfonati posjeduju fizikalno-kemijska svojstva: rezistenciju na hidrolizu i djelovanje pirofosfataze te time postojanost u staničnom mediju (Palomo 2006; Badran 2009).



Slika 5. Opća struktura bisfosfonata (Preuzeto od Favus 2010)

Obzirom na kemijski sastav, razlikuju se dvije glavne podskupine: aminobisfostonati i neaminobisfosfonati (alkilbisfosfonati). Prema redoslijedu pojavljivanja na tržištu dijele se na tri generacije. Prvu generaciju čine neaminobisfosfonati, karakterizira ih kratki alkilni bočni lanac, a najvažniji predstavnici ove skupine koji su se do danas zadržali u kliničkoj primjeni su etidronat i klodronat. Druga generacija bisfosfonata uključuje aminobisfosfonate koji imaju terminalnu amino skupinu u pobočnom lancu. Svi bisfosfonati ove skupine nalaze se u kliničkoj primjeni, a najvažniji predstavnici su alendronat i pamidronat. Treću generaciju bisfosfonata također čine aminobisfostonati, a atom dušika se nalazi u heterocikličkom prstenu kao kod

risedronata i zoledronata, ili u pobočnom lancu kao kod ibandronata (Palomo 2006; Badran 2009).

Mehanizam djelovanja

Bisfosfonati utječu na koštanu pregradnju djelovanjem različitih mehanizama. Čvrsto se vežu za hidroksiapatit i sprečavaju njegovo otapanje, inhibiraju aktivaciju osteoklasta čime se smanjuje brzina koštane resorpcije te povećavaju diferencijaciju osteoblasta. Učinci bisfosfonata mogu se promatrati na tri razine: molekularnoj, tkivnoj i staničnoj. Na molekularnoj razini razlikujemo dva mehanizma. Starije generacije alkilnim postraničnim lancem koji ne sadrži dušik, metaboliziraju se u citotoksične ATP-bisfosfonatne analoge i tako modificiraju stanične funkcije. Bisfosfonati koji sadržavaju dušik inhibiraju enzime u biosintezi mevalonata. Iako potrebni za sintezu kolesterola, intermedijatori puta mevalonata, kao što je farnezilpirofosfat sintetaza (FPPS) i geranilgeranilpirofosfat potrebni su i za posttranslacijsku modifikaciju GTP-vezujućih proteina koji reguliraju staničnu proliferaciju, preživljavanje, promet kroz membranu i organizaciju citoskeleta te uzrokujeu promjene na staničnoj razini kao što su smanjenje osteoklastične aktivnosti, smanjeno oslobađanje citokina, povećanje osteoblastične diferencijacije i njihovog broja. Kumulativni učinak staničnih promjena dovodi do promjene na razini tkivauključujući smanjenje koštane pregradnje, smanjenje broja novih koštanih višestaničnih jedinica te povećanje koštane mase jer stvaranje kosti nadilazi resorpciju kosti (Rodan 2002).

Način primjene i neželjeni učinci

Osteoporoza se liječi uobičajeno peroralnim uzimanjem bisfosfonata kroz duži period u malim dozama. Peroralno, bisfosfonati se trebaju uzimati natašte, nakon noćnog gladovanja (barem 6 sati) i prije uzimanja prvog jutarnjeg obroka ili pića, uz punu čašu obične vode (180 do 240 mL) dok bolesnik stoji ili sjedi u uspravnom položaju. Tablete treba progutati cijele, ne žvakati, sisati ili zdrobiti tabletu zbog mogućeg nastanka ulceracije u ustima i ždrijelu. Nakon uzimanja pripravka pacijent ne smije konzumirati hranu najmanje sljedećih 30 minuta, ni leći sljedećih 60 minuta. Nadomjesne pripravke (koji sadrže kalcij i ostale multivalentne katione kao što su aluminij, magnezij i željezo), kao i mineralnu vodu trebalo bi izbjegavati pri uzimanju jer mogu smanjiti apsorpciju bisfosfonata (Agencija za lijekove i medicinske proizvode 2012).

Neželjeni učinci pojedinog bisfosfonata ovise o brojnim čimbenicima kao što su njegov kemijski sastav, način primjene, doza i vrijeme trajanje terapije. Ipak, tri su najčešće zabilježene nuspojave: poremećaji probavnog sustava, nefrotoksičnost i reakcija akutne faze. Gastrointestinalne tegobe (bol u abdomenu, mučnina, povraćanje, ezofagitis, gastrični ulkus, diareja) vezane su uglavnom za oralnu primjenu. Pri prvoj primjeni, intravenski primljeni bisfosfonati mogu izazvati čitav niz simptoma nalik gripi, kao što su subfebrilna temperatura (37,8 °C), leukocitoza, iscrpljenost, mialgija te koštana bol. Nadalje, brza intravenska primjena može djelovati nefrotoksično i izazvati akutnu nekrozu tubula. Ostale moguće nuspojave su hipokalcijemija, očne komplikacije (konjuktivitis, uveitis, skleritis), astma, eritem, flebitis te poremećaji središnjeg živčanog sustava (glavobolja, omaglica, parestezija, poremećaj okusa).

Kao ozbiljna i iznimno teško lječiva komplikacija pri primjeni ovi snažnih antiresoptivnih lijekova javlja se osteonekroza čeljusti tzv. bisfosfonatima inducirana osteonekoza čeljusti (BRONJ; engl. *Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw* (Ficcara 2005; Agencija za lijekove i medicinske proizvode 2012).

Selektivni modulator estrogenskih receptora

Glavni predstavnik skupine je raloksifen koji se veže na estrogenske receptore i inhibira koštanu razgradnju bez stimulacije endometrija i žljezdanog tkiva dojki. Antagonističko djelovanje postiže vezanjem na estrogenske receptore koje modulira tako da sprječava vezanje regulacijskih proteina i tako aktivaciju receptora (Jensen i sur. 2003). Pozitivno djelovanje na koštanu pregradnju postiže blokiranjem aktivacije čimbenika rasta β3, što dovodi do osteoblastične diferencijacije i apoptoze osteoklasta (Yang i sur. 1996).

Prema dosadašnjim istraživanjima dnevno uzimanje raloksifena u dozi od 60 mg povećava BMD te smanjuje rizik od nastanka estrogen osjetljivog pozitivnog invazivnog karcinom dojke za 55-90% (Delmas 2008). Preporučuje se bolesnicima s velikim rizikom od nastanka vertebralnih prijeloma koji ne toleriraju bifosfonatnu terapiju, u žena koje imaju kliničke ili denzitometrijske pokazatelje osteoporoze, s blagim ili bez menopauzalnog sindroma te koje ne žele uzimati hormonsku nadomjesnu terapiju, odnosno kod kojih postoji rizik od nastanka estrogen osjetljivog karcinoma dojke (Gates i sur. 2009). Kao neželjene promjene ovoga lijeka navode se vrućine, grčevi u nogama, artralgije, te postoji rizik od nastanka duboke venske tromboze i plućne embolije (Cranney i sur. 2002; MacLean i sur. 2008).

Hormonsko nadomjesno liječenje

Hormonsko nadomjesno liječenje (HRT; engl. *hormone replacement therapy*) ima povoljan učinak na porast mineralne gustoće kosti te smanjenje rizika prijeloma čak i kod postmenopauzalnih žena koje ne boluju od osteoporoze (Rozenberg i sur. 1994). HRT se u 80% žena započinje u perimenopauzi, odnosno u prve tri godine postmenopauze. Indikacija je smanjenje klimakteričnih tegoba, urogenitalne atrofije i povoljan učinak na porast mineralne gustoće kosti. Dugotrajna primjena HRT ima svoje nedostatke u povećanom riziku od nastanka karcinoma u estrogensko ovisnim tkivima uključujući dojku i endometrij, zatim tromboembolijskih bolesti i cerebrovaskularnih bolesti. Ne preporučuje se kao prva linija u liječenju osteoporoze i koristi se u kombinaciji s drugim farmakološkim pripravcima (Rossouw i sur. 2002; Gates i sur. 2009).

HRT je kontraindicirana u osoba s karcinomom dojke i endometrija, kod onih koji boluju od cerebrovaskularnih bolesti ili tromboembolijskih bolesti, ne smije se prepisati ženama koje nisu ušle u menopauzu, a u simptomatskih žena HRT treba provoditi kraće vrijeme (Rossouw i sur. 2002).

Kalcitonin

Inhibitor je aktivnosti osteoklasta tako što im mijenja citoskeletnu strukturu pri čemu postaju neučinkoviti ali ne ulaze u apoptozu. Kalcitonin nije snažan antiresorptivni lijek, učinak mu je znatno veći u trabekularnoj kosti, što znači da ima više koristi kod liječenja vertebralnih prijeloma. Njegova primjena nije prikladna za žene u ranoj postmenopauzi, a preporučuje se ženama s osteoporozom koje su u postmenopauzi duže od 5 godina. Najčešća neželjena djelovanja ovoga lijeka su rinitis i epistaksa (Chesnut i sur. 2000; Gates i sur. 2009).

Rekombinirani paratiroidni hormon (PTH; engl. *parathyroid hormon*)- teriparatid

Sintetski je rekombinantni hormon koji se sastoji od prve 34 aminokiseline paratiroidnog hormona i spada u anaboličke lijekove koji potiču koštanu izgradnju. Anabolički učinak PTH ostvaruje se putem stimulacije receptora na osteoblastičnim stanicama, na koje se vežu PTH i PTH sličan protein (PTHrP; engl *PTH-related peptide*) te se zovu PTH-PTHrP receptori. Stimulacija ovih receptora povećava broj osteoblasta stimuliranjem stanične replikacije i inhibira osteoblastičnu apoptozu (Body i sur. 2010). Primjenjuje se potkožnim putem u dnevnoj

dozi od 20 µg tijekom 24 (18) mjeseca, smanjuje rizik za prijelome prvenstveno kralježnice (Ann Intern Med 2008). Teriparatid se može preporučiti i bolesnicima u kojih je izostao učinak na bisfosfonate. Prekidom primjene nastaje brzi gubitak kosti i potrebna je zaštita BMD-a, uglavnom bisfosfonatima. Teriparatid je kontraindiciran kod Pagetove bolesti, hiperparatireodizma, bolesnika sa zloćudnim bolestima skeleta ili koštanim metastazama, ranijih zračenja skeleta, već postojeće hiperkalcemije. Učinkovitost i sigurnost primjene teriparatida nema dokaza za dulje od dvije godine primjene. Primjena: odobren za liječenje osteoporoze s visokim rizikom za prijelom u postmenopauzalnih žena i muškaraca, u bolesnika s glukokortikoidima induciranom osteoporozom. Prednosti: potiče stvaranje nove kosti, povećava mineralnu gustoću i smanjuje rizik od vertebralnih prijeloma za 65% i nevertebralnih prijeloma za 53% u bolesnika s osteoporozom, nakon prosječno 18 mjeseci liječenja (Neer 2001; Canalis 2007; Ann Intern Med 2008).

Stroncij ranelat

Odobren je za liječenje teške postmenopauzalne osteoporoze s visokim rizikom od prijeloma te kod muškaraca s povećanim rizikom od prijeloma. Kontraindikacija za primjenu u bolesnika s ishemijskom bolesti srca, perifernom arterijskom bolesti, cerebrovaskularnom bolesti ili anamnezom ovih bolesti, te u bolesnika s nekontroliranom hipertenzijom (EMA 2013). Povećava mineralnu gustoću kosti i smanjuje rizik za prijelome kralježnice za 41%, a smanjuje rizik nevertebralnih prijeloma za 19% tijekom 3 godine liječenja (Meunier 2004; Reginster 2005). Nedostaci su mu blaga mučnina i proljev obično u prva 3 mjeseca liječenja. Treba biti pažljiv u bolesnika s povećanim rizikom od DVT, uključujući i one s pozitivnom anamnezom. Odluka o propisivanju stroncij ranelata mora se temeljiti na pažljivoj individualnoj procjeni ukupnog rizika svakog bolesnika.

Današnja farmakološka terapija osim svoje učinkovitosti u liječenju osteoporoze ima svoja ograničenja u primjeni, a dugotrajna primjena lijekova pokazala je neželjene učinke koji u nekim slučajevima zahtijevaju prekid terapije. Sve to otvara mogućnosti za alternativni farmakološki pristup koji bi u kliničkoj praksi dobio učinkovit ekonomski isplativ lijek, sa daleko manje nuspojava od trenutnih lijekova, i koji bi se mogao koristiti kao samostalan ili u kombinaciji sa već postojećom terapijom.

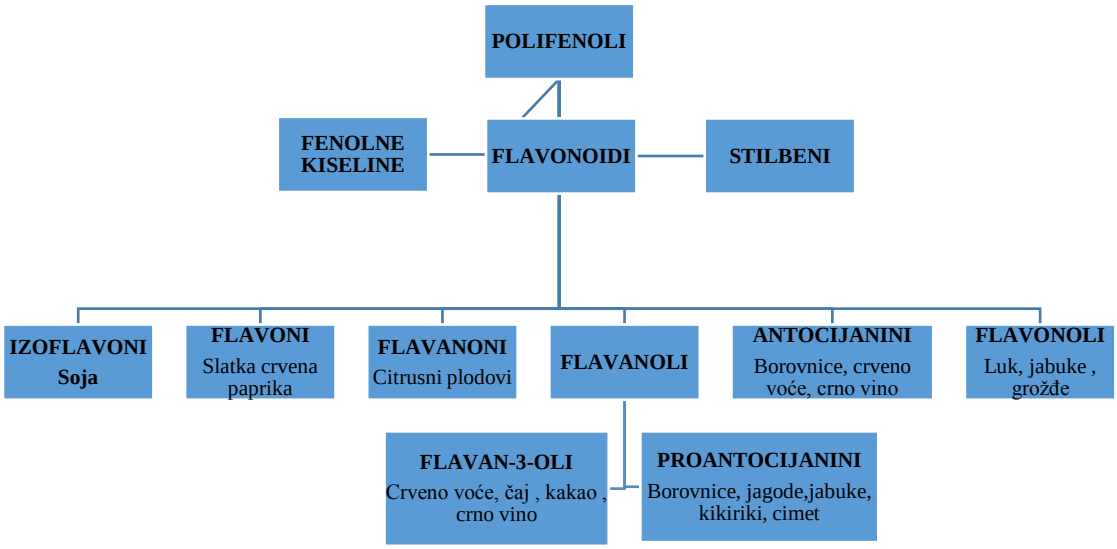
2.2. POLIFENOLI

Polifenoli su molekule biljnog podrijetla koje nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka i imaju bitan učinak na normalne fiziološke procese u biljci. Mogu djelovati kao signalne molekule, sudjeluju u hormonskoj regulaciji rasta biljaka, štite ih od infekcija mikroorganizmima (antibiotsko djelovanje), djeluju kao zaštitni spojevi od UV zračenja, privlače oprašivače, pridonose pigmentaciji biljaka, dok u namirnicama pridonose gorčini, oštrini, boji, okusu, mirisu (Berend i sur. 2008). Široko su zastupljeni u ljudskoj prehrani radi čega postoji veliki interes za njihovo proučavanje, što je u posljednjem desetljeću dovelo do brojnih istraživanja vezanih uz polifenole. Danas je poznato da te tvari imaju važnu ulogu u fiziološkim procesima ljudskog organizma štiteći membrane ljudskih stanica od oštećenja slobodnim radikalima, doprinose prevenciji brojnih bolesti vezanih uz oksidativni stres. Kao najzastupljenije protuoksidansi u prehrani možemo ih naći u različitim vrstama voća, posebno se ističe tamno obojeno bobičasto i jagodasto voće iz porodica *Ericaceae* (borovnice), *Rosaceae* (kupina, malina, trešnja, višnja, jagoda) te *Caprifoliaceae* (bobice bazge). Nalazimo ih u povrću, žitaricama, suhim mahunarkama, čokoladi i pićima kao što su čaj, kava, ili vino (Yang i sur. 2001). Osim protuoksidativnog djelovanja polifenola znanstveno su dokazana mnogobrojna druga biološka djelovanja, kao što su protumikrobno, imunomodulatorno, protualergijsko, protukancerogeno, hipoglikemijsko i druga (Yoon i sur. 2005; Biesalski 2007). Kontinuirano se otkrivaju novi polifenolni spojevi čiji mnogi biološki učinci nisu razjašnjeni, istražuje se njihova zastupljenost u prehrani, bioraspoloživost, te biološki učinak na nastanak i prevenciju različitih patofizioloških stanja i bolesti. Eksperimentalna istraživanja na laboratorijskim životinjama i humanim staničnim kulturama podupiru značajnu ulogu polifenola u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, različitih malignoma, neurodegenerativnih bolesti, diabetesa kao i osteoporoze (Yang i sur. 2001; Scalbert i sur. 2005). Teško je međutim predvidjeti točan učinak polifenola u prevenciji bolesti kod ljudi, jer koncentracije koje se koriste u predkliničkim ispitivanjima su znatno veće u odnosu na one koje čovjek unosi prehranom. Učinak fenolnih spojeva ovisi o brojnim čimbenicima, a polifenoli koji su najzastupljeniji u ljudskoj prehrani nisu nužno i najaktivniji u ljudskom tijelu. Ne apsorbiraju se svi podjednako, opsežno se metaboliziraju putem crijevnih i jetrenih enzima kao i crijevne mikroflore, učinak im ovisi o cirkulirajućim metabolitima, staničnom unosu, međustaničnom metabolizmu, svojstvima konjugiranih metabolita te nakupljanju u pojednim tkivima. Tako se bioraspoloživost polifenola izuzetno razlikuje među pojedinim polifenolnim skupinama i spojevima, a najzastupljeniji polifenolni spojevi nemoraju nužno biti i najboljeg

bioraspoloživog profila (Manach i sur. 2004). Poznavanje bioraspoloživosti pojednih polifenola, njihovog nivoa u krvi i ciljnim organima kao i točnog mehanizma djelovanja pomoći će primjeni dobivenih rezultata iz pretkliničkih istraživanja na ljudima (Scalbert i sur. 2005).

2.2.1. Podjela polifenola

Polifenoli su vrlo heterogena skupina spojeva, a osnovno obilježje im je prisutnost jednog ili više hidroksiliranih benzenskih prstenova (Escarpa i Gonzalez 2001). Dijele se ovisno o broju fenolnih prstenova i elemenata koji povezuju te prstenove tj supstituenata na njima. Do danas je poznato približno 8000 polifenolnih molekula, a najznačajnije skupine su: fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni i lignani (Bravo 1998; Escarpa i sur. 2001; Manach i sur. 2004; Biesalski 2007) (Slika 6).



Slika 6. Skupine, podjela i izvori polifenola (preuzeto od Parham i Verbanac 2011)

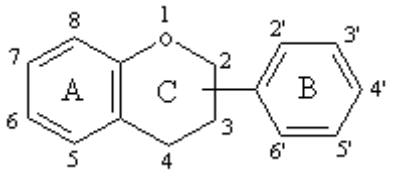
2.3. FLAVONOIDI

Flavonoidi su bioaktivni polifenolni spojevi koji se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. To su pigmenti odgovorni za obojenost cvjetova i listova, važni su za normalan rast, razvoj i obranu biljaka. Otkrio ih je mađarski biokemičar, nobelovac Albert Szent-Gyorgi 1930. godine i dao im je ime "vitamin P". Do sada ih je opisano preko 5000, svakodnevno ih unosimo u organizam, vrlo su važan dio ljudske

prehrane a veliki broj istraživanja temelji se na istraživanju učinkovitosti flavonoida na ljudski organizam (Reuben 1998; Kazazić 2004; Tapas i sur. 2008).

2.3.1. Kemijska struktura i podjela flavonoida

Osnovnu kemijsku građu flavonoida čine tri aromatska prstena (A, B i C) s hidroksilnim skupinama (OH) na koje se mogu vezati druge molekule (Slika 7).



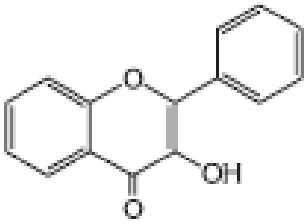
Slika 7. Kemijska struktura flavonoida

(Preuzeto sa stranice: http://www.friedli.com/herbs/phytochem/flavonoids.html)

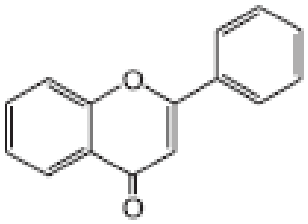
Različiti članovi porodice flavonoida prepoznaju se po varijacijama u prstenu C, vrsti supstituenta i položaju prstena B (Sobočanec 2006).

Šest najvažnijih podskupina flavonoida su:

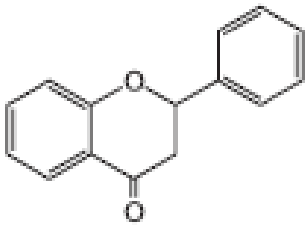
1. Flavonoli
2. Flavoni
3. Flavanoni
4. Antocijanini
5. Izoflavoni
6. Flavanoli (katehini i proantocijanidini) (Manach i sur. 2004) (Slika 8).



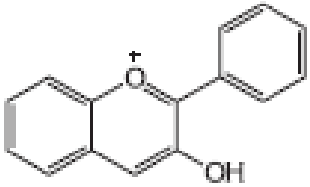
Flavonol



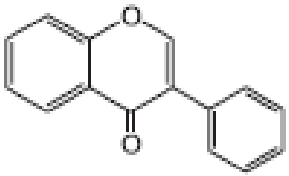
Flavon



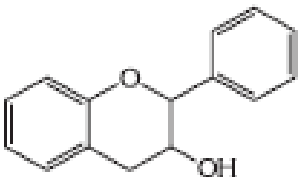
Flavanon



Antocijanidin



Izoflavon



Flavanol

Slika 8. Osnovne strukture najvažnijih podskupina flavonoida

(Preuzeto sa stranice: http://hrcak.srce.hr/257)

Flavonoli i Flavoni

Glavni predstavnici ove dvije vrste flavonoida su **kvercetin** i **kemferol**. Prisutni su u cvjetovima gdje tvore simetrične uzorke pruga, točaka ili koncentričnih krugova. Također su prisutni u listovima i stabljikama svih zelenih biljaka. Oni štite biljke od UV-B zračenja tako što apsorbiraju u UV-B području spektra, a propuštaju fotosintetski aktivne valne duljine.

Flavonoli su najčešće prisutni flavonoidi u hrani iako ih nalazimo u relativno niskim koncentracijama (15 - 30 mg kg^{-1}). Važniji jestivi izvori su luk (i do 1,2 mg kg^{-1}), poriluk, brokula i borovnice. Crno vino i čaj sadrže i do 45 mg flavonola/L. Flavoni su manje zastupljeni u voću i povrću od flavonola, a važniji izvori u prehrani su peršin i celer (Pevalek i sur. 2003).

Flavanoni

Uglavnom su prisutni u agrumuma, a pronađeni su i u rajčici i nekim mirisnim biljkama kao što je metvica. Glavni predstavnici su **naringenin** u grožđu, **hesperidin** u naranči i **eriodiktiol** u limunu (Manach i sur. 2004).

Antocijanini

U ljudskoj prehrani najzastupljeniji su u voću, a pronađeni su u crnom vinu, nekim vrstama žitarica i povrću (patlidžan, kupus, grah, luk, rotkvica). Odgovorni su za većinu crvene, ružičaste i plave boje u cvjetovima i plodovima, te pomažu primamljivanju životinja za oprašivanje i rasprostranjivanje sjemenki. Na boju antocijanina utječu brojni čimbenici, uključujući broj hidroksilnih i metoksilnih skupina u prstenu B antocijanidina, prisutnost kelatnih metala (Fe i Al), prisutnost flavona i flavonskih kopigmenata, te pH vrijednost vakuole u kojoj su pohranjeni (Pevalek i sur. 2003; Manach i sur. 2004).

Izoflavoni

Najpoznatiji oblici izoflavona su **genistein** i **daidzein**. Izvori u ljudskoj ishrani su mahunarke, soja i njeni produkti. To su flavonoidi koji imaju strukturne sličnosti s estrogenima i sposobnost vezanja za estrogenske receptore, međutim neki mogu imati protuestrogeni učinak koji uzrokuje neplodnost sisavaca. Opisana je njihova insekticidna aktivnost, te sposobnost ograničavanja širenje bakterijskih i gljivičnih patogena (Pevalek i sur. 2003).

Flavanoli

Mogu biti u obliku monomera tzv. **katehini.** Dimeri, oligomeri i polimeri katehina nazivaju se **proantocijanidini.** Flavanole nalazimo u mnogim vrstama voća (najbogatiji izvor su marelice;

250 mg kg^{-1}), prisutni su u crnom vinu (300 mg L^{-1}), a dosad najbogatiji izvori u ljudskoj prehrani su zeleni čaj i čokolada.

Tablica 5. Izvori hrane koji sadrže tvari navedene podskupine flavonoida

Flavonoidna podgrupa	Reprezentativni flavonoidi	Glavni izvori hrane
flavonoli	kempferol, miricetin, kvercetin, rutin	luk, trešnje, jabuke, brokula, kelj, rajčica, bobičasto voće, čaj, crveno vino
flavoni	apigenin, krizin, luteolin	peršin, timijan
izoflavoni	daidzein, genistein, glicitein, formononetin	soja, povrće
flavanoli	katehin, galokatehin	jabuke, čaj
flavanoni	eriodiktiol, hesperidin, naringenin	naranče, grejp
flavanonoli	taksifolin	limun, gorka naranča

(Preuzeto od Ren i sur. 2003).

Tablica 6. Količinski prikaz prisutnosti određenog flavonoida u miligramu po 100 grama ili 100 mL određene namirnice iz prehrane

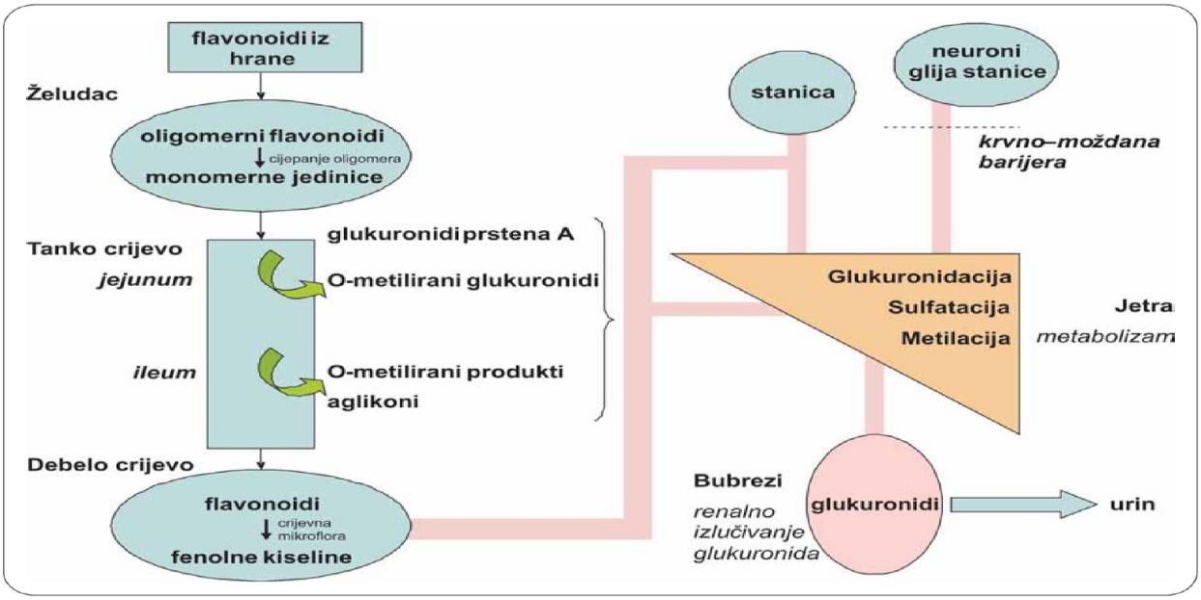
Flavonoidi	Hrana (sadržaj flavonoida u mg/100 g ili 100 ml)
flavanoni:	
- naringenin	crveno vino (0,05), grejp (1,56), meksički origano (372), badem (0,02)
- hesperidin	koncentrirani sok grejpa (1,55), koncentrirani sok limuna (24,99), koncentrirani sok naranče (51,68), sušena metvica (480,65)
flavoni:	
- luteolin	ekstradjevičansko maslinovo ulje (0,36), svježi timijan (39,50), crne masline (3,43), glave artičoka (42,10)
- apigenin	ekstradjevičansko maslinovo ulje (1,17), talijanski origano (3,50), sušeni mažuran (4,40)
flavonoli:	
- kempferol	crveno vino (0,23), sok maline (0,04), crni čaj (0,13), kapari (104,29), kim (38,60)
- kvercetin	crveno vino (0,83), heljdino cjelozrnato brašno (0,11), tamna čokolada (25), cna bazga (42), sok naranče (1,06), meksički origano (42), svježi crveni luk (1.29), badem (0,02)
flavan-3-oli:	
- katehin	obično pivo (0,11), crveno vino (6,81), ječmeno cjelozrnato brašno (1,23), kakao u prahu (107,75), crno grožđe (5,46), jagode (6,36), šljive (3,60), pistacije (3,50)
- epikatehin	crveno vino (3,78), tamna čokolada (70,36), kupine (11,48), europska brusnica (4,20), marelice (4,19), zeleni čaj (piće) (7,93)
antocijanini:	
- petunidin 3-O-glukozid	crveno vino (1,40), borovnice (6,09), crno grožđe (2,76), crni grah (0,80)
- malvidin 3-O-glukozid	crveno vino (9,97), bijelo vino (0,04), crno grožđe (39,23), maline (0,62)

(Preuzeto od Irina i sur. 2012).

2.3.2. Farmakokinetika polifenola i flavonoida kao polifenolnih spojeva

Metabolizam i apsorpcija razlikuju se među skupinama flavonoida, a također je poznato da je koncentracija polifenola u krvi znatno niža unatoč njihovom visokom unosu putem prehrane. Mali dio polifenola izlučuje se iz organizma nepromijenjen što znači da se većina unesenih polifenola metabolizira u organizmu, a upravo metaboliti nose većinu biološke aktivnosti, a ne ishodišne molekule. Stoga se sve veće značenje pridaje istraživanju metaboličkih procesa polifenola u organizmu, kao i bioloških značajki nastalih metabolita. Većina podataka vezana uz ovu temu dobivena je iz istraživanja provedenih na životinjama, dok podataka za ljude ima vrlo malo. Sve podvrste flavonoida podliježu intenzivnom metabolizmu u tankom crijevu

(jejunum i ileum), a njihovi metaboliti portalnom venom dolaze u jetru gdje se dalje metaboliziraju. Metabolizam i apsorpcija polifenola u debelom crijevu uglavnom je ovisna o bakterijskoj mikroflori. Metabolizam polifenola odvija se i u drugim različitim tipovima stanica, a sudbina velikog djela metabolita jest njihovo izlučivanje putem bubrega (Slika 9).



Slika 9. Prikaz nastajanja flavonoidnih metabolita i konjugata u čovjeka (Preuzeto i prilagođeno od Spencer 2003)

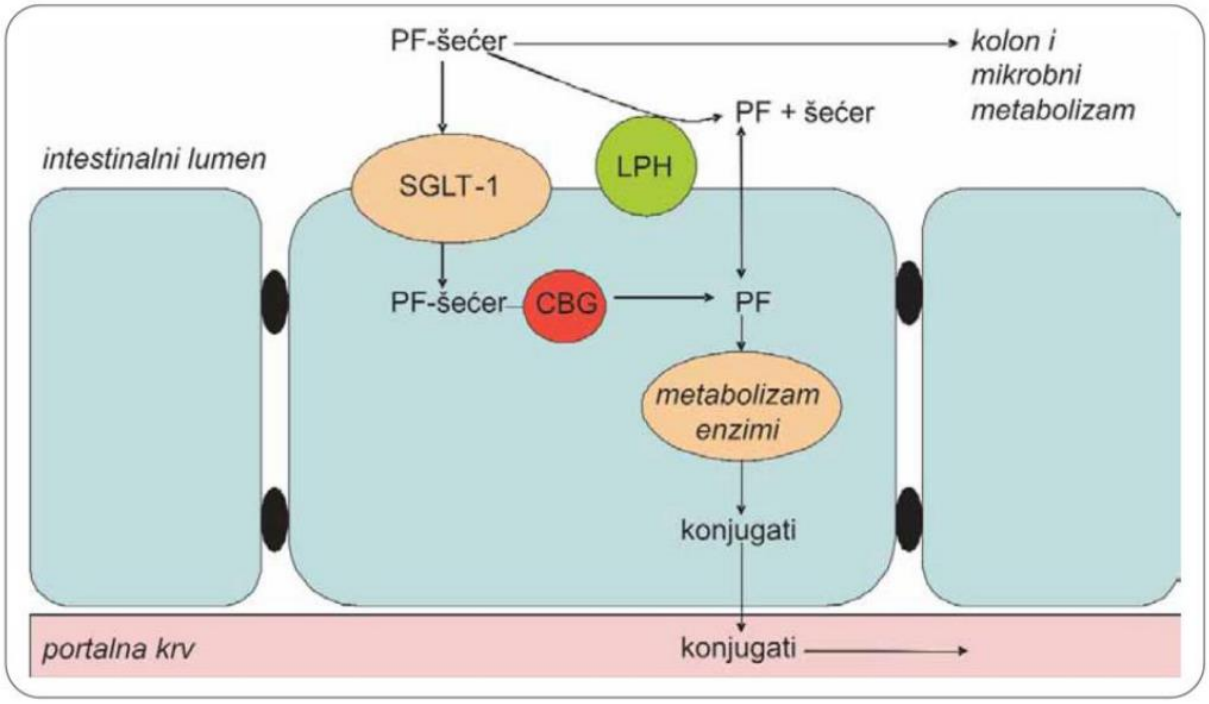
Na samom početku probavnog sustava u usnoj šupljini dolazi do hidrolize flavonoidnih glikozida s glukoznim šećernim jedinicama poput kvercetin 4´-glukozida i genistein-7-glukozida (Walle i sur. 2005). Nakon usne šupljine uneseni polifenoli dospijevaju do želuca gdje se pri niskom pH odvija cijepanje oligomernih proantocijanidina u monomerne jedinice i događa se slaba apsorpcija jednostavnih fenolnih kiselina.

Metabolizam polifenola u tankome crijevu uključuje kemijske reakcije konjugacije glukuronidaciju, sulfataciju i metilaciju. Ovi metabolički procesi također se odvijaju i u jetri (Slika 9) (Manach i sur. 2004). Većina flavonoida, izuzev flavanola, u hrani se nalaze u obliku glikozida, a flavonoidi najčešće podliježu reakciji glukuronidacije koja ovisi o strukturi molekule, a u odnosu na ostale reakcije konjugacije predstavlja dominantan metabolički put u jetri i u crijevima (Zhang i sur. 2007).

Glukuronidaciju kataliziraju enzimi UGT (UDP-glukuronozil transferaze), a pretpostavlja se da najvažniju ulogu imaju UGT1A9 i UGT1A3, koji su prisutni u crijevima i jetri (Chen i sur. 2008). Tip šećerne jedinice znatno utječe na apsorpciju pojedinih flavonoida u tankom crijevu. Tako se kvercetin-3-O--glukozid mnogo bolje apsorbira od pripadajućeg aglikona (flavonoid

bez šećerne skupine). Iako su polifenolni glukozidi općenito preniske lipofilnosti da bi mogli pasivno difundirati kroz biološke membrane poput aglikona, dva su mehanizma koja objašnjavaju bolju apsorpciju kvercetin-3-O--glukozida u odnosu na aglikon kvercetin.

U prvi je uključen membranski transporter SGLT-1 (o natriju ovisan glukozni transporter). Njime se glukozidi transportiraju u lumen enterocita gdje su potom supstrati za citosolnu -glukozidazu (CBG) široke specifičnosti. U drugi mehanizam uključena je laktaza–florizin hidrolaza (LPH) smještena na membrani enterocita s aktivnim mjestom okrenutim prema lumenu crijeva. Svojom aktivnošću otpušta aglikone koji potom mogu pasivno difundirati preko membrane (Slika 10) (Scalbert i sur. 2002; Spencer 2003; Németh i sur. 2003).



Slika 10. Model apsorpcije flavonoidnih glikozida (Preuzeto i prilagođeno od Németh i sur. 2003).

Na biološku aktivnost flavonoida konjugacija utječe različito. Manach i sur. su pokazali da sulfatni esteri i glukuronidi djelomice zadržavaju antioksidacijsko djelovanje te i dalje odgađaju *in vitro* oksidaciju niskomolekularnih lipoproteina. Međutim, istraživanja Zhanga i sur. su pokazala da glukuronidacija flavonoida smanjuje njihove biološke učinke. Glukuronidi daidzeina i genisteina imaju 10 odnosno 40 puta niži afinitet prema estrogenim receptorima u

usporedbi s pripadajućim aglikonima (Scalbert i sur. 2002). Metilacija može utjecati na smanjenje toksičnosti flavonoida i općenito polifenola. Naime, većina polifenola sadrži kateholne grupe koje *in vivo* mogu biti oksidirane u toksične kinone. Slični kinoni nastali iz endogenih estrogena i kateholamina, dovode do nastajanja superoksidnih radikala kroz reakciju s nukleofilnim molekulama u stanicama (Scalbert i sur. 2002).

Strukturni parametri poput esterifikacije i molekulske mase imaju veliki utjecaj na crijevnu apsorpciju polifenola. Povećanjem molekulske mase, smanjuje se mogućnost apsorpcije u tankom crijevu. Iz tog razloga visokomolekularni proantocijanidini (kondenzirani tanini, spojevi građeni od podjedinica flavanola) gotovo uopće nisu apsorbirani u tankom crijevu.

Nakon reakcija konjugacije metaboliti polifenola jednim djelom budu apsorbirani u plazmu, te se zatim izlučuju putem bubrega u urin, dok velik broj unesenih polifenola (80 - 90%) dospijeva u debelo crijevo (Scalbert i sur. 2002; Spencer 2003). To su polifenoli koji se nisu apsorbirali u tankom crijevu i oni koji su apsorbirani i metabolizirani (u jetri ili tankom crijevu), te transportirani do debelog crijeva tzv enterohepatičkom cirkulacijom.

Debelo crijevo sadrži bogatu mikrofloru (10^{12} mikroorganizama/cm^3) koja ima veliku katalitičku i hidrolitičku sposobnost, a najčešće reakcije kojima su polifenoli izloženi su hidroliza, dehidroksilacija, demetilacija, cijepanje prstena i brza dekonjugacija, što dovodi do razgradnje polifenola i nastajanja velikog broja novih metabolita različite biološke aktivnosti i apsorptivne sposobnosti (Scalbert i sur. 2002; Spencer 2003; Manach i sur. 2004).

Farmakokinetika i biološka aktivnost polifenola, pa tako i flavonoida ne ovisi samo o njihovom unosu, nego i o bioraspoloživosti i biološkoj aktivnosti nastalih metabolita. Općenito metaboliti polifenola vrlo brzo budu eliminirani iz plazme, što govori o potrebi za njihovom svakodnevnom konzumacijom putem prehrambenih proizvoda. Flavanoni i Izoflavoni su flavonoidi sa najboljim profilom bioraspoloživosti.

Bioraspoloživost ujedinjuje nekoliko varijabli, kao što su crijevna apsorpcija, izlučivanje glukuronida prema crijevnom lumenu, crijevna mikroflora, crijevni i jetreni metabolizam, prirodi cirkulirajućih metabolita, sposobnosti za vezanje za albumine plazme, staničnom unosu, unutar staničnom metabolizmu, akumulaciji u tkivima, izlučivanju putem bilijarnog sustava ili bubrega. Bolja saznanja o bioraspoloživosti polifenola su ključna u istraživanju pozitivnih učinaka polifenola na zdravlje (Manach i sur. 2004).

2.3.3. Biološka aktivnost flavonoida

Postojanje velikog broja flavonoidnih spojeva, njihove različite bioraspoloživosti, sadržaja i kombinacija u pripravcima korištenim u dosadašnjim *in vitro*, animalnim i kliničkim istraživanjima otežava precizno poznavanje učinaka pojedinih flavonoida. Istraživanja su pokazala da prehrana bogata flavonoidima smanjuje ukupni kolesterol, LDL- lipoproteine i trigliceride u plazmi, pojavnost kardiovaskularnih bolesti, te nastanak osteoporoze (Middleton i sur. 2000; Dang i sur. 2005; Ricketts 2006).

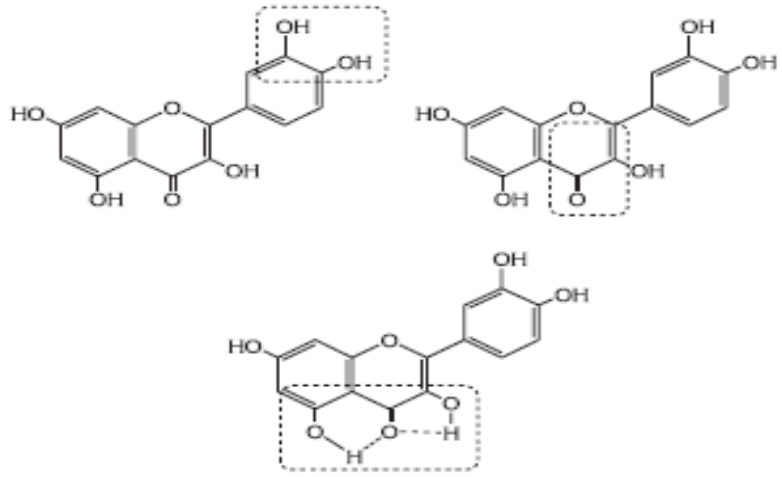
Protuoksidativni učinak flavonoida

Protuoksidansi su tvari koje štite stanice od oštećenja prouzročenih reaktivnim radikalima kisika (ROS; engl. *reactive oxygen species*) i dušika (RNS; engl. *reactive nitrogen species*) (vidi poglavlje 2.4).

Zaštitna uloga flavonoida u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja ("hvatanja") elektrona slobodnog radikala pri čemu se prekida lančana reakcija slobodnog radikala, kelatnog vezanja iona prijelaznih kovina (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} i Mg^{2+}) i inhibiciji enzima koji su uključeni u nastanak reaktivnih radikala kisika i dušika, aktiviranja protuoksidacijskih enzima (Kazazić 2004).

Značajke flavonoida važne za sposobnost "hvatanja slobodnih radikala" (Kazazić 2004):

- o-dihidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu koja daje stabilnost radikalu i omogućuje delokalizaciju elektrona;
- 2,3-dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto skupinom, što omogućuje delokalizaciju elektrona iz B-prstena;
- hidroksilne skupine na položaju 3- i 5- koje osiguravaju vodikovu vezu s keto-skupinom (Slika 11).



Slika 11. Strukturne skupine važne za hvatanje slobodnih radikala (preuzeto od Kazazić 2004)

Kvercetin je pokazao do sada najjači protuoksidativni učinak, koji se pripisuje sposobnošću inhibicije lipo-oksigenaze i ciklo-oksigenaze (Ban i sur. 1989; Mirzoeva 1997; Cotelle 2001; Heim i sur. 2002; Prior 2003). Pokazano je da flavonoidi vežu i inhibiraju različite enzime: hidrolaze, transferaze, hidroksilaze, oksidoreduktaze i kinaze (Heim i sur. 2002; Prior 2003; Galati i O´Brien 2004). Mnogi od ovih enzimskih sustava su redoks-aktivni, a neke od bioloških aktivnosti mogu biti ovisne o redoks-aktivnosti flavonoida. Učinak nekih flavonoida u redoks-ciklusu i proizvodnji toksičnih radikala kisika doprinosi njihovom citotoksičnom učinku koji je utvrđen na stanicama ljudskih tumora u uvjetima *in vivo* i *in vitro* (Middleton i sur. 2000).

Antioksidativni učinak kvercetina pojačava se u nazočnosti askorbata (vitamin C). To pojačanje pripisuje se sposobnosti askorbata da reducira oksidirani kvercetin, a kvercetina da inhibira fotooksidaciju askorbata. Nadalje, utvrđeni su korisni učinci kvercetina kao sakupljača radikala i/ili inhibitora lipidne peroksidacije u kombinaciji s vitaminom E i askorbinskom kiselinom (Stavrić 1994). Kafeinska kiselina djeluje antioksidativno skupljanjem slobodnih radikala, čime može zaštiti linoleinsku kiselinu i lipoprotein male gustoće (LDL) od oksidacije (Lim i sur. 2003). Poznato je da biodostupnost koja se znatno razlikuje između pojedinih flavonoida ima utjecaj na protuoksidacijsku zaštitu organizma. Sveukupno može se reći da protuoksidacijska aktivnost polifenola *in vitro* nije jednaka protuoksidacijskoj aktivnosti *in vivo* (Manach i sur. 2004).

Imunomodulacijski učinak flavonoida

Brojne su prijetnje kojima se organizam mora oduprijeti da bi preživio: gubitak individualnosti spajanjem s nekim drugim organizmom; ulazak štetnih tvari; najezda parazita, posebno mikroorganizama; opasnost od vlastitih stanica promijenjenih po smještaju u tkivu ili po socijalnom ponašanju (npr. tumori). Imunomodulacija prirodnim ili sintetiziranim tvarima nameće se kao alternativa u prevenciji i liječenju zaraznih bolesti i tumora. Brojna istraživanja pokazuju korisne imunomodulatorne učinke flavonoida koje koristimo u prehrani povezane sa protutumorstkim djelovanjem i utjecajem na autoimune bolesti.

Istraživanja provedena s propolisom dokazuju protutumorsku aktivnost naringenina i kvercetina koji intraperitonealnom primjenom u dozi od 100 mg kg^{-1} tri dana uzastopno prije inokulacije tumorskih stanica, u kombinaciji s kemoterapeutikom irinotekanom usporavaju rast Ehrlichovog ascitesnog tumora (EAT) te produljuju životni vijek miševa sa EAT. Utvrđeno je da učinkovitost propolisa i flavonoida primijenjenih zasebno ili u kombinaciji s kemoterapeutikom irinotekanom pojačava aktivnost efektornih stanica imunološkog sustava kao i hematopoezu životinja nositelja tumora. Također se može zaključiti da propolis i njegovi flavonoidi smanjuju toksičnost irinotekana na normalne stanice (jetra, bubreg i krv) (Oršolić i sur. 2003, 2007).

Jedan od mehanizama zaustavljanja tumorskoga rasta koji se može pripisati flavonoidima jest sprječavanje angiogeneze, tj. nastanka mreže novih krvnih žila što dovodi do smanjenja veličine tumora i metastaze (Rose i sur. 2000; Oak i sur. 2005; Bergman Jungestrom i sur. 2007). Također, flavonoidi mogu odgoditi ili u potpunosti spriječiti razvoj stanica karcinoma *in vitro* i *in vivo* zaštitom od kancerogenih spojeva, inhibicijom proliferacije tumorskih stanica, pokretanjem procesa stanične smrti te pokretanjem apoptoze preko unutarnjih ili vanjskih signalnih puteva. Murakami i sur. (2008) su dokazali da kvercetin ulazi u reakcije sa određenim receptorima koji su bitni u nastanku i razvoju tumorskih stanica te da na taj način može biti učinkovit u prevenciji karcinoma.

Kvercetin i miricetin sprečavanjem otpuštanja dušičnog oksida (NO) u makrofagima miševa pokazuju imunomodulacijsku i protuproliferativnu aktivnost, također je pokazana značajna uloga kvercetina te kvercetina u kombinaciji sa interferonom-β (IFN-β) u modulaciji imunološkog odgovora mononuklearnih stanica iz periferne krvi u pacijenata s multiplom sklerozom (Sternberg i sur. 2008; Carli i sur. 2009). Pokazano je kako kvercetin i reservatrol potiču funkciju monocita i makrofaga povećavajući frekvenciju i indeks fagocitoze u

vremenskom razmaku od 48 sati (Berteli i sur. 1999). Schwartz i sur. (1982) su u *in vitro* uvjetima dokazali da kvercetin može spriječiti stvaranje i efektorsku funkciju citotoksičnih T limfocita (CTL). U nekoliko novijih istraživanja dokazan je jak imunomodulacijaki i protutumorski učinak proantocijanidina (Zhang i sur. 2005; Zhao i sur. 2007; Liu i sur. 2010).

Pokazano je kako potkožno primijenjene injekcije fitoestrogena genisteina u ovariektomiziranih miševa dovode do 80%-og smanjenja mase timusa. Utvrđeno je smanjenje postotka CD4+ CD8- timocita te dvostruko povećanje broja CD4+ CD8+ timocita, na osnovu čega je zaključeno da genistein dovodi do ranijeg sazrijevanja timocita (Yellay i sur. 2002) Dokazan je imunomodulatorni učinak kempferola na omjer Th1 i Th2 citokina (Okamoto i sur. 2002), te njegov potencijal u liječenju stanično posredovane imunološke bolesti, kao što je odbacivanje organa ili presatka (GVHD; engl. *graft versus host dissease*).

Učinak flavonoida na kost i osteoporozu

Prema dosadašnjim istraživanjima može se reći da polifenoli u koje se ubrajaju flavonoidi, i prehrana bogata polifenolima imaju zaštitni utjecaj na nastanak i razvoj osteoporoze. Poznato je kako je nedostatak estrogena povezan sa razvojem osteoporoze. Godine 1941. Albright je u svom istraživanju prvi naglasio značaj estrogena uz detaljan klinički opis osteoporoze u žene nakon operacijskog odstranjenja jajnika. Veći broj radova počinje se objavljivati krajem 70-ih godina prošlog stoljeća, nakon što je postalo moguće izravno mjeriti gustoću kosti. O flavonoidima kao fitoestrogenima koji imaju pozitivan učinak na koštani sustav biti će više riječi u slijedećem poglavlju, ali sveukupno istraživanja provedena na životinjama potvrđuju rezultate *in vitro* istraživanja koja govore u prilog pozitivnom učinku flavonoida na pregradnju kosti te usporavanju gubitka koštane mase kod akutnog smanjenja razine serumskog estrogena. Konzumacija soje, koja je glavni izvor kalcija u Japanu, povezana je s višom razinom mineralne gustoće kostiju kod japanskih žena, te je utvrđeno da pojavnost osteoporoze u Japanki koje u prehrani uzimaju mnogo soje iznosi tek trećinu pojavnosti za žene koje se hrane zapadnjačkim načinom. Ovi učinci konzumacije soje na zdravlje kostiju se mogu objasniti sadržajem izoflavona koje sadrži hrana od soje (Cooper i sur. 1992). S druge strane istraživanja koja su proveli Dalais i sur. (1998) i Gallagher i sur. (2000) nisu pokazali promjene u BMD u osoba koje su se hranile hranom bogatom sojom u usporedbi s kontrolnom skupinom i skupinom koja je dobivala placebo.

Istraživanja pokazuju kako male doze flavonoida, ili nemaju pozitivni učinak, ili da je kod uzimanja malih doza preparata potreban dulji vremenski period da dođe do pozitivnog učinka. Istraživanje je provedeno na ispitanicama koje su u jednoj skupini šest mjeseci svakodnevno unosile 90 mg izoflavonoida, dok su u drugoj skupini u istom periodu dnevno uzimale 45 mg istog preparata. Kod prve skupine pronađeno je značajno povećanje BMD mjerenog u lumbalnoj regiji, dok kod druge skupine navedenog pozitivnog učinka nije bilo (Potter i sur. 1998). Dvogodišnje istraživanje provedeno je na 108 žena u menopauzi. Ispitanice koje su svakodnevno konzumirale 500 mL sojinog mlijeka uz dodatak 85 mg izoflavonoida imale su, u usporedbi sa ispitanicama koje su konzumirale sojino mlijeko s manje od 1 mg izoflavonoida, bolji nalaz BMD na lumbalnoj regiji. Neovisno o dozi izoflavonoida, promjene BMD na bedrenoj kosti bile su minimalne. U prve skupine ispitanica BMD lumbalne regije bio je 1,1% viši, dok je u drugoj skupini zabilježeno smanjenje BMD za 4,2%, što odgovara prosječnom smanjenju u prve dvije godine nakon menopauze, ukoliko se ne započne s nekim oblikom terapije. Denzitometrija učinjena nakon godinu dana trajanja istraživanja nije pokazala nikakve značajnije promjene BMD, što ukazuje na činjenicu da je za dobru procjenu učinka flavonoida na kost potrebno provoditi tzv. “long-term” istraživanja (Lydeking - Olsen i sur. 2002). Izoflavoni imaju slabo estrogensko djelovanje i mehanizmi odgovorni za zaštitne učinke izoflavona su slabo razjašnjeni. Strukturno srodni izoflavoni mogu zaštititi kosti različitim mehanizmima i s različitim učinkom. Dodatak prehrani s genisteinom, daidzeinom ili njihovim glikozidima tijekom nekoliko tjedana sprječava gubitak minerale gustoće kostiju i volumen trabekularne kosti uzrokovane uklanjanjem jajnika (Scalbert i sur. 2005). Pokazano je kako liječenje ipriflavonom, derivatom izoflavona (7 – izoproksiizoflavon) u razdoblju od jedne godine (3 x 200 mg dnevno) smanjilo bolove i povećalo pokretljivost u 73% pacijenata s osteoporozom. Ipriflavon je povećao gustoću distalne metafize i težio povećanju gustoće dijafize u štakora s osteoporozom izazvanom glukokortikoidima. Pokusi ukazuju da ipriflavon inhibira resorpciju kosti *in vitro* i *in vivo*. Mehanizam inhibicije je nejasan; dijelom se temelji na direktnoj inhibiciji aktivnosti osteoklasta, modulacijom slobodnog unutarstaničnog kalcija ipriflavonom (Di Carlo i sur. 1999). Od ostalih flavonoida, potrebno je spomenuti rutin, glikozid kvercetina. Dodan prehrani smanjuje ekskreciju deoksipiridinolina, pokazatelja razgradnje kosti, a povećava izlučivanje osteokalcina, pokazatelja aktivnosti osteoblasta. Rutin je efikasniji nego izoflavoni u obnavljanju mineralne gustoće kostiju. Nadalje, katehini iz čaja mogli bi suzbijati štetne učinke kofeina iz čaja na metabolizam kostiju (Scalbert i sur. 2005).

Učinak flavonoida na druge organske sustave

Do sada objavljena istraživanja iznose dokaze o pozitivnom učinku flavonoida na razne organske sustave. Velik dio pripisuje se njihovom fitoestrogenskom djelovanju. Istraživanja provedena na ženama u premenopauzi pokazala su kako prehrana bogata fitoestrogenima produljuje trajanje menstrualnog ciklusa a posebno njegove folikularne faze te se smanjuje očekivani porast folikul-stimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH) sredinom ciklusa. Takav učinak nije zamijećen kod prehrane bez izoflavonoida (Cassidy i sur. 1994). Epidemiološki podaci te empirijska zapažanja ukazuju na činjenicu da, nakon nastupa menopauze, hormonska nadomjesna terapija (HRT; engl. *hormon replacement therapy*) smanjuje rizik od bolesti srca i krvožilnog sustava, usporava nastanak osteoporoze, poboljšava kognitivne funkcije te smanjuje simptome koji nastaju kao izravna posljedica akutnog smanjenje razine estrogena, međutim zbog straha od mogućeg povećanja rizika od nastanka karcinoma dojke neprestano se traže alternativni izvori egzogenog estrogena (Col i sur. 1997).

Manjak estrogena u menopauzi ometa rad centara za termoregulaciju u mozgu, rezultat je iznenadni osjećaj topline tzv. «valung» (engl. *hot flash*). Pojavnost «valunga» varira od 70-80% u europskih žena do 57% u Maleziji te 18% u Kini (Sturdee 1997) .

Snižena razina estrogena u postmenopauzi u uskoj je vezi s povećanom razinom kolesterola, što posljedično povećava rizik od nastanka bolesti srca i krvožilnog sustava. Brojna istraživanja provedena su sa sojom kao izvorom fitoestrogena. Pozitivan učinak prehrane bogate sojom na serumske lipide i koncentraciju lipoproteina dokazan je na rezus majmunima (Anthony i sur. 1996), te na ovariektomiziranim štakorima (Arjmandi i sur. 1997). Meta – analiza od 38 kliničkih istraživanja (Anderson i sur. 1995.) pokazala je da je prosječno smanjenje razine serumskog kolesterola nakon prehrane bogate soja proteinom 9,3%, dok je serumska razina lipopoteina niske gustoće (LDL; engl. *low density lipoprotein*) prosječno smanjena za 12,9%. Učinak na lipoproteine visoke gustoće (HDL; engl. *high density lipoprotein*) bio je neznatan, zabilježeno je tek blaže povećanje koncentracije. Prosječan dnevni unos soja proteina bio je 47 grama, a učinak na smanjenje razine kolesterola bio je izraženiji u ispitanika kod kojih je početna razina kolesterola bila viša. Prosječno 9,6% smanjenja ukupnog serumskog kolesterola zabilježeno je u zdravih žena u premenopauzi s normalnim početnim vrijednostima kolesterola koje su tijekom 30 dana uzimale 60 g soja proteina dnevno (Cassidy i sur. 1994 i 1995).

Provedeno je istraživanje na 156 ispitanika sa umjereno povećanom vrijednošću ukupnog kolesterola i LDL koji su slučajnim odabirom u piću dobivali 25 g soja proteina dnevno, uz

dodatak izoflavonoida u dozi 0 – 58 mg dnevno. Samo u ispitanika koji su u piću dobivali izoflavonoide došlo je do snižavanja serumske koncentracije kolesterola i LDL. U periodu od 9 tjedana prosječno smanjenje bilo je oko 10%. Najbolji učinak postignut je u ispitanika s najvišim početnim vrijednostima kolesterola i LDL a između primijenjene doze izoflavonoida i smanjenja vrijednosti kolesterola i LDL utvrđena je linearna ovisnost. Hipokolesterolemijski učinak potpuno bi se gubio kada bi izoflavonoidi alkoholnom ekstrakcijom bili odvojeni od soja proteina što navodi na zaključak da su biološki aktivne sastavnice soja proteina upravo izoflavonoidi (Crouse i sur. 1998).

Flavonoidi pokazuju pozitivan učinak u zaštiti od ateroskleroze kao izravne posljedice hiperkolesterolemije i dislipidemije. Pokazano je da su flavonoidi i antocijanidini nužni za održavanje normalne krvožilne propusnosti (permeabilnosti). Prva istraživanja koja opisuju ovakva svojstva flavonoida zabilježena su 1936. izolacijom tvari iz soka limuna (citrin) koja je normalizirala kapilarnu rezistenciju u pacijenata s određenim bolestima uključujući nisku krvožilnu rezistenciju (DiCarlo i sur. 1999). Honore i sur. (1997) su kod rezus majmuna sa aterosklerozom dokazali da izoflavonoidi mogu pojačati širenje krvnih žila te tako posljedično poboljšati krvni protok. Mehanizam ovog djelovanja na endotel krvnih žila još uvijek je nepoznat. Epidemiološka istraživanja vezana uz karcinom prostate pokazuju da je unos fitoestrogena hranom veći u zemljama gdje je rizik od nastanka karcinoma prostate niži. Analiza seruma te prostatičnog sekreta u azijskih muškaraca koji u usporedbi s Europljanima imaju niži rizik od nastanka karcinoma prostate, pokazala je višu koncentraciju izoflavonoida, ekvola i daidzeina. Na temelju navedenog može se zaključiti o pozitivnom učinku fitoestrogena na smanjenje rizika od nastanka karcinoma prostate (Morton i sur. 1997).

Poznata je povezanost oksidativnog stresa, stvaranja slobodnih radikala i upale karakterizirane pojačanim otpuštanjem citokina sa oštećenjem DNA koje za posljedicu može imati autonomno ponašanje stanica tj. pojavu karcinoma. Istraživanja pokazuju smanjenje upalnog procesa i rizika nastanka karcinoma kao rezultat protuupalnog i protuoksidativnog učinka flavonoida (Oršolić i sur. 2007, 2008).

Flavonoidi izolirani iz biljke Silybum marianum koristili su se stoljećima u narodnoj medicini u liječenju bolesti jetre. Aktivne tvari iz ovog iscrpka nalaze se u mješavini zvanoj silimarin; silimarin ima pozitivan učinak na intaktne stanice jetre ili stanice koje nisu još ireverzibilno oštećene, kao i regenerativni kapacitet nakon djelomične hepatektomije u pokusnih životinjskih modela. Druga istraživanja su provedena na sjemenu nigerijske biljke Garcinia kola i dokazan je snažni protuhepatotoksični učinak kolavirona i biflavnoida te biljke u miševima koji su bili

zaraženi faloidinom. Flavonoidi izolirani iz biljke Baccaris trimera štite miševe od oštećenja jetre i pokazalo se da je hispidulin najaktivniji flavonoid u toj biljci i da štiti miševe zaražene faloidinom (stopa preživljavanja 80%), dok su drugi flavonoidi (kvercetin, luteolin, neperin i apigenin) bili manje aktivni ili čak neaktivni (Di Carlo i sur. 1999).

Flavonoidi koče enzime poput cikličke AMP fosfodiesteraze i ATP-aze ovisne o kalciju koji pojačavaju otpuštanje histamina iz mastocita i bazofila. Tako flavonoidi ostvaruju protualergijska svojstva. Kelin, flavonoid izoliran iz plodova egipatske biljke Ammi visnaga, koristio se u liječenju astme i drugih poremećaja. Trenutno se rijetko upotrebljava zbog nuspojava poput mučnine i povraćanja (Di Carlo i sur. 1999). Flavoni dodani u otopinu askorbinske kiseline bitno su smanjuju izdvajanje histamina iz bijelih krvnih stanica u osoba koje pate od alergije (Reuben 1998).

Fitoestrogeni učinak flavonoida

Kemijski slični endogenom estrogenu (17-ß stradiolu) su fitoestrogeni, heterogena skupina biološki aktivnih spojeva kojoj pripadaju različite skupine flavonoida. Ova strukturalna sličnost omogućava im vezanje za estrogenske receptore (ER), te posljedično izazivanje različitih estrogenskih i protuestrogenskih učinaka. Endogeni estrogeni imaju značajnu ulogu ne samo u djelovanju osovine hipotalamus-hipofiza-gonadne žlijeze (spolne žlijezde), nego izražavaju svoje djelovanje i na druge sustave kao što su koštani sustav, središnji živčani sustav (SŽS), te imaju važnu ulogu lipidnom metabolizmu (Milner 2006).

Učinak flavonoida ovisi o količini endogenog estrogena u organizmu, s obzirom da se izoflavonoidi i estradiol natječu za vezanje na ER.

ER pripadaju velikoj grupi steroidno/tiroidne familije unutarstaničnih receptora. Postoje dvije forme ER (Erα i Erβ) s različitom ekspresijom u različitim tkivima. ERα posreduje u estrogenskom učinku na maternicu, hipotalamus/hipofizu, koštani sustav, dok ERβ čini se da posreduje estrogenskim učincima u jajnicima, srčano-žilnom sustavu i mozgu. Osim djelovanja posredovanog ER, izoflavonoidi djeluju na metabolizam steroidnih hormona te utječu na mnogobrojne signalne puteve. Učinak izoflavonoida na fiziološke procese je složen i vezan za mnogobrojne čimbenike od kojih mnogi još nisu otkriveni (Barnes i sur. 2000; Gašparević-Ivanek 2003; Harris 2007; Pilšáková i sur. 2010). Estrogena aktivnost fitoestrogena prvi puta je opisana 1926. godine (Murkies i sur. 1998).

Danas je poznato više od stotinu fitoestrogenskih molekula koje se dijele prema njihovoj kemijskoj strukturi (broju fenolnih prstenova i supstitienata) na: izoflavonoide ili izoflavone (genistein, daidzein, biokanin A, formonetin), lignane, kumestane i stilbene (Pilšáková i sur. 2010). U prirodi su zastupljeni u mnogobrojnim biljnim vrstama uglavnom u korijenju i sjemenu (Klejdus i sur. 2005).

Istraživanja su uglavnom usmjerena prema izoflavonima i lignanima koji su prisutni u ljudskom organizmu. Bioraspoloživost izoflavona ovisi o biljnoj vrsti u kojoj ih nalazimo, stupnju prerade biljke, te metabolizmu unutar organizma pošto glavnu aktivnost postižu upravo metaboliti, a ne izvorni spojevi. Veći stupanj prerade biljke povezan je s manjim sadržajem izoflavonoida. Pokazalo se da druga generaciju sojinih proizvoda koja je bogata izoflavonoidima (npr. tofu), sadrži samo 6 - 20% od ukupnog iznosa izoflavonoida u odnosu na neprerađenu soju (Duncan i sur. 2003). U biljnoj vrsti izoflavoni se nalaze kao glukokonjugati koji su biološki neaktivni, te najprije podliježu hidrolizi i postaju aglikoni. Kao aglikoni izoflavoni i lignani imaju tri moguća puta: izlučuju se iz crijeva, apsorbiraju se ili podliježu daljnjem metabolizmu. Proizvodi metabolizma lignana i izoflavona mogu biti izlučeni ili apsorbirani. Ako se apsorbiraju, tada se u jetri spajaju s glukoronskom kiselinom ili sulfatom i izlučuju u urinu ili žuči. Crijevne bakterije proizvode β-glukoronidaze, enzime koji mogu rastaviti metabolite fitoestrogena tijekom njihovog prolaza kroz crijevo i tako omogućuju njihovu ponovnu cirkulaciju kroz tijelo. Fitoestrogeni se istražuju kao moguća alternativa u liječenju i prevenciji mnogih bolesti koje nastaju kao posljedica estrogenskog manjka. Dosadašnja istraživanja fitoestrogena mogu se podijeliti na *in vitro* istraživanja na koštanim stanicama, *in vivo* istraživanja na životinjskim modelima, klinička istraživanja te epidemiološka istraživanja kao i istraživanja dijetetskih navika. Epidemiološki podaci podupiru zaštitni učinak prehrane s visokim udjelom fitoestrogena i smanjene pojavnosti o estrogenu ovisnih malignoma (dojka, crijevo, prostata) (Keinan-Boker i sur. 2004). U stanjima estrogenskog manjka (menopauza, ovarijektomija i dr.) estrogenska aktivnost izoflavonoida može postati očita (Kuiper i sur. 1998; Lephart i sur. 2005). Epidemiološka istraživanja te animalna i klinička istraživanja *in vitro* i *in vivo* podupiru mišljenje da fitoestrogeni pored ostalih učinaka mogu prevenirati gubitak koštane mase povezane sa menopauzom (Coxam 2008). Epidemiološki podatci i istraživanja dijetetskih navika pokazuju manju učestalost osteoporoze u žena koje žive u Japanu i u prehrani koriste mnogo soje, u odnosu na žene koje se hrane zapadnjačkim načinom (Cooper i sur. 1992). U zrnima soje i sojinim proizvodima pronađeni su fitoestrogeni genisteinom i daidzeinom kojima

je potvrđeno da potiskuju aktivnost osteoklasta tako što induciraju apoptozu i aktiviraju protein tirozin fosfatazu (Setchel i sur. 2003).

Poznata je pojava koju nazivamo Francuski paradoks, a označava smanjenu učestalost bolesti srca i krvnih žila među francuskom populacijom usprkos uživanju u hrani i piću. Prvi su tu pojavu opisali britanski znanstvenici prije više od 40 godina, a svoja su opažanja temeljili na službenim nacionalnim statističkim podatcima. Zaključak je da je među Francuzima paradoksalno to što uživaju u masnim sirevima koji su veoma bogati zasićenim mastima, a nemaju očekivano visoku stopu srčanih bolesnika. Jedno od objašnjenja je uživanje u crnom vinu bogatom zaštitnim materijama poput polifenola koji koče oksidaciju LDL-kolesterola, prekidajući prvi korak u stvaranju aterogeneze (Kazazić 2004).

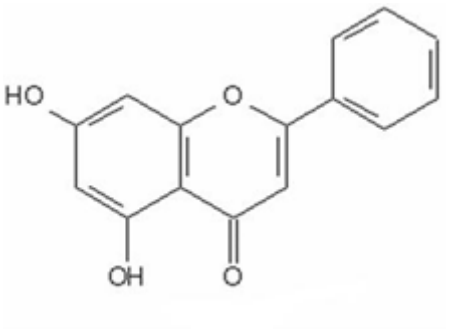
Većina *in vivo* istraživanja učinka fitoestrogena, uglavnom genisteina i daidzeina iz soje, provedena je na glodavcima koji su u većini slučajeva bili ovariektomizirani, dok su neka istraživanja provedena i na primatima i svinjama. Istraživanja na štakorima hranjenim sojom u usporedbi s kontrolnom skupinom pokazuju veću mineralnu gustoću kosti kod štakora hranjenih sojom. Istraživanja provedena na ovariektomiziranim majmunima i svinjama nisu pokazale pozitivan učinak na kost što se objašnjava različitim odgovorom pojedinih vrsta na djelovanje izoflavonoida (Jayo i sur. 1996; De Vilde i sur. 2001).

Biološki učinci koji uključuju nekoliko fizioloških sustava (pored ostalog i koštani sustav), kao i jasni mehanizmi djelovanja fitoestrogena nisu do kraja u potpunosti razjašnjeni. Hipoteze brojnih istraživanja govore o inhibiciji koštane razgradnje supresijom osteoklastične diferencijacije i njihovog sazrijevanja, povećanju protuoksidativnog kapaciteta i/ili smanjenjem oštećenja nastalog oksidativnim stresom, te učinku posredovanom primarno aktivacijom ERα (Hertrampf i sur. 2007; Shen i sur. 2008; Zhang i sur. 2010).

Prema dosadašnjim analizama o učinku izoflavonoidnih fitoestrogena temeljenim na malom broju relevantnih istraživanja i različitosti metodološkog pristupa, može se dati samo sugestija za uzimanje izoflavonoida koji imaju koristan učinak na koštani sustav, jer još uvijek ne postoje jasne terapijske smjernice o njihovoj primjeni u preventivne ili kurativne svrhe kod osteoporoze.

2.3.4. Krizin

Krizin (5, 7-dihidroksiflavon) je prirodni flavonoid ekstrahiran iz različitih biljaka koji spada u skupnu **flavona** (Slika 12). Komercijalno se dobiva iz biljne vrste Passiflora caerulea. Možemo ga pronaći kao biološki aktivnu komponentu u medu i propolisu (Pichichero i sur. 2011).



Slika 12. Strukturna formula krizina (preuzeto od Josipović Oršolić, 2008)

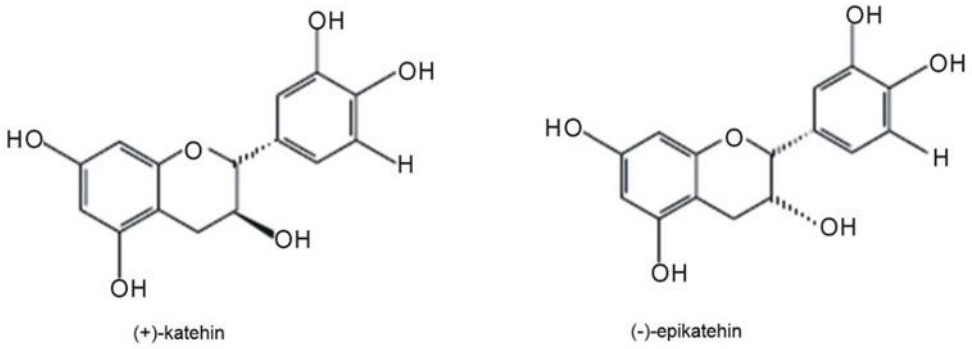
Bioraspoliživost ovisi o njegovu metabolizmu koji se uglavnom odvija u probavnom sustavu, a u plazmi ga se nađe svega 0,003–0,02% od unesene količine (Walle i sur. 2001).

Molekularni mehanizmi djelovanja krizina nisu u potpunosti jasni. Proučava se uloga krizina u kancerogenezi jer je pokazano kako posjeduje protuoksidativna i potuupalna svojstva, te može izazvati staničnu smrt (Pichichero i sur. 2011; Khan i sur. 2011).

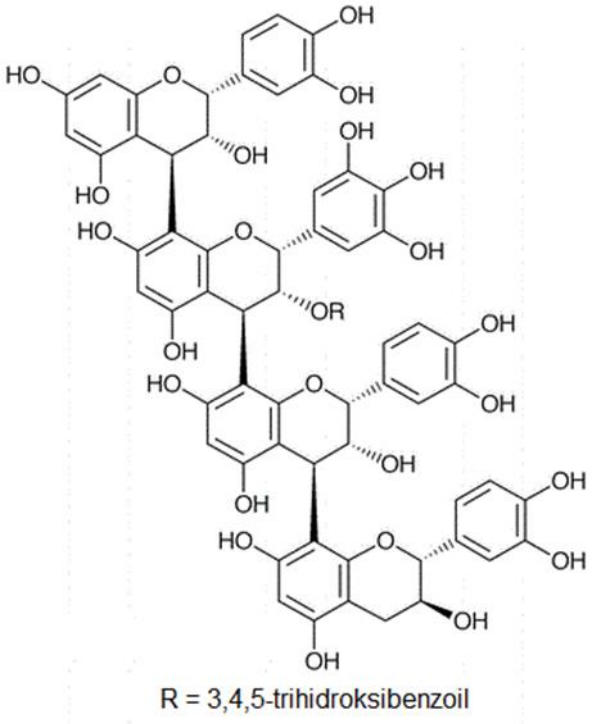
Prema *in vitro* istraživanjima rađenim na kulturama stanica ljudskog karcinoma, krizin preko indukcije pojačane ekspresije TNF-srodnog apoptoza-inducirajućeg liganda (TRAIL; engl. *tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand*), te potičući kaspaze–ovisni put i aktivaciju kaspaze 8 pojačava apoptozu stanice. U *in vivo* istraživanjima pokazan imunosupresivni učinak krizina i zaštitni učinak prema jetrenim stanicama (Li i sur. 2011; Khan i sur. 2011; Lv i sur. 2011). Krizin usporava aktivnost aromataze, enzima važnog u metabolizmu spolnih hormona i tako sprječava pretvorbu testosterona u druge hormone kao što je estrogen i dihidrotestosteron (DHT) koji izazivaju ćelavost ili povećanje prostate (Berg-Divald 2009), dokazano je djelovanje krizina na krvne žile u smislu vazodilatacije što je djelomično ovisno o putu NO/cGMP (Villar i sur. 2004), a preko GABA receptora pokazuje sedirajući učinak (Zanoli i sur. 2000).

2.3.5. Proantocijanidini

Spadaju u **flavanolnu** podskupinu flavonoida. Monomerni oblik flavanola naziva se katehin. Proantocijanidini su polimeri katehinskih i/ili epikatehinskih monomernih prekursora (Xie i sur. 2003) (Slika 13 i 14).



Slika 13. Prekursori proantocijanidina (ketehin i epikatehin) (preuzeto i prilagođeno od Ramalho i sur. 2014)



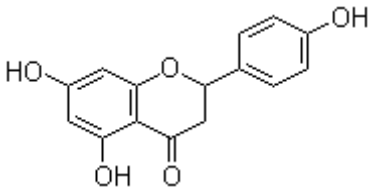
Slika 14. Primjer oligomernog proantocijanidina iz korijena biljke *Polygonum coriarum* (preuzeto i prilagođeno od Ferreira i sur. 2000)

Kao glavni prirodni izvori proantocijanidina se navode crno grožđe, brusnica, crno vino i aronija (Wu i sur. 2004). Bioraspoloživost i apsorpcija ovisi o crijevnoj mikroflori. Istraživanja

su pokazala protuoksidativni, protuupalni i protuproliferativni učinak ovih spojeva, te se u tom smjeru proučava njihova zaštitna uloga vezana uz srce i krvožilni sustav. Proantocijanidini pokazuju protutrombotska svojstava preko kočenja aktivacije trombocita kao i trombocitno-ovisnog upalnog odgovora što predstavlja jedan od značajnijih čimbenika u sprječavanju nastanka infarkta miokrada i ishemičke srčane bolesti (Rein i sur. 2000; Vitseva i sur. 2005). Pokazano je kako proantocijanidini djeluju na lipidnu homeostazu odnosno imaju hipolipidemični učinak (Bladé i sur. 2010). U *in vivo* istraživanju dokazan je pad upalnih biljega kao što su C reaktivni protein (CRP), IL-6 i TNF-α te povećanje proizvodnje protuupalnog citokina kao što je adiponektin kod štakora koji su bili na hiperlipemičnoj dijeti i ispoljavali umjereni upalni odgovor (Terra i sur. 2009), također dokazano je djelovanje na krvne žile u smislu vazodilatacije, koje je ovisno o dozi, a posredovano aktivacijom endogene sintaze dušičnog oksida (eNOS; engl *endogenous nitric oxide synthase*) i uključuje NO/cGMP puteve (DalBo i sur. 2008).

2.3.6. Naringenin

Naringenin (5, 7, 4 -trihidroksiflavanone) je flavonoid iz skupine **flavanona**, a kemijska mu je formula $C_{15}H_{12}O_5$ (Bugianesi 2002) (Slika 15).



Slika 15. Struktura naringenina (Preuzeto od chemBlink 2010)

Naringenin je poznat kao flavanon citrusnog voća a nalazi se u kori rajčice te se može dobiti iz kuhanog pirea rajčica u zadovoljavajućim količinama (Bugianesi 2002). Dominantan je u grejpu te se najveće koncentracije naringenina u prehrani mogu naći upravo u soku od grejpa. Gorak okus grejpa dolazi od naringenina. Mnogo naringena u prehrani dobivamo i u soku od naranča (Erlund i sur. 2001).

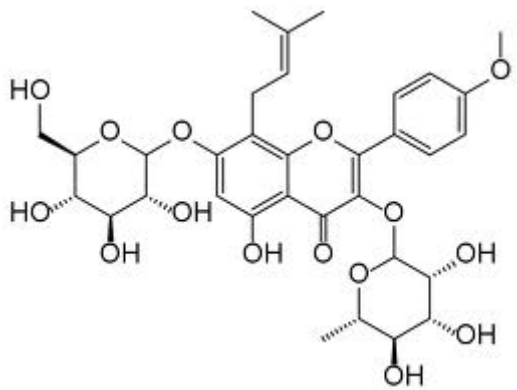
U hrani se uglavnom nalazi u obliku glikozida, poput naringenin-7-ramnoglukozida (poznatog kao naringin) ili naringenin-7- glukozida. Apsorpcija se vrši u tankom i debelom crijevu i najčešće je potrebna hidroliza kao i kod većine flavonoida. Svega 15% naringenina uzetog oralno apsorbira se u gastrointestinalnom sustavu čovjeka tako da je njegova iskorištenost iz

hrane mala (Hou i sur. 2000). Smatra se da naringenin svojim protuoksidativnim djelovanjem i djelovanjem na estrogenske receptore ima poželjne učinke u borbi protiv karcinoma (dojka, crijevo, maternica) (Gamet-Payrastre i sur. 1999; Keinan-Boker i sur. 2004; Harmon i sur. 2004; Milner 2006; Moon i sur. 2006; Galluzzo 2008). Naringenin pojačava signalne puteve posredovane ERβ koji su važni u apoptozi karcinomskih stanica, te oštećuje signalne puteve posredovane ERα važne za proliferaciju stanične linije karcinoma ovisnih o estrogenu (Totta i sur. 2004; Virgili i sur. 2004). Protuoksidativno djelovanje ovih spojeva karakterizirano je povećanjem razine protuoksidanasa kao što su superoksid dismutaza (SOD) i katalaza (CAT) te smanjenje razine proizvoda lipidne peroksidacije (Mi-Kyung i sur. 2002). Naringenin reducira oksidativno oštećenje DNA *in vitro*. Istraživanja ukazuju da naringenin može stimulirati popravak DNA i u stanicama karcinoma. Smatra se da bi naringenin mogao spriječiti mutagene promijene u stanicama karcinoma prostate (Gao i sur. 2006).

Naringenin smanjuje plazmatske i jetrene koncentracije kolesterola (Lee i sur. 1999), može koristiti u spriječavanju debljanja i obolijevanja od dijabetesa tipa 2, te pomoći u sprječavanju nastanka bolesti srca i krvožilnog sustava. Naringenin smanjuje porast razine triglicerida i kolesterola u diajabetesu te spriječava razvoj rezistencije na inzulin u miševa hranjenih masnom hranom. Potiče jetru na sagorjevanje višaka masti umjesto pohrane, sprječavajući pretilost miševa (Huff i sur. 2009). Razmatra se njegova korist u sprječavanju nastanka Alzheimerove bolesti (Heo i sur. 2004).

2.3.7. Ikarin

Ikarin (8-isoamileneflavonol) je flavonoid koji spada u skupinu **flavonola,** a kemijska mu je formula $C_{33}H_{40}O_{15}$ (Slika 16) (Ma i sur. 2011).



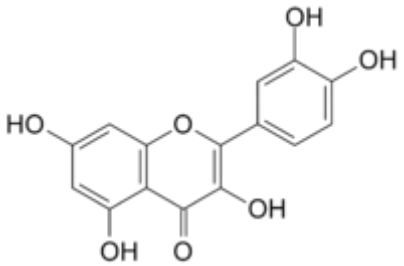
Slika 16. Strukturna formula ikarina (Preuzeto od Ma i sur. 2011)

Ikarin se dobiva iz biljne vrste Epimedii Herba čiji je glavni aktivni sastojak. Istraživanja pokazuju poželjne učinke ikarina u borbi protiv karcinoma preko inhibicije stanične proliferacije u kulturi stanica humanog karcinom dojke kao i jetrenog karcinoma. Pokazan je i inhibitorni učinak u kulturi stanica humane promijelocitne leukemije. Ikarin pokazuje protuupalna, protubakterijska i protuvirusna svojstava od kojih su i neka pokazana i u kliničkim istraživanjima (Sze i sur. 2010; Ma i sur. 2011).

Značajan je učinak ikarina na koštani sustav. *In vitro* istraživanja pokazuju sposobnost ikarina da stimulira osteoblastičnu proliferaciju i diferencijaciju povećanjem proizvodnje koštanog morfogenetskog proteina (BMP; engl. *bone morphogenetic protein*) 2 i 4, β-katenina i ciklina D1 (Zhang i sur 2010). Također ikarin u određenim koncentracijama djeluje i na funkciju osteoklasta inhibirajući koštanu razgradnju kao i smanjenje broja resorpcijskih lakuna (Ma i sur. 2011). Matabolit ikarina-ikarozid smanjuje ekspresiju gena te posljedično aktivnost matriksmetaloproteinaze 9, tartrat-rezistentene acidofosfataze), aktivatora receptora NF-β (RANK) i katepsina K (Choi i sur. 2010). Sve to ukazuje na njegovu moguću uporabu u liječenju bolesti kod kojih dolazi do koštanog gubitka.

2.3.8. Kvercetin

Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) pripada **flavonolskoj** skupini flavonoida te je jedan od najzastupljenijih i do sada najistraživanijih flavonoida (Slika 17). Kvercetin je aglikon (nema vezane molekule šećera), a javlja se i u glikozilirajućem obliku kao rutin (5,7,3',4'-OH,3-rutinoza).



Slika 17. Kemijska struktura kvercetina (Preuzeto sa stranice:

http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---Q/Quercetin.htm)

U brojnim istraživanjima kvercetin se pokazao kao najaktivniji bioflavonoid, a brojne ljekovite biljke svoju aktivnost duguju upravo kvercetinu. Nalazimo ga u voću, povrću, propolisu, čajevcu, crnom vinu, a u velikim količinama se nalazi u svježem crvenom luku (200-600 mg kvercetina/kg luka) (Boots i sur. 2008).

Prosječan dnevni unos flavonoida u zapadnjačkoj ishrani iznosi oko 23 mg, od čega kvercetin čini 60 - 75% (Wong i sur. 2008). U biljkama se kvercetin uglavnom nalazi u obliku rutina koji mora biti hidroliziran uz pomoć crijevne flore da bi se mogao apsorbirati u tankom crijevu, a istraživanja provedena na dobrovoljcima s ileostomom pokazala su da njegova apsorpcija čak nadilazi apsorpciju aglikonskog oblika kvercetina (52% glikozilirani a 24% aglikonski) (Hollman i sur. 1995). Također i druga istraživanja rađena na zdravim dobrovoljcima pokazala su da je apsorpcija kvercetina značajano pojačana njegovom konjugacijom sa šećernom grupom što sve rezultira višom plazmatskom koncentracijom i povećanom bioraspoloživosti (Erlund i sur. 2000). Moguće objašnjenje ove povećane apsorpcije je olakšana apsorpcija glikozida deglikozilacijom ili transportom pomoću „nosača“. Deglikozilacija kvercetina uključuje β-glukozidaze koje su sposobne osloboditi aglikon za pasivnu difuziju. Nakon apsorpcije, kvercetin se metabolizira u raznim organima, uključujući tanko i debelo crijevo, jetru i bubrege (Boots i sur. 2008). U normalnim okolnostima, u ljudi, koncentracija kvercetina u plazmi je u niskom nanomolarnom rasponu, no prilikom unosa kvercetina u dozi od 1 g dnevno tijekom četiri tjedna može se povećati od visokog nanomolarnog do niskog mikromolarnog raspona (Conquer i sur. 1998). Raspodjela kvercetina i njegovih metabolita u tkivima štakora i svinja je najveća u plućima (štakori) te u jetri i bubrezima (svinje). Kod štakora, najniža koncentracija kvercetina pronađena je u mozgu, masnom tkivu i slezeni, a kod svinja u mozgu, srcu i slezeni (Woude van der 2006). Pluća svinja nisu analizirana. Poluživot kvercetinskih metabolita je visok, tj. 11 do 28 sati. To znači da se ponavljanim unosom kvercetina može postići značajna razina u plazmi (Boots i sur. 2008). Jedno od izuzetnih svojstava kvercetina jest bioakumulacija u organizmu zbog relativno dugog poluvijeka eliminacije iz organizma (oko 24 sata). Najveća koncentracija u krvi javlja se dva sata nakon konzumiranja. U normalnoj i ispravnoj ljudskoj prehrani sadržaj kvercetina najčešće se kreće od 15 do 500 mg dnevno, što ima izuzetno dobro preventivno značenje za zdravlje ljudi, a ograničenja prilikom konzumacije putem hrane ne postoje (Šaban 2005).

Dokazana su brojna pozitivna djelovanja kvercetina, protuoksidativno, protuupalno, protukoagulativno, protubakterijsko, protuaterogeno i protuproliferativno. Od svih flavonoida, kvercetin je najbolji „čistač“ reaktivnih spojeva kisika (ROS), uključujući $O_2^{-\bullet}$, i reaktivnih

dušikovih spojeva (RNS) kao primjerice NO i $ONOO^-$. Ova protuoksidativna sposobnost pripisuje se prisustvu hidroksilne skupine na poziciji 3-flavonola te dvije hidroksilne skupine na fenilnom prstenu (Boots i sur. 2008). Protuoksidativni učinak kvercetina se pojačava u nazočnosti askorbata (vitamin C). To pojačanje se pripisuje sposobnosti askorbata da reducira oksidirani kvercetin, a kvercetina da inhibira fotooksidaciju askorbata.

Kako su reaktivni kisikovi spojevi uključeni u razvoj upalnih procesa, uglavnom putem aktivacije faktora transkripcije i induciranja proizvodnje citokinina, tako kvercetinu možemo pripisati jaka protuupalna svojstva. Koči stvaranje citokina potaknuto lipopolisaharidima (LPS) (TNF-α u makrofazima, IL-8 u stanicama pluća), biosintezu metabolita arahidonske kiseline (leukotriena LT4 i prostaglandina PG2) i aktivnost proupalnih enzima ciklooksigenaza i lipoksigenaza (Read 1995; Manjeet i sur. 1999; Geraets i sur. 2007; Boots i sur. 2008). Protualergijska aktivnost kvercetina posredovana je kočenjem oslobađanja alergijskog posrednika imunoglobulina E (IgE), kao i kočenjem stvaranja i oslobađanja peptido-leukotriena u plućima (važno kod astme) putem smanjenja enzima AE5-lipoksigenaze, uz već navedeno djelovanje na metabolite arahidonske kiseline (Šaban 2005).

Provedena *in vivo* istraživanja na zdravim volonterima nisu pokazala povoljne učinke na zdravlje što se tiče čimbenika rizika za koronarne bolesti. Ovaj nedostatak može se objasniti činjenicom da je istraživanje izvršeno u zdravih volontera koji su pokazali relativno niske razine oksidativnog stresa i stoga im nije bila potrebna dodatna antioksidacijska obrana (Boots i sur. 2008).

Istraživanje provedeno na osobama s hipertenzijom, pokazalo je značajno smanjenje sistoličkog, dijastoličkog i glavnog arterijskog tlaka. Kod osoba s prehipertenzijom nisu primijećene nikakve razlike u krvnom tlaku nakon unosa kvercetina. Stoga se smatra da se povoljni učinci kvercetina na zdravlje mogu najviše očekivati kada su bazalne razine oštećenja povišene (Boots i sur. 2008).

Pokazan je pozitivan učinak kvercetina u istraživanju provedenom na ljudima koji boluju od kronične upalne plućne bolesti sarkoidoze (Boots i sur. 2008).

Kvercetin može biti i protuoksidans i prooksidans, ovisno o koncentraciji i o izvoru slobodnih radikala u stanici (Lee i sur. 2003). Prilikom oksidacije kvercetina nastaju otrovni spojevi kinoni. Toksičnost kinona prikazana je u mnogim *in vitro* istraživanjima što se naziva „kvercetinski paradoks“ (Boots i sur. 2007). Dokazan je mutageni učinak kvercetina u bakterijskim sustavima, dok isti nije izražen u stanicama sisavaca. Pretpostavka je da kvercetin

daje mutageni odgovor u stanicama sisavaca uzrokujući kromosomska oštećenja. Kinoni zbog svog elektrofilnog karaktera mogu formirati kovalentne veze sa staničnim makromolekulama, uključujući DNA, RNA i proteine. Tako mogu ometati stanične procese (Gaspar i sur. 1994; Woude van der 2006; Boots i sur. 2008). Dokazani su brojni pozitivni učinci kvercetina, dok mehanizami genetičkog oštećanja kvercetinom nisu do kraja poznati i potrebna su još brojna predklinička i klinička istraživanja da bi se mogla dati jasna preporuka o uzimanju kvercetina.

2.4. SLOBODNI RADIKALI I OKSIDATIVNI STRES

2.4.1. Slobodni radikali i reaktivni spojevi

Redoks reakcije (oksidoredukcija ili redukcijsko-oksidacijske reakcije) ubrajaju se među najvažnije i najčešće kemijske reakcije koje se zbivaju tijekom mnogih fizioloških procesa u prirodi npr. fotosinteza i u živom organizmu npr. stanično disanje. U ovim reakcijama dolazi do oksidacije i redukcije tj. izmjene elektrona između dva redoks sustava i time promjene oksidacijskih brojeva atoma kemijskih tvari koje su sudjelovale u reakciji. Tako nastaju tzv. slobodni radikali. Tvar koja otpušta elektrone i pritom se oksidira naziva se reducens, jer svojim otpuštenim elektronima istodobno reducira drugu tvar. Obrnuto, tvar koja prima elektrone i pritom se reducira naziva se oksidans, jer istodobno omogućuje oksidaciju tvari od koje prima elektrone. Slobodni radikali (Tablica 7) su molekule ili atomi koji u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona (Stevanović i sur. 2011). Iako su sposobni za samostalno postojanje (Aruoma 1994; Close i sur. 2005), slobodni radikali su nestabilni, tj. kemijski visoko reaktivni, zato što nespareni elektron koji se nalazi u njihovoj vanjskoj orbitali teži da se stabilizira sparivanjem s drugim elektronom. Tako, kada radikali reagiraju s neradiklima nastaju novi, tzv. sekundarni slobodni radikali, odnosno dolazi do propagacije i stvaranja čitavog niza radikala (lančana reakcija) (Cheeseman i sur. 1993; Close i sur. 2005). Slobodni radikali nastaju u organizmu tokom normalnih fizioloških procesa poput oksidativne fosforilacije u mitohondrijima, prijenosu elektrona u sustavu citokroma P-450 u endoplazmatskom retikulumu, oksidacije masnih kiselina u peroksisomima, metabolizmu arahidonske kiseline u staničnim membranama, fagocitozi. Mogu se stvarati i u patološkim stanjima poput infekcija, izloženosti toksinima (alkohol, cigaretni dim), izloženosti ionizirajućem i UV zračenju ili uslijed pretjerane tjelovježbe (Halliwell i sur. 1999; Rodrigo 2009; Poljsak i sur. 2013). Reakcije oksidacije i redukcije u biološkim sustavima su baza za

brojne biokemijske mehanizme metaboličkih promjena, gdje slobodni radikali mogu doprinijeti održavanju homeostaze, a mogu i naštetiti te poremetiti normalno funkcioniranje stanice.

Više od 90% kisika koji dospije u ljudske stance koristi se za proizvodnju energije, a mitohondriji su mjesta gdje se proizvodi više od 80% adenozin-trifosfata (ATP).

U uvodu je navedeno kako se u fiziološkim uvjetima organizma metabolizira oko 95% kisika (O_2) u vodu bez stvaranja toksičnih međuprodukata. Ostalih oko 5% metabolizira se u respiratornom lancu mitohondrija putem jednovalentnih redukcija, kroz četiri različite reakcije:

Reakcija 1: $O_2 + e \rightarrow O_2\bullet^-$

Reakcija 2: $O_2\bullet^- + e \rightarrow H_2O_2$

Reakcija 3: $H_2O_2 + e \rightarrow \bullet OH$

Reakcija 4: $\bullet OH + e \rightarrow H_2O_2$

Kroz ove četiri reakcije nastaju tri vrlo toksične vrste, dvije od njih su slobodni radikali kisika (ROS engl. *reactive oxygen species*), superoksidni radikal ($O_2\bullet^-$) i hidroksi radikal (•OH). Vodikov peroksid (H_2O_2) je još uvijek vrlo reaktivni spoj, ali ne i radikalni u strogom smislu (Rodrigo 2009) (Tablica 7).

Tablica 7. Reaktivni spojevi kisika

Slobodni radikali	**Čestice koje nisu slobodni radikali**
superoksidni, $O_2\bullet^-$	vodikov peroksid, H_2O_2
hidroksilni, OH•	hipokloritna kiselina, HOCl
peroksilni, ROO•	ozon, O_3
alkoksilni, RO•	singletni kisik, $^1O_2$
hidroperoksilni, $HO_2\bullet$	

(Preuzeto od Štefan i sur. 2007)

Nemitohondrijski izvori slobodnih radikala su procesi Fentonove reakcije, mikrosomalni citokrom P_{450}, enzimi, peroksisomalna beta-oksidacija te respiratorni prasak koji se zbiva u fagocitirajućim stanicama (Poljsak i sur. 2013) (Tablice 8 i 9).

Tablica 8. Nastanak ROS-a neenzimskim putem

Fenton-ova reakcija	$Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + \bullet OH + {}^{-}OH$
Haber – Weiss-ova reakcija	$O_2\bullet^{-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \bullet OH + OH^{-}$ $Fe(III) + O_2\bullet^{-} \rightarrow Fe(II) + O_2$

(Preuzeto od Rodrigo 2009)

Tablica 9. Nastanak ROS/RNS enzimskim putem

Ksantin oksidaza (XO)	ksantin + $H_2O + O_2 \rightarrow$ mokraćna kiselina + $O_2\bullet^{-}$
NADPH oksidaza (Nox)	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^{+} + 2O_2\bullet^{-} + H^{+}$ $2O_2\bullet^{-} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$
Mijeloperoksidaze (MPO)	$H_2O_2 + Cl^{-} \xrightarrow{MPO} HOCl + H_2O$
Citokrom P450	$NADPH + H^{+} + O_2 + RH \rightarrow NADP^{+} + H_2O + R\text{-}OH$
Dušik oksid sintaza	L-arginin + 3/2 $NADPH + H^{+} + 2O_2$ citrulin + NO + 3/2 $NADP^{+}$

(Preuzeto od: Rodrigo 2009)

Kao što je već navedeno ROS doprinose održavanju homeostaze u organizmu sudjelujući u fiziološkim reakcijama i staničnim funkcijama, ali također mogu u određenim stanjima dovesti do oštećenja stanica izravno ili neizravno.

Vodikov peroksid (H_2O_2) može biti toksičan ako je prisutan u visokim koncentracijama u stanici, lako prolazi kroz staničnu membranu i može se reducirati u hidroksilni radikal (OH•) u prisutnosti prijelaznih metala poput željeza (odnosno Fe^{2+}) i bakra (tj. Cu^{+}) . OH• je visoko reaktivni spoj koji brzo reagira s bilo kojom molekulom u dosegu od nekoliko angstroma (Å). Jedno od važnijih otkrića u pokušaju objašnjenja štete koju uzrokuju oksidativni procesi u biološkim sustavima dao je Fenton 1864 godine, koji je provodio istraživanja vezana uz oksidaciju vinske kiseline. Područje oksidacije organskih spojeva u prisutnosti željeza i vodikova peroksida naziva se Fentonovom kemijom. On je opisao međureakciju između Fe^{2+} i H_2O_2 kojom dolazi do proizvodnje OH•, koja je prikazana u Fentonovoj jednadžbi ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH• + OH-$) (Štefan i sur. 2007; Poljsak i sur. 2013).

Većina prijelaznih metala (prvi red D bloka periodnog sustava elemenata) sadrži nespareni elektron i mogu se, uz iznimku cinka, smatrati radikalima. Najviše su zastupljeni željezo i bakar koji se u biološkim sustavima najčešće nalaze vezani za proteine, DNA ili druge makromolekule tj. kelate odakle sudjeluju u reakcijama redoksa. Metalni ioni skriveni unutar strukture proteina, poput katalitičkih mjesta i citokroma tj. oni koji nisu izloženi ROS-u ne mogu sudjelovati u ovim reakcijama (Kohen i sur. 2002). OH• lako i brzo uništava DNA, lipide membrana te ugljikohidrate.

U većini stanica, H_2O_2 se pretvara u spojeve koji nisu štetni, uglavnom pomoću dva veoma važna protuoksidativna enzima – katalazom i selenij-ovisnom glutation peroksidazom (GPx). GPx iskorištava H_2O_2 kao supstrate prilikom konverzije reduciranog glutationa (GSH) u sulfidni oblik (GSSG) (Gadoth i sur. 2011).

Uz reaktivne spojeve kisika, veliku važnost imaju i reaktivni spojevi dušika (RNS, engl. *reactive nitrogen speacies*) od kojih su najvažniji dušikov-(II)-oksid (NO•) i dušikov-(IV)-oksid (NO_2•). NO• jest relaksacijski čimbenik krvožilnoga sustava, koji kao radikal može reagirati s endogenim radikalima, primjerice sa superoksidnim radikalom, stvarajući peroksinitrite ($ONOO^-$) koji su izrazito jaki oksidansi (direktno oštećuju DNA), a pri kiselome pH razgrađuju se do hidroksilnih radikala neovisno o prisutnosti prijelaznih metala (Štefan i sur. 2007). Zbog kratkog poluvremena života njegova biološka aktivnost uvelike ovisi o reakciji s superoksidima ($O_2•^-$) i njihovoj koncentraciji.

Tablica 10. Reaktivni spojevi dušika

Slobodni radikali	**Čestice koje nisu radikali**
dušikov (II) oksid, NO •	nitrozil, NO
	nitritna kiselina, HNO_2
dušikov (IV) oksid, NO_2•	dušikov (III) oksid, N_2O_3
	peroksinitrit, $ONOO^-$
	alkilperoksinitrit, ROONO

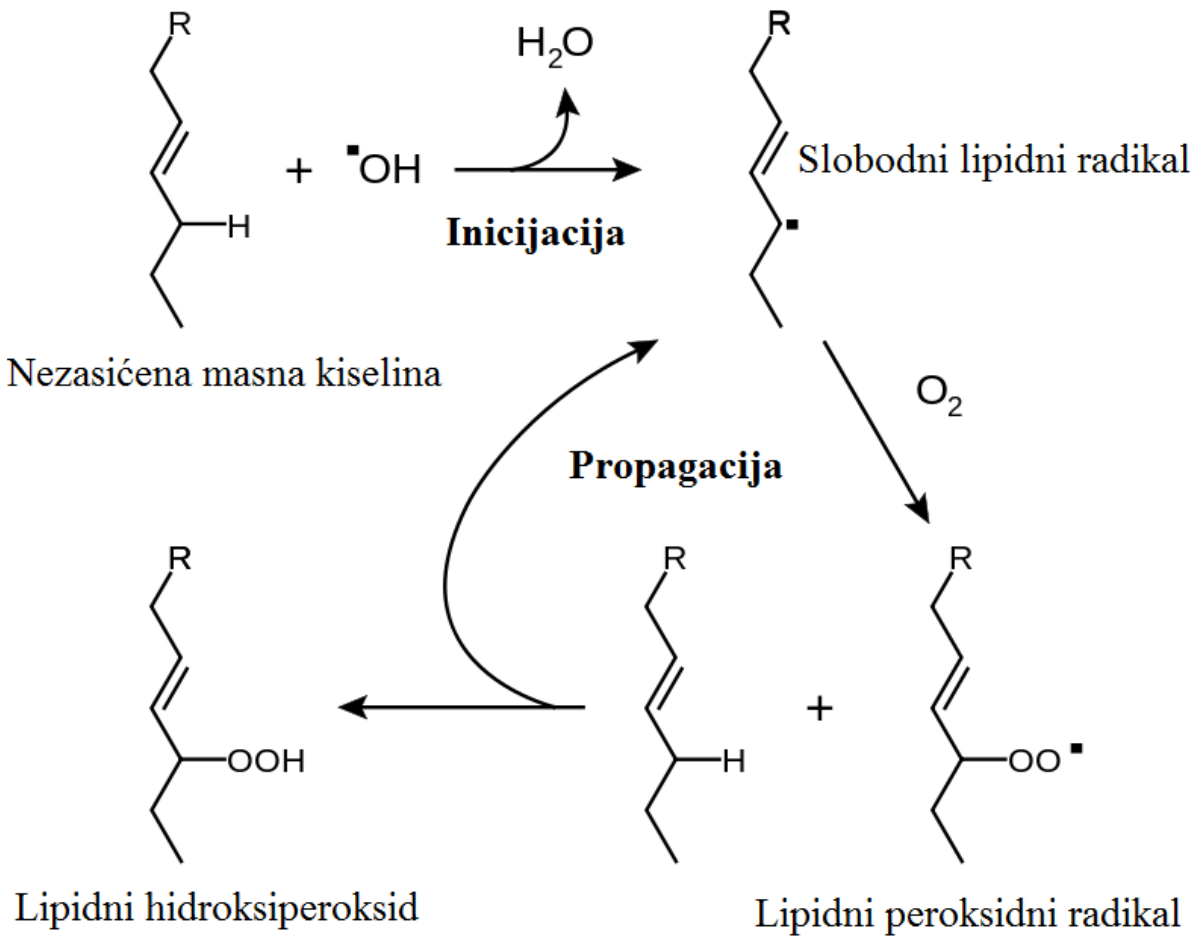
(Preuzeto od: Štefan i sur. 2007)

2.4.2. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija jedan je od najproučavanijih oksidativnih procesa u stanici u kojem višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA; engl. *polyunsaturated fatty acids*) u staničnim membranama podliježu oštećenjima koja uzrokuju reaktivni kisikovi spojevi (Ambriović i sur. 2007). Taj proces u biološkim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrijednosti membranskoga potencijala, povećanja propusnosti prema H^+ i drugim ionima, te do mogućeg puknuća stanice i otpuštanja njena sadržaja (Štefan i sur. 2007). Pokazano je da lipidna peroksidacija ima ulogu u procesu starenja, te mnogim patološkim stanjima kod čovjeka uključujući neurodegenerativne bolesti, dijabetes, bolesti jetre, kardiovaskularne bolesti i tumore (Halliwell 2000; Catala 2009; Hulbert 2010; Reed 2011).

Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal (OH•), međutim i pojedini drugi radikali mogu pokrenuti proces peroksidacije koji se sastoji od tri stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija (Slika 18). U lipidnim sustavima započinjanje peroksidacijskoga niza odnosi se na napad ROS-a, sposobnoga da izdvoji atom vodika iz metilenske skupine (-CH2-). Tako iz PUFA-e nastaju slobodni lipidni radikali (Slika 18). Slobodni radikali koji mogu oksidirati PUFA-u jesu OH•, HO_2•, RO•, te RO_2•, a superoksidni je radikal nedovoljno reaktivan za eliminaciju vodika. Prisutnost dvostrukih veza u masnim kiselinama oslabljuje C-H veze na atomu ugljika u blizini dvostruke veze, te tako premještanje vodika čine lakšim. Ugljikovi radikali nastoje se stabilizirati reorganizacijom molekula, oblikujući konjugirane diene (Halliwell 1991; Štefan i sur. 2007). Konjugirani dieni se mogu spajati s kisikom i stvarati

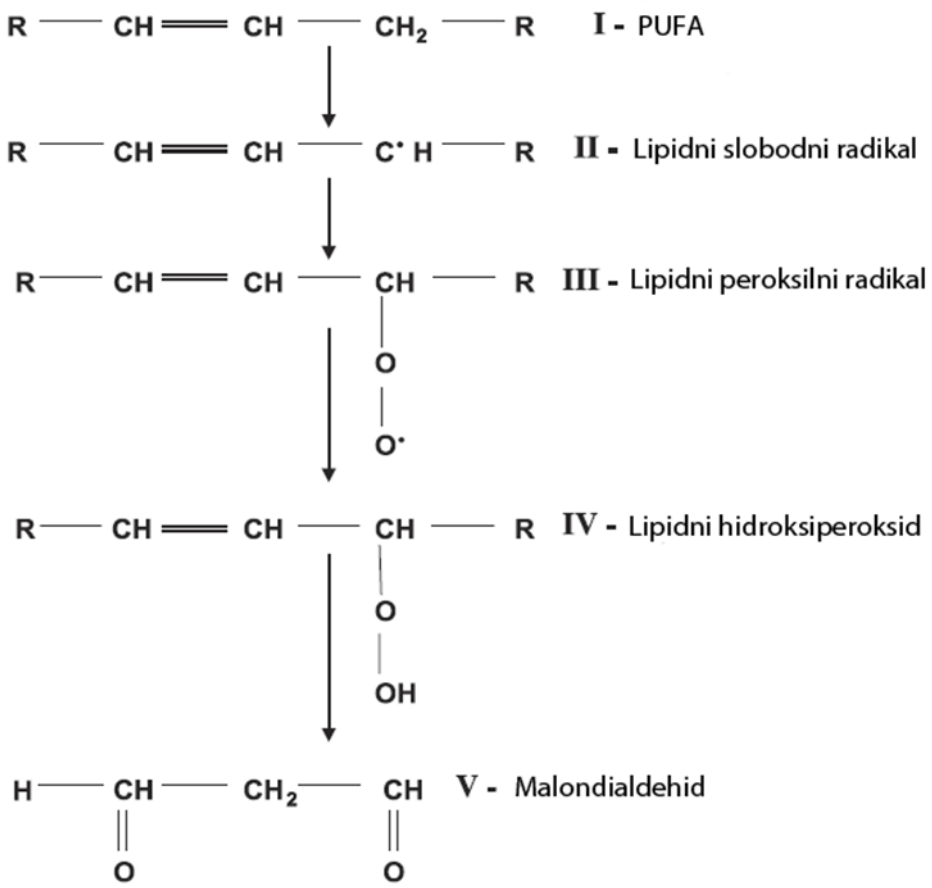
lipidne peroksidne radikale (LOO•), koji pak dalje mogu eliminirati H• iz drugih molekula, uključujući i PUFA-e, pri čemu dolazi do faze propagacije (Slika 18) i pojave lančane reakcije lipidne peroksidacije čiji su krajnji produkti reaktivni aldehidi (heksanal, malondialdehid (MDA) i 4-hidroksi-2-nonenal (HNE)) i izomeri prostaglandina (izoprostani). Iako se zovu „završni produkti lipidne peroksidacije“, oni mogu u određenim uvjetima nastaviti lančanu reakciju oksidacijskog oštećenja. Njihova je reaktivnost niža od reaktivnosti slobodnih radikala, ali dovoljno velika da mogu reagirati s molekulama u okolini te tako oštetiti stanice pa i uzrokovati staničnu smrt (Štefan i sur. 2007).



Slika 18. Pregled lipidne peroksidacije (Preuzeto i prilagođeno sa stranice: https://sl.wikipedia.org/wiki/Reaktivna_kisikova_spojina#/media/File:Lipid_peroxidation.svg

Kao produkt lipidne peroksidacije Malondialdehid (MDA) najpoznatiji je biomarker za određivanje lipidne peroksidacije u biološkim sustavima čiji je put nastanka grafički prikazan na Slici 19. MDA je genotoksičan (Grotto i sur. 2009) i mutagen spoj koji pokazuje izraziti afinitet prema lizinskom aminokiselinskom ostatku pa stoga reagira s proteinima, a također kao

ciljno mjesto ima i gvanin u molekuli DNA. U organizmu se MDA metabolizira do malonatne kiseline (Štefan i sur. 2007). MDA može poslužiti i kao mjera aktivnosti osteoklasta i proizvodnje slobodnih radikala, što narušava redoks ravnotežu u stanici i može dovesti i do osteoporoze (Fahmy i sur. 2009). Superoksidni radikal negativna je naboja, te nema sposobnost ulaska u unutrašnjost stanične membrane (izuzetak je ulazak anionskim kanalima, međutim na svojemu putu ne reagira s PUFA-om), što je dodatni razlog kojim se objašnjava njegovo nesudjelovanje u lipidnoj peroksidaciji. Hidroperoksilni radikal (OH_2•) vrlo je reaktivan, te može potaknuti peroksidaciju stvarajući peroksidne radikale: HO_2•+ ROOH → RO_2• + H_2O_2 (Štefan i sur. 2007). Unos masnih kiselina hranom, poglavito ω-3 PUFA-e, posljeduje povećanjem aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze, što upućuje na povećanu lipidnu peroksidaciju (Domitrović i sur. 2006).



Slika 19. Grafički prikaz nastanka MDA iz PUFA-e (preuzeto od Grotto i sur. 2009)

Pokazano je da unos ω-3 PUFA-e prehranom, može dovesti do njegova povećanja u staničnim membranama, što je nadalje iskorišteno u proučavanju tumorskoga širenja, pri čemu višak ω-3

PUFA-e može dovesti do povećanja lipidne peroksidacije i nakupljanja toksičnih produkata, te inhibicije rasta tumora (Pizato i sur. 2005; Štefan i sur. 2007).

2.4.3. Oksidativni stres i protuoksidansi

Oksidativni stres (OS) karakteriziran je stvaranjem slobodnih radikala za koje je utvrđeno da uzrokuju oštećenja brojnih biomolekula, ali i kao vrlo reaktivne molekule doprinose u održavanju ravnoteže u organizmu sudjelujući u fiziološkim reakcijama i staničnim funkcijama, o čemu je već bilo riječi. Točnije rečeno oksidativni stres se može definirati kao previsoka koncentracija slobodnih radikala (Poljsak i sur. 2013). O kisiku kao potencijalno štetnom elementu prvi je u XVIII stoljeću pisao Švedski znanstvenik C.W. Scheele, prvi radikal kisika otkrio je Linus Pauling 1930. i opisao ga kao superoksid. Od tada do danas su provedena brojna istraživanja kako bi se postigla sadašnja saznanja o povezanosti oksidativnog stresa s različitim i na izgled ne povezanim bolestima.

Danas se zna da slobodni radikali mogu oksidirati gotovo svaku organsku molekulu, te da mogu uzrokovati oštećenja stanice, bilo izravno ili kao posrednici u različitim signalnim putevima. Oni uzrokuju lipidnu peroksidaciju, mogu oštetiti DNA i proteine što vodi do cititoksičnog učinka i stanične smrti ili uzrokuje mutacije i kromosomske aberacije što može dovesti do razvoja karcinoma (McCord 2000; Štefan i sur. 2007).

Oštećenja DNA se smatraju najozbiljnijim ROS/RNS induciranim promjenama; DNA se ne sintetizira de novo nego kopira, dolazi do stalnog ponavljanja i nastanka mutacija i genske nestabilnosti. Glavni ROS odgovoran za oštećenje DNA je hidroksi radikal (•OH), koji reagira sa svim komponentama DNA molekule, oštećuje obje purinske i pirimidinske baze i okosnicu deoksiriboze. Između ostalog, oksidativno oštećenje membrane mitohondrija može dovesti do oslobađanja citokroma C, aktiviranja kaspaza i apoptoze.

Organizam se nalazi pod stalnim djelovanjem slobodnih radikala, a u normalnim uvjetima postoji ravnoteža između formiranja i uklanjanja oksidansa iz organizma. Opstanak života na zemlji bogatoj kisikom ovisi o protuoksidacijskom staničnom sustavu koji zamjenjuje i uklanja produkte oksidacijskog stresa i tako sprječava njihovo povećano stvaranje. Taj složeni sustav čine protuoksidativni enzimi superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPx) te katalaze (CAT), i molekule (glutation, albumini, mokraćna kiselina, vitamini A, E, C i karotenoidi). Navedeni protuoksidansi sprečavaju stvaranje i/ili odstranjuju već stvorene

slobodne radikale te ograničavaju stvaranje i širenje lančanih reakcija koje nastaju kada radikali reagiraju s neradikalima pri čemu nastaju novi, tzv. sekundarni slobodni radikali koji su obično manje reaktivni (Valko i sur. 2007; Rodrigo 2009) (Tablica 11).

Tablica 11. Pregled protuoksidansa

Unutarstanični	
superoksid dismutaze	katalički uklanjaju $O_2^{\bullet -}$
Katalaza	uklanja H_2O_2 kada je prisutan u velikim koncentracijama
glutation peroksidaze	uklanjaju H_2O_2 kada je prisutan u malim koncentracijama; također uklanjaju organske hidroperokside
Membranski	
vitamin E	protuoksidacijsko djelovanje ostvaruje kidanjem lanaca
β-karoten	ima sposobnost uklanjanja singletnog kisika i slobodnih radikala
koenzim Q	ima protuoksidacijsko djelovanje u respiratornome lancu
Izvanstanični	
transferin	veže ione željeza
laktoferin	veže željezo pri nižim vrijednostima pH-a
haptoglobin	veže hemoglobin
hemopleksin	veže hem
albumin	veže bakar, hem i uklanj HOCl
ceruloplazmin	veže ione bakra, koristi vodikov peroksid za reoksidaciju bakra
EC – SOD	katalički uklanja superoksidni anion
EC – GSHPx	katalički uklanja hidroperokside

(Preuzeto od: Štefan i sur. 2007)

Neenzimski antioksidansi djeluju direktno na slobodne radikale, donirajući elektron ili proton radikalu, pretvarajući radikal u relativno stabilan produkt. U tom procesu protuoksidansi i sami postaju radikali te ih je potrebno vratiti u reducirani oblik (Boots i sur. 2008).

Najučinkovitiji enzimski unutarstanični protuoksidans je Superoksid dismutaza koji se nalazi u nekoliko izoformi koje se razlikuju po metalu u aktivnom centru, kao i po aminokiselinskom sastavu, broju podjedinica, kofaktorima i drugim obilježjima. Djeluje tako da katalizira dismutaciju $O_2^{-\bullet}$ do O_2 i H_2O_2. U ljudi su poznate tri izoforme enzima SOD: citoplazmatska Cu-SOD, Zn-SOD, mitohondrijska Mn-SOD te SOD (EC-SOD) (Valko i sur. 2006).

Flavonoidi su snažni protuoksidansi i to je najbolje istraženo svojstvo gotovo svih grupa flavonoida (Nijveldt i sur. 2001; Sandhar i sur. 2011). Dokazano je da *in vitro* koče lipidnu peroksidaciju prekidanjem lančane reakcije radikala, tako što doniraju atom vodika peroksi-radikalu, na taj način formirajući radikale flavonoida koji dalje reagiraju sa slobodnim radikalima i prekidaju lanac (Sandhar i sur. 2011). Radikali flavonoida su stabilniji i manje reaktivni (Nijveldt i sur. 2001). Dokazano je da Flavonoidi podižu bazalne koncentracije unutarstaničnog glutationa, time povećavajući toleranciju stanice na slobodne radikale (Durgo i sur. 2007). Glutation (γ-glutamil-cisteinil-glicin; GSH) je najzastupljeniji tiol (Tioli; grč.: sumpor + alkohol; tioalkoholi) su organski spojevi, sumporni analogni alkoholi s općom formulom R-SH (R = alkilna skupina) male molekulske mase koji ima protuoksidativna djelovanja. Djeluje kao kofaktor enzimu peroksidazi, donirajući elektron potreban za razgradnju H_2O_2. Također, sudjeluje u brojnim drugim biokemijskim putevima, uključujući metabolizam limunske kiseline, održavanje komunikacije među stanicama, prevenciju oksidacije –SH skupina na proteinima. Uz navedeno, djeluje i kao kelirajući agens za ione bakra, sprječavajući ih da se ponašaju kao slobodni radikali, a ima i ulogu u smatanju, razgradnji i međusobnom povezivanju proteina (Kohen i sur. 2002).

GSH se oksidira u prisutnosti slobodni radikala do glutation-disulfida (GSSG). Koncentracija GSH + 2GSSG uzima se kao koncentracija ukupnog glutationa u stanici i omjer [GSH] : [GSSG] indicira redoks stanje stanice. Ukoliko je omjer veći od 10 smatra se da je stanica unutar normalnih fizioloških parametara (Wu i sur. 2004). Nakon reakcije sa slobodnim radikalima, glutation i sam postaje radikal, no može se regenerirati do svog reduciranog oblika (Kohen i sur. 2002) pomoću enzima glutation reduktaze (GSR). Također, glutation je sposoban regenerirati najvažnije antioksidanse – vitamine C i E natrag u njihove aktivne oblike (Valko i sur. 2007).

2.4.4. Oksidativni stres i osteoporoza

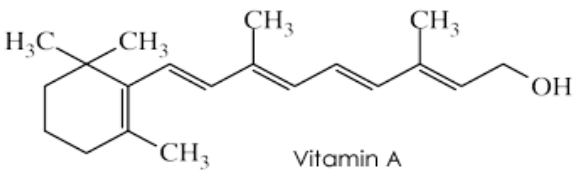
U dosadašnjim istraživanjima utvrđena je poveznica između oksidativnog stresa (OS), povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva (ROS), i gubitka koštane mase, te povećane koštane lomljivosti kao značajki osteoporoze. ROS smanjuje diferencijaciju osteoblasta i povećava osteoklastičnu aktivnost preko receptora nuklearnog faktora κB (RANK-L) i osteoprotegerina (OPG), a povećana aktivnost osteoklasta može doprinijeti dodatnoj proizvodnji slobodnih radikala. Nedostatan protuoksidativni sustav tj. loša neutralizacija ROS-a doprinosi patogenezi osteoporoze, a protuoksidansi mogu smanjiti resorpciju kosti. Poslijednjih godina u *in vivo* istraživanjima poveznica između OS i osteoporoze koristi se retinoični model osteoporoze izazvan retinoičnom kiselinom (13cRA) u štakora (Sheweita 2007; Becker 2010; Mackinnon 2011; Nieves 2012; Zhang 2013; Oršolić 2013).

2.5. VITAMIN A (RETINOIČNA KISELINA)

2.5.1. Fiziološka uloga vitamina A

Vitamin A (**retinol**) je nutrijent prijeko potreban u organizmu u kojem se ne može sintetizirati, već ga je potrebno unositi hranom životinjskog podrijetla (jaja, mlijeko, maslo, ulje riblje jetre), ali se u obliku provitamina beta-karotena dobija i iz biljnih izvora.

Vitamin A se u organizmu pojavljuje u različitim oblicima, pa možemo govoriti o skupini vitamina A. Svi zajedno pripadaju **retinoidima** tj.derivatima **retinoične kiseline** (RA) (esteri, eteri ili alkoholni derivati). Osnovna struktura hidrofobne retinoidne molekule se sastoji od cikličke krajnje grupe, polienskog bočnog lanca i polarne krajnje grupe. Konjugirani sustav formiran od naizmjeničnih dvostrukih ugljikovih veza (C=C) u polienskom bočnom lancu je odgovoran za boju retinoida (tipično žuta, narančasta ili crvena) (Slika 20). Stoga, mnogi retinoidi su kromofori. Izmjenjivanje bočnih lanaca i krajnjih grupa stvara različite razrede retinoida.



Slika 20. Kemijska struktura Vitamina A (Preuzeto sa stranice:

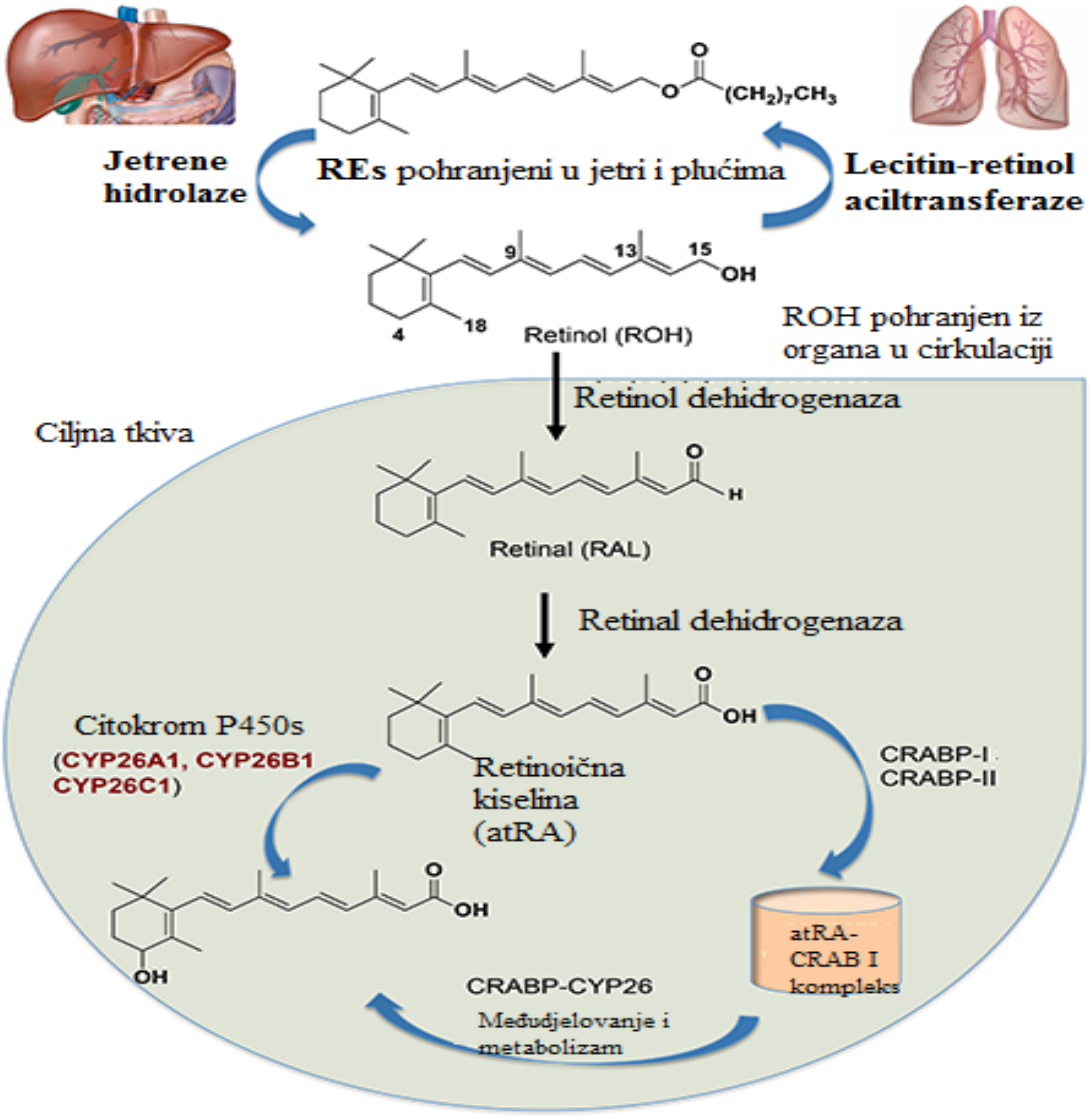
http://hr.wikipedia.org/wiki/Vitamin_A#/media/File:Vitamin_A.gif)

Vitamin A prolazi nekoliko metaboličkih promjena u orgnizmu (Slika 21). Retinoidi u hrani uglavnom su u obliku retinil estera (REs; engl. *retinyl esters*). Oni se u crijevima hidroliziraju na retinol i slobodne masne kiseline. Tako se resorbiraju u lumen, gdje se u luminalnim epitelijalnim stanicama retinol veže za stanični retinol-vežući protein II (CRBP II; engl *cellular retinol –binding protein*) (Ong i sur. 1987). Retinol se zatim u mukoznim stanicama re-esterificira uglavnom palmitatom putem s lecitin-retinol aciltransferazom (LRAT; *engl lecithin-retinol acyltransferase*).

Retinil esteri (REs) su potom uklopljeni, zajedno s drugim lipidima, u hilomikronske čestice koje se izlučuju u limfu kojom dospijevaju u krv. REs tako dospjevaju u jetru gdje se hidroliziraju hepatičkim hidrolazama u retinol. Tijekom ovog procesa slobodni retinol veže se na CRBP-I i transportira u stanice gdje se re-esterificira (LRAT) i pohranjuje. Drugi organi, poput bubrega imaju također sposobnost pohrane REs (Blaner i sur. 1994). Smatra se da je retinol vezan za CRBP-I glavni supstrat za nastanak RE u ciljnim tkivima. Retinol dehidrogenaza oksidira retinol na retinal koji se dalje oksidira retinal dehidrogenazom u RA (Chytil 1979; Napoli 1999).

RA je lipofilna i gotovo u potpunosti vezana za albumin u serumu, te se dijelom metabolizira putem sustava citokrom P450 u brojne izomere uključujući all-trans retinoičnu kiselinu (aTRA), 4-oxo-isotretinoin iz kojeg nastaje 4-oxo tretinoin. Također je bitno naglasiti da je vrlo mali udio retinola u plazmi i tkivu pretvoren u all-trans retinoičnu kiselinu (aTRA), glavni signalni retinoid (Bender i sur. 2003). U jetri se RA katabolizira i konjugira u retinoil-ß glukuronid koji se izlučuje putem žuči, pri čemu se veliki dio reabsorbira enterohepatičkom cirkulacijom i dalje izlučuje putem bubrega. Nakon što RA uđe u stanicu veže se za citosolne retinoične receptore RAR i RXR koji se nalaze u gotovo svim tkivima, te s njima formira

komplekse, koji se translociraju u jezgru u kojoj se veže za određene sekvence DNA, te se pokreće genska transkripcija (Strahan 2006).



Slika 21. Metabolizam vitamina A (Preuzeto i prilagođeno sa stranice:

https://blogs.uw.edu/ni2/retinoic-acid-homeostasis/)

RA ima važnu ulogu u organizmu budući da je ekspresija velikog broja gena upravo regulirana nuklearnim receptorima za koje RA predstavlja ligand (Al Tanoury i sur. 2013). Na staničnom nivou preko regulacije stanične diferencijacije i proliferacije, kao i sinteze RNA, sinteze proteina, post-translacijske glikozilacije, biosinteze prostaglandina, utjecaja na stabilnost

lizosomalne membrane i strukture stanične membrane, RA regulira kompleksne biološke funkcije poput embrionskog razvoja, organogeneze, formiranja kostiju, metabolizma, vida i reprodukcije (Chytil 1979; Sparn i sur. 1994; Strahan 2006). 13-cisRA (isotretinoin) se slabo veže za receptore, ali ona u tkivima izomerizacijom prelazi u aTRA i tako sudjeluje u regulaciji transkripcije gena (Tsukada 2000). Važno je istaknuti da produkcija all-trans retinoične kiseline u organizmu mora biti usko regulirana za pravilnu organogenezu jer preniska koncentracija vitamina A ili previsoka koncentracija RA uzrokuje ozbiljne razvojne malformacije (Lee i sur. 2004). RA se koristi u medicini pri liječenju brojnih različitih bolesti, posebice u liječenju raznoraznih dermatoloških stanja poput upalnih kožnih poremećaja, psorijaze, raka kože, fotostarenja. No, toksični učinci se javljaju kod produženog i povišenog unosa u organizam.

2.5.2. Model osteoporoze u štakora izazvan retinoičnom kiselinom (RMO)

Provedena su brojna *in vitro, in vivo* i epidemiološka istraživanja vezana uz utjecaj vitamina A, odnosno derivata RA na koštani sustav. Dokazana je uloga RA u diferencijaciji i proliferaciji stanica mnogih tkiva, pa tako i koštanih stanica u kojima su pronađeni retinoični receptori i stanični retinol-vežući proteini (CRBP) (Kindmark i sur.1993; Saneshige i sur. 1995; Balmer i sur. 2002).

Obzirom na njihova svojstva, uporaba derivata vitamina A, u dermatološkim oboljenjima kao i u liječenju nekih zloćudnih (hematoloških) bolesti nameće pitanje dnevnog unosa ovog vitamina i mogućih štetnih djelovanja. Literaturni podaci ukazuju da dugotrajna uporaba retinoida u terapijske svrhe je povezana sa štetnim djelovanjem na koštani sustav i dovodi do promjena koštanih biomarkera (DiGiovanna i sur. 1995, 2001; Michaelsson i sur. 2003; Penniston i sur. 2006).

Brojna epidemiološka istraživanja potvrđuju da unos visokih doza vitamina A prehranom dovodi do smanjenja BMD i povećanja rizika za nastanak prijeloma kosti (Feskanich i sur. 2002; Promislow i sur. 2002; Michaelsson i sur. 2003).

Istraživanja na koštanim stanicama i na životinjama pokazuju da vitamin A (retinol) u pretjeranim količinama i u kratkom vremenu povećava broj i veličinu osteoklasta, potiče koštanu razgradnju i koči koštanu izgradnju što rezultira smanjenjem osteoidne površine i vodi do gubitka koštanog tkiva, te doprinosi razvoju osteoporoze i nastanku prijeloma (Hough i sur. 1988; Binkley i sur. 2000; Johansson i sur. 2002; Michaelsson i sur. 2003; Rohde i sur. 2003).

Istraživanje provedeno na štakorima koji su u vremenskom razdoblju od 1 - 3 tjedna, intragastrično dobivali visoke doze 13-cis retinoične kiseline (13cRA), pokazala su kod tih životinja promjene karakteristične za osteoporozu. Dobivene su smanjene vrijednosti BMD u vratu bedrene kosti, smanjena količina Ca i P u kostima i sadržaju koštanog pepela, te promjene fizikalnih karakteristika kosti (Fahmy 2009).

Smatra se kako 13cRA uzrokuje OS i stvaranje ROS-a koji potiskuju osteoblastičnu aktivnost a povećavaju aktivnost osteoklasta; visoki oksidacijski stres smanjuje prirodne protuoksidativne mehanizme i vodi opsežnom gubitku koštane mase. 3cRA i OS smanjuju razinu estrogena, što dovodi do pojave upalnih citokina koji potiču osteoklastičnu aktivnost, a osteoblaste uvode u apopotozu. 13cRA smanjuje aktivnost vitamin D receptora što smanjuje apsorpciju kalcija u crijevima, djeluje na izlučivanje kalcija bubrezima i na lučenje paratireoidnog hormona (Xu i sur. 2005; Sohair i sur. 2009).

U zadnjem desetljeću RMO u štakora primjenjuje se u procjeni djelovanja različitih tvari na koštani metabolizam, što je jako potisnulo korištenje kompliciranijeg ovarieektomijskog modela osteoporoze u štakora, kao do tada najčešće korištenog modela osteoporoze u štakora nastalog uslijed manjka estrogena (Sohair i sur. 2009). Sličnost u patofiziološkom odgovoru koštanog sustava u ljudi i štakora u sposobnosti indukcije koštanog gubitka u kratkom vremenskom razdoblju čini RMO idealan predklinički model za proučavanje protuoksidativnih, protuupalnih, fitoestrogenskih i regenerativnih značajki flavonoida na koštane stanice, čiji se učinak može pratiti preko biljega OS, biokemijskih biljega koštanog preokreta, BMD, protuupalnih citokina, histopatoloških oštećenja kosti.

2.6. TESTOVI GENOTOKSIČNOSTI

2.6.1. Komet test

Komet test ili mikrogel elektroforeza vrlo je djelotvorna tehnika za procjenu oštećenja i popravaka molekule DNA na razini pojedinačnih stanica (Collins 1994). Prvu mikrogel elektroforezu izveli su Östling i Johanson 1984. godine. Metoda je dobila takav naziv, jer oštećene flourescirajuće stanice imaju oblik kometa. Polomljeni krajevi negativno nabijene molekule DNA, kao slobodni putuju kroz električno polje prema anodi. Tako razvučeni u električnom polju ulomci DNA oblikuju „glavu“ i „rep“ komete (Singh 1998). Ovom metodom

može se odrediti osjetljivost pojedinih stanica na djelovanje određenog spoja, pri čemu se može otkriti veliki broj različitih oštećenja genoma poput lomova DNA (Kopjar i sur. 2002). Da bismo utvrdili da li je neka tvara genotoksična potrebno je izložiti staničnu DNA djelovanju genotoksina, zatim ustanoviti da li postoji oštećenje DNA i kolika je razina tog oštećenja. Ukoliko je oštećenje molekule DNA malo, ona se više isteže nego putuje. Porastom broja oštećenja, dijelovi DNA molekule slobodno putuju i tvore rep komete sve do krajnjeg slučaja stanične apoptoze u kojoj su glava i rep komete jasno razdvojeni.

To je jedna od rijeđih metoda koja omogućava analizu pojedinačnih interfaznih stanica na vrlo malom uzorku sa rezultatima dostupnim unutar nekoliko sati nakon izlaganja toksinu. Može se primjeniti na različitim stanicama i tkivima ljudskog, životinjskog ili biljnog podrijetla kao i na staničnim kulturama (Tice i sur. 2000). Prednosti ove tehnike su osjetljivost, jednostavnost primjene, niski troškovi, brzina izvođenja i mala količina uzorka potrebnog za analizu (Cotelle i sur. 1999).

Danas se najviše koriste dvije izvedbe komet testa. Jednu su predložili Olive i sur. (Olive i sur. 1990), a drugu Singh i sur. (Singh i sur. 1998). Prva izvedba testa je u neutralnim uvjetima i omogućuje specifično otkrivanje dovlačenih lomova u molekuli DNA, dok drugi način izvedbe je komet test u alkalnim uvjetima (pH 13), a omogućuje specifično otkrivanje jednolančanih lomova i smatra se optimalnom metodom za otkrivanje učinaka različitih genotoksičnih tvari (Green i sur. 1996).

Komet test se izvodi na sljedeći način. Pojedinačne stanice najprije se uklapaju u "agarozni sendvic" gel na brušenim predmetnim stakalcima. Citoplazma se lizira pod neutralnim ili alkalnim uvjetima, a stanične jezgre izlože se djelovanju električnog polja. Za liziranje stanica primjenjuje se otopina s visokom koncentracijom etilen-diamin-tetraoctene kiseline (EDTA) i detergenata. EDTA pospješuje destabiliziranje membrana tvoreći kelate s ionima metala vezanim uz membranske strukture stanice. Detergenti pak djeluju na molekule lipida iz stanične membrane, izazivajući razaranje membranskih struktura stanice i oslobađanje ukupne DNA. Potom se DNA denaturira u lužnatom ili neutralnom puferu, ovisno o tome koju vrstu oštećenja namjeravamo pratiti (Tice i sur. 2000). Pod neutralnim uvjetima u repu kometa prevladavaju dvolančani lomovi u DNA, dok pod lužnatim uvjetima (pH > 13) prevladavaju jednolančani lomovi i mjesta osjetljiva na lužine (Singh i sur. 1988). Pufer za denaturaciju, osim što denaturira DNA, pospješuje uklanjanje soli oslobođenih razaranjem staničnih struktura, koje bi mogle neutralizirati negativne naboje fosfatnih skupina DNA i ometati kretanje DNA u gelu za vrijeme elektroforeze (Fairbairn i sur. 1995). Tijekom elektroforeze pod utjecajem električnog

polja, ulomci DNA izlaze iz jezgre i kroz pore agaroznog gela putuju prema anodi. Glavnina DNA zbog velike molekularne mase ne može putovati kroz pore gela prema anodi, pa tako putuju samo ulomci DNA nastali jednolančanim ili dvolančanim lomovima. Zbog razlike u brzini kretanja (kraći ulomci imaju bolju pokretljivost kroz gel), ulomci se razdvajaju prema veličini (Plappert 1995). Ovisno o razini oštećenja DNA, nakon elektroforeze i bojanja s fluorescencijskom bojom (etidij-bromid, DAPI, propidij-jodid, akridin oranž, Hoechst 33342) u gelu se mogu uočiti kometi različite veličine (Tice i sur. 2000). Oštećenje DNA procjenjuje se na osnovi udjela DNA u "repu" kometa udjela DNA u "glavi" kometa. Za mjerenje kometa i procjenu oštećenja danas postoje sustavi za analizu slike, u kojima je epifluorescencijski mikroskop povezan s računalom, a pomoću posebnih računalnih programa za svaki pojedinačni komet istovremeno se mjeri više parametara (Garaj-Vrhovac 1998). Dužina repa je parametar koji se izražava u mikrometrima, mjeri od sredine jezgre i predstavlja udaljenost na koju su tijekom elektroforeze otputovali ulomci DNA. Postotak DNA je parametar koji se mjeri pomoću računala, a zatim se programom na osnovi podataka o dužini repa kometa i postotka DNA u repu izračunava repni moment kao treći parameter koji definira komet i koji se danas smatra najboljim pokazateljem stupnja oštećenja DNA (Hellman i sur. 1995; Singh i sur. 1988).

2.6.2. Mikronukleus test

Mikronukleus test je standardna metoda kojom se određuje broj strukturnih i numeričkih aberacija kromosoma u stanicama, u uvjetima *in vitro* i *in vivo* koje nastaju pod utjecajem različitih genotoksičnih tvari (Fenech i sur. 2003; Baatout i sur. 2004). Postojanje aberacija u prethodnoj staničnoj diobi prikazuje se prisutnošću kromatinskih struktura koje nalikuju jezgri, a koje nazivamo mikronukleusi. Mikronukleusi su smješteni unutar interfazne citoplazme i nastaju uslijed lomova kromosoma i kondenzacije acentričnih kromosomskih ulomaka ili kromosoma zaostalih u anafazi (Channarayappa i sur. 1992; Fenech i sur. 1993; Bombail i sur. 2001; Grisolia i sur. 2001; Fenech i sur. 2003). Nastanak mikronukleusa mogu potaknuti genotoksične tvari u stanicama izloženog organizma Aneugenim ili indirektnim učinkom i Klastogenim odnosno direktnim ucinkom.

Aneugeni učinak – nakon što stanica ude u diobu zbog oštećenja i nefunkcionalnosti mikrotubula diobenog vretena, onemogućeno je putovanje jednog ili više kromosoma na pol stanice. Nakon citokineze zaostali kromosomi u citoplazmi stanice kćeri tvore mikronukleuse.

Klastogeni učinak – mikronukleus nastaje od acentričnih ulomaka kromosoma (ulomci kromatida i kromosoma) nastalih uslijed loma kromosoma.

Mikronukleusi mogu nastati i spontano što dolazi uslijed mutacije kinetohornih proteina, centromera i diobenog vretena koje mogu izazvati nejednaku raspodjelu kromosoma ili gubitak čitavih kromosoma tijekom anafaze, zatim uslijed djelovanja endogenih čimbenika koji dovode do stvaranja kromosomskih lomova i acentričnih ulomaka (Natarajan 2002). Na općenitu genetičku nestabilnost može ukazivati povećani broj mikronukleusa. Stanice s nestabilnim kariotipom imaju sklonost uklanjanja kromosoma, što se barem djelomično zbiva putem stvaranja mikronukleusa. Dokazano je da oko 50% spontano nastalih mikronukleusa sadrži čitave kromosome, a ostali nastaju od acentričnih ulomaka. Mikronukleusi koji sadrže čitave kromosome češće se nalaze u starijih nego u mladih ispitanika (Norppa 1993; Fenech i sur. 2003). Ova metoda ima nedostatak u tome što se ne mogu razlikovati mikronukleusi koji potječu od acentričnih ulomaka od mikronukleusa koji potječu od čitavih kromosoma, te se radi toga kombinira sa raznim citološkim tehnikama, primjerice fluorescencijske *in situ* hibridizacije sa sondama koje specifično otkrivaju centromerna ili telomerna područja kromosoma (Miller i sur. 1998). Specifično obilježavanje dijelova kromosoma omogućava određivanje podrijetla mikronukleusa, što je korisno u *in vitro* i *in vivo* istraživanjima klastogenih ili aneugenih mehanizama djelovanja različitih kemijskih ili fizikalnih čimbenika (Jagetia i sur. 2002).

U *in vivo* istraživanjima mikronukleus test se provodi na stanicama koštane moždine i na nezrelim eritrocitima periferne krvi (polikromatski i normokromatski eritrociti) laboratorijskih životinja (glodavci) (Jagetia i sur. 2002; Baatour i sur. 2004). U toku hematopoeze matične stanice iznimno su osjetljive na genotoksične tvari koje mogu uzrokovati oštećenja kromosoma i nastanak mikronukleusa, a nastali mikronukleusi se tijekom diobe stanica ne ugrađuju u jezgre stanica kćeri već ostaju u citoplazmi i mogu se utvrditi primjenom različitih boja koje specifično vežu na DNA. Broj mikronukleusa može se utvrditi mikroskopskom analizom ili pomoću protočnog citometra. U novije vrijeme za utvrđivanje broja mikronukleusa primjenjuje se računalni sustav za analizu slike (Hayashi i sur. 1990; Surralles i sur. 1998; Asano i sur. 1998).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na štakorima starosti oko 20 tjedana, ženkama iz originalnog legla Spraque Dawley, Hsd, Harlan Laboratories, mase 150 - 200 g uzgoja Jedinice za životinje, Medicinskog fakulteta Osijek. Životinje su transportirane specijalnim vozilom do Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu gdje su smještene u kaveze_dimenzija 20 x 32 x 20 cm; najviše do šest životinja po kavezu, pod standardnim uvjetima (24 °C, ciklus 12 sati svjetla i 12 sati mraka). Sve životinje imale su slobodan pristup vodi i hrani. Hranjene su standardnom hranom za laboratorijske životinje (4RF 21 Mucedola S.R.L., Italija) koja sadrži po kilogramu: 0,916% kalcija, 0,76% fosfora i 1,26 kIU vitamina D3. Istraživanje je provedeno u skladu sa etičkim principima, koji su važeći u Republici Hrvatskoj (Pravilnik o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa, Narodne Novine br. 19/1999; Zakon o zaštiti životinja, Narodne novine br. 135/06) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS Publ. (NIH) # 86–23 1985). Za istraživanje je dobivena suglasnost Etičkog povjerenstva Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.2. Pripravci korišteni u pokusu

1. **Krizin** (5,7-dihyrdoxyflavon, Aldrich Ch. Co. Inc. Milwaukee WI, USA), otopljen u vodi i etanolu (0,5% v/v) primjenjen u dozi od 100 mg kg^{-1}

2. **Proantocijanidin** (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) otopljen u vodi i etanolu (0,5% v/v) primjenjen u dozi od 100 mg kg^{-1}

3. **Naringenin** (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany), otopljen u vodi i etanolu (0,5% v/v) primjenjen u dozi od 100 mg kg^{-1}

4. **Ikarin** otopljen u vodi i etanolu (0,5% v/v) primjenjen u dozi 100 mg kg^{-1}

5. **Quercetin** otopljen u vodi i etanolu (0,5% v/v) primjenjen u dozi 100 mg kg^{-1}

6. **Alendronat** (Alendor®70, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska) otopljen u vodi, primjenjen u dozi od 2 i 40 mg kg^{-1}

7. **Isotretinoin** (Accutane®, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) otopljen u ulju, primjenjen u dozi od 80 mg kg^{-1}

8. **Uljni nosač** (Jestivo rafinirano suncokretovo ulje, Zvijezda d.d., Zagreb, Hrvatska)

9.**Fiziološka otopina** (F.O.) (Natrii chloridi infundibile, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

3.2. METODE

3.2.1. Protokol pokusa

Pokus je proveden na štakorima soja Spraque Dawley. Osteoporoza na štakorskom modelu izazvana je primjenom 13cRA – isotretinoina u dozi 80 mg kg^{-1}. Prije početka pokusa, sve životinje su bile podijeljene u 9 skupina (n = 6 životinja). Prije početka i tijekom izvođenja pokusa životinje su pojedinačno označene (vodootpornim markerom na repovima), mjerena im je tjelesna težina na temelju koje je određivana količina pojedinačnih pripravka davanih tijekom pokusa.

Prvih 14 dana pokusa u kontinuitetu, svaki dan jednokratno osam skupina životinja (2-9) intragastričnim putem dobivala je retinoičnu kiselinu u dozi 80 mg kg^{-1} radi izazivanja osteoporoze. Jedna skupina (1) kao zdrava kontrolna skupina dobivala je samo uljni nosač bez 13cRA. Tijekom davanja preparata, životinje su bile u kratkotrajnoj eterskoj narkozi.

1. **Skupina** – **zdrava kontrola** (primjena uljnog nosača u 2 mL *ig* tijekom 14 dana, n = 6);

2-9. Skupine – **retinoični model osteoporoze (RMO**) (primjena 13cRA 80 mg kg^{-1} u 2 mL *ig* tijekom 14 dana, n = 6)

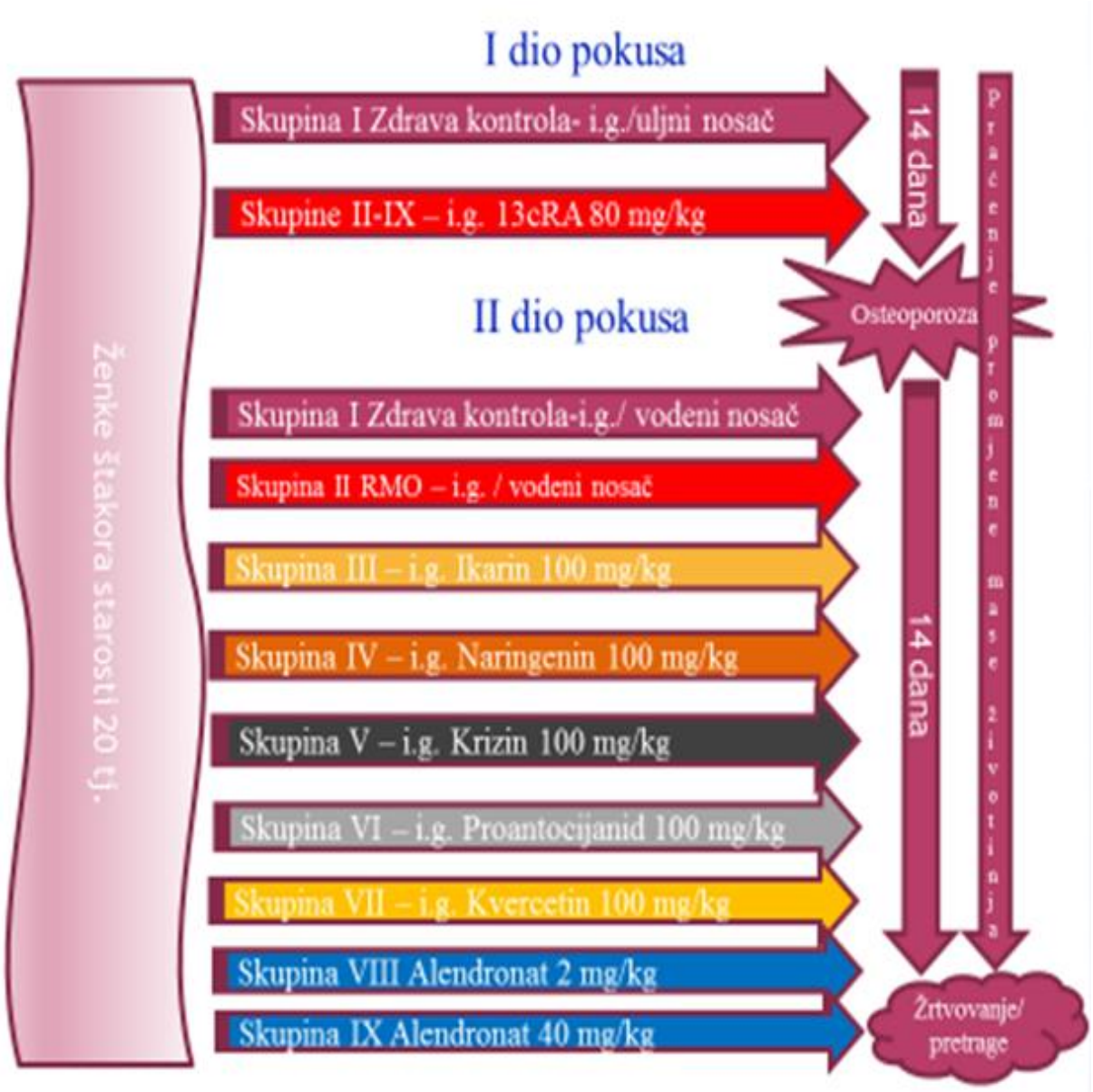
Drugih 14 dana, zdrava kontrolna skupina (skupina 1) i RMO skupina kao pozitivna kontrola za osteoporotski model (skupina 2) intragastričnom primjenom (*ig*) dobivale su samo vodeni nosač. Ostalih pet skupina dobivale su *ig* jedan od flavonoida (krizin, proantocijanidin, naringenin, ikarin, kvercetin) u dozi od 100 mg kg^{-1} (skupine 3 - 7), a skupine 8 i 9 dobivale su

bisfosfonat alendronat u dozi od 2 mg kg^{-1} (skupina 8) i 40 mg kg^{-1} (skupina 9). Životinje su žrtvovane 24 h nakon primjene zadnje doze istraživanih pripravaka, nakon čega su odmah prikupljeni uzorci krvi (serum) i organa od ciljnog interesa. Tijekom postupka žrtvovanja sve životinje bile su adekvatno anestezirane i analgezirane intraperitonealnom primjenom kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar Ketamin) i Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp.,Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar Ksilazin) u dozi od 25 mg kg^{-1}.

Skupne i način obrade životinja nakon prouzrokovanja osteoporoze su navedene kako slijedi (Slika 22):

1. Skupina – **zdrava kontrola** (primjena vodenog nosača u 2 mL *ig* tijekom 14 dana, n = 6);
2. Skupina – **RMO,** pozitivna kontrola za osteoporotski model (primjena vodenog nosača u 2 mL *ig* tijekom 14 dana, n = 6);
3. Skupina – primjena **ikarina** 100 mg kg^{-1} + vodeni nosača u 2 mL *ig* tijekom 14 dana, n = 6);
4. Skupina – primjena **naringenina** 100 mg kg^{-1} + vodeni nosač u 2 mL *ig* tijekom 14 dana, n = 6);
5. Skupina – primjena **krizina** 100 mg kg^{-1} + vodeni nosač u 2 mL tijekom 14 dana, n = 6);
6. Skupina – primjena **proantocijanidina** 100 mg kg^{-1} + vodeni nosač u 2 mL *ig* tijekom 14 dana, n = 6);
7. Skupina – primjena **kvercetina** 100 mg kg^{-1} + vodeni nosač u 2 mL *ig* tijekom 14 dana, n = 6);
8. Skupina – primjena **alendronata** 40 mg kg^{-1} + vodeni nosač u 2 mL *ig* tijekom 14 dana, n = 6);
9. Skupina – primjena **alendronata** 2 mg kg^{-1} + vodeni nosač u 2 mL *ig* tijekom 14 dana, n = 6);

Prije žrtvovanja svim životinjama određena je tjelesna težina. Nakon žrtvovanja prikupljeni su i obrađeni uzorci krvi iz kojih su određivani hematološki i biokemijski parametari, razine serumskog kalcija i fosfora, biljezi koštanog preokreta (biljeg koštane izgradnje-osteokalcin i biljeg koštane razgradnje-Beta CrossLaps) upalni i protuupalni citokini i genotoksični učinci. Prikupljeni su i razvrstani uzorci tkiva jetre i bubrega za određivanje biljega oksidativnog stresa (lipidne peroksidacije, glutationa, SOD, katalaza), te maternice za utvrđivanje fitoestrogenskog učinka na težinu tog organa. Naposljetku su svakoj životinji odstranjenje obje natkoljenične kosti koje su korištene za mjerenje BMD i to denzitometrijskom metodom dvoenergetske rendgenske apsorpciometrije-DXA, te histopatološke analize kosti.



Slika 22. Prikaz pokusa

3.2.2. Praćenje promjene mase životinja

Vaganjem životinja tijekom pokusa, te praćenjem promjena mase životinja procijenjena je toksičnost istraživanih pripravaka (retinoične kiseline, alendronata, krizina, proantocijanidina, naringenina, ikarina i kvercetina) na razini cjelokupnog organizma. Životinje su vagane na digitalnoj vagi (Kern KB 2000-2N P.b.- 0,01 g : 2000 g): a) početkom pokusa; b) nakon primjene retinoične kiseline i izazivanja osteoporoze; c) na kraju pokusa nakon liječenja osteoporoze, obrade životinja flavonoidima odnosno alendronatatom kao pozitivnom kontrolom. Praćen je gubitak ili prirast mase životinja. Gubitak na težini je pokazatelj toksičnosti i za svaku individualnu životinju je preračunat upotrebom formule: % gubljenja težine = [(težina 1. dana – minimalna težina tijekom istraživanja) / težina 1. dana] x 100

3.2.3. Mjerenje mineralne gustoće kosti (BMD; engl. *Bone Mineral Density*)

Nakon žrtvovanja, svakoj životinji odstranjene su bedrene kosti sa kojih su nadalje odstranjena meka tkiva. Desne bedrene kosti spremljene su u epruvete s 10% puferiranim formalinom do određivanja mineralne gustoće kostiju (BMD). Mjerenja su izvršena u Laboratoriju za mineralizirana tkiva, Centra za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prema uputama proizvođača i od strane istog tehničara. Mjerenjima su podvrgnute proksimalne i distalne trećine svake pojedine desne natkoljenične kosti, a mjerenja su izvršena denzitometrijskom metodom dvoenergetske rendgenske apsorpciometrije-DXA, na aparatu Hologic QDR 4000 DXA sa odgovarajućim softverom za male životinje 1.0. visoke razlučivosti. Dobivene su vrijednosti koštanog područja (area-cm^2) i koštanog mineralnog sadržaja (BMC-gr), a podaci za mineralnu gustoću kostiju (BMD) izračunati su iz odnosa navedenih parametara (gr/cm^2) .

3.2.4. Fizikalna mjerenja kosti

Odmah nakon vađenja bedrenih kostiju i odstranjenja mekih tkiva određivane su težine obje bedrene kosti na digitalnoj vagi (Electronic balance ABS 220-4, Kern&Sohn, Germany). Težine obje bedrene kosti iskazane su u miligramima (mg) i kao indeks koštane mase (g/100 g tjelesne težine). Korištenjem kalipera određene su dužine obje bedrene kosti (veliki trohanter-kondil) koje su iskazane u centimetrima. Također su izmjerene anterioposteriorne (AP) i

mediolateralne (ML) dužine proksimalnog, srednjeg i distalnog segmenta svake pojedine kosti, koje su također iskazane u centimetrima (cm).

3.2.5. Histološka analiza bedrene kosti

Nakon žrtvovanja životinja, odstranjene i očišćene lijeve bedrene kosti spremljene su u epruvete s 10% puferiranim formalinom do samog postupka histološke analize. Kod postupka analize uzorci kosti su temeljito isprani u vodovodnoj vodi tijekom 30 minuta, a zatim su stavljeni u otopinu za dekalcifikaciju RDO (Apex Engineering Products; Plainfield, IL) tijekom 24 sata. Nakon dekalcifikacije, svaka pojedina kost je izrezana u sredini osovine njene dijafize te temeljito isprana tekućom vodom, dehidrirana u rastućim koncentracijama etanola (70%, 80%, 96%, 100%), a nakon obrade kloroformom uklopljena u paraplast. Uklopljene dijafize bedrene kosti su dalje rezane pomoću mikrotoma na rezove debljine 6-7 µm te obojane s hematoksilinom i eozinom (HE) upotrebom standardnog protokola. Obojeni dijelovi preparata uzeti iz usporedivih područja su analizirani pod svjetlosnim mikroskopom (Nikon Eclipse E600) pri povećanju od 40, 100 i 200x, a fotomikrografije su snimljene uporabom digitalne kamere (Nikon DMX1200) i obrađene računalnim programom za morfometrijsku analizu slika (Lucia G 4.80 (Laboratory Imaging Ltd., Prague, Czechoslovakia).

3.2.6. Biokemijski biljezi koštanog preokreta

Nakon žrtvovanja životinja iz prikupljenih uzoraka krvi pokusnih skupina i kontrole izdvojen je serum koji je upotrebljen za određivanje biljega koštanog preokreta; biljeg koštane izgradnje- osteokalcin (N-MID Osteocalcin, Cobas-Roche, Switzerland) i biljeg koštane razgradnje C-terminalni fragment tipa I kolagena (CTX) ili Beta CrossLaps (β-CTx, Cobas- Roche, Switzerland). Analize su izvršene na Zavodu za kemiju i biokemiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na analizatoru Elecsys 2010 (Hitachi High-Tehnologies Corporation, Tokyo, Japan), koristeći elektrokemiluminiscentnu (ECLIA) metodu.

3.2.7. Hematološki i biokemijski parametri

Uzorci krvi za analizu hematoloških i biokemijskih parametara uzeti su iz aksilarnog spleta krvnih žila pokusnih životinja. Uzorci za određivanje hematoloških parametara su stavljeni u

heparinizirane staklene vacuutainere s dodatkom EDTA (Becton Dickinson, Plymouth, UK) i pohranjeni na temeperaturi od 4 ^{o}C kroz 2 sata do određivanja hematoloških parametara.

Uzorci za dobivanje seruma stavljeni su u epruvete bez antikoagulansa, te nakon koagulacije krvi su centrifugirani na 3500 rpm kroz 10 minuta. Nakon cenrifugiranja, serum je sakupljen u 1,5 mL polipropilenske tubice (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) te je pohranjen na -20 ^{o}C do određivanja biokemijskih parametara.

Od hematoloških parametara određivan je broj etrirocita (Erc), koncentracija hemoglobina (Hb), hematokrit (Hct), broj leukocita (Lkc) ,broj trombocita (Trc) i morfološko diferenciranje krvnog razmaza, a od biokemijskih parametara određivana je koncentracija ukupnog kalcija, fosfora, ukupnih proteina, glukoze, ureje, kreatinina, ukupnog bilirubina, C-reaktivnog proteina (CRP), 25-OH Vitamina D, te aktivnosti enzima alkalne fosfataze (ALP), aspartat-aminotransferaze (AST), alanin-aminotransferaze (ALT), laktat-dehidrogenaze (LD), gama-glutamiltransferaze (GGT) i amilaze (AMS). Hematološki i biokemijski parametri određivani su preporučenim analitičkim metodama, u Medicinsko biokemijskom laboratoriju OB Zabok. Hematološki parametri određeni su na elektronskom brojaču ABBOTT CELL DYN 3700, a morfološko diferenciranje krvnog razmaza svjetlosnom mikroskopijom. Biokemijski parametri određeni su fotometrijskim metodama, 25-OH Vitamin D analiza na imunokemijskom analizatoru Cobas e, Roche, a CRP imunonefelometrijskom metodom na biokemijskom analizatoru Beckman Coulter AU 680.

3.2.8. Određivanje upalnih citokina

Nakon uzimanja krvnih uzoraka u heparinizirane vacuutainere, izdvojeni serum pokusnih životinja korišten je za analize upalnih citokina priređenim prema naputku proizvođača Multi-Analyte ELISArray for Rat, Kit: MER-004A tvrtke Quiagen koji analizira paletu od 12 proupalnih citokina. Citokini i kemokini zastupljeni u ovom testu su slijedeći: IL1A, IL1B, IL2, IL4, IL6, IL10, IL12, IL17A, IFNγ, TNFα, G-CSF i GM-CSF. Analiza je izvršena klasičnom sandwich ELISA imunokemijskom metodom uporabom standarda i protutijela kita uz pomoć mikrotitarskog čitača Labsystems iEMS Reader MF na 450 i 570 nm na Zavodu za animalnu fiziologiju.

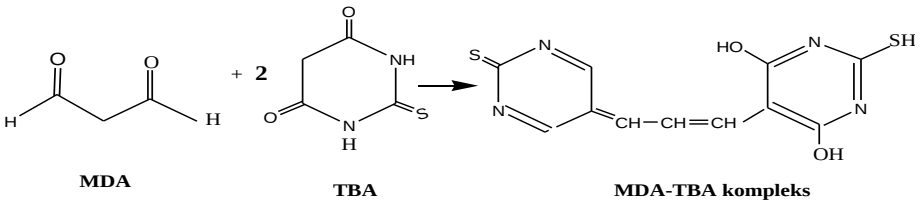
3.2.9. Enzimi oksidativnog stresa

Razina oksidativnog stresa mjerena je u uzorcima tkiva jetre, bubrega, slezene i jajnika.

Određivana je razina lipidne peroksidacije, koncentracija ukupnog glutationa (GSH), razina enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i enzimske aktivnosti katalaze. Sve analize učinjene su na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.

Razina lipidne peroksidacije

Razina lipidne peroksidacije određena je reakcijom između malonaldehida (MDA) i tiobarbiturne kiseline (TBA) modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur. (2007). Metoda se temelji na mjerenju **koncentracija malonildialdehida (MDA),** produkta lipidne peroksidacije kroz reakciju MDA s tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Reakcija se odvija u kiselim uvjetima i na visokoj temperaturi pri čemu nastaje crveni fluorescentni kromogen koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski pri valnoj duljini 532 nm (Slika 23).



Slika 23. Mehanizam reakcije MDA/TBA

(Preuzeto sa stranice: htpp//www.supa.pharmacy.bg.ac.rs/assets/9203)

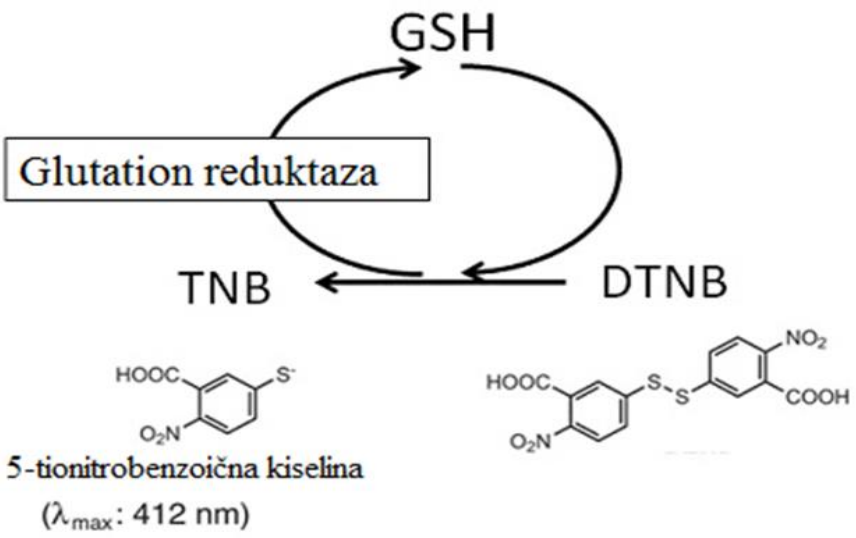
Metoda je izvedena tako da je u homogenat tkiva od 100 µL dodano 1,6 mL otopine A (Tablica 12). Dobivena otopina stavljena je u vodenu kupelj na 95 °C. Nakon 60 minuta otopina je izvađena iz kupelji i naglo ohlađena na ledu prilikom čega je nastao nadtalog koji je odvojen i kojem je zatim mjerena apsorbancija pri 532 nm na Spektrofotometru Libra S22 (Biochrom). Ukupna koncentracija izračunata je prema sljedećoj formuli: $c = (A_{uzorka} \times V_{reakcijske\ smjese})/(\varepsilon \times V_{uzorka} \times c_{proteina\ uzorka})$, te je izražena kao nmol MDA po mg proteina.

Tablica 12. Priprema otopina za određivanje koncentracije MDA

Otopina A	100 µL 8,1% SDS + 750 µL 20% octene kiseline (pH = 3,5) + 750 µL 0,81% TBA
8,1% SDS	0,81 g SDS-a u 10 mL dH_2O
20% octena kiselina	20 mL 99,5% octene kiseline i 2,31 mL HCl, nadopuni se do 50 mL dH_2O i podesi pH=3,5 te nadopuni dH_2O do 100 mL
0,8% TBA	0,8 g TBA u 40 mL dH_2O uz lagano zagrijavanje. Nakon što se otopi dodaje se 500 µL 5M NaOH te se nadopuni s dH_2O do 100 mL.

Koncentracija ukupnog glutationa

Koncentracija ukupnog glutationa u organima štakora određena je prema metodi koja se temelji na reakciji tiolnog reagensa 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) s GSH pri čemu se stvara kromofor 5-tionitrobenzoična kiselina (TNB) koji se fotometrijski očitatava na 412 nm (Metoda po Tietzu, 1969). U reakciji nastaje i GS-TNB koji se reducira pomoću GSH reduktaze i NADPH pri čemu se otpušta druga molekula TNB i reciklira GSH. Ukupna koncentraciji reduciranog i oksidiranog GSH u uzorku, proporcionalna je reciklirajućoj reakciji i brzini nastanka TNB-a (Slika 24).



Slika 24. Mehanizam određivanja ukupnog glutationa (preuzeto i prilagođeno sa stranice:

https://www.google.hr/search?q=gsh+tnb&rlz=1C2CHWA_hrHR563HR583&biw=1335&bih=600&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjUrrr_uPXNAhUDOBQKHTNnBUgQ_AUIBigB&dpr=0.9#imgrc=R6mLfmnyqIcMoM%3A).

Metoda je izvedena uz pomoć mikrotitarske pločice u čiju je jednu jažicu dodano 20 µL uzorka razrijeđenog 40 puta, 40 µL 0,035 M HCl i 40 µL 10 mM DTNB, te je mjerena apsorbancija na valnoj duljini od 415 nm na mikrotitarskom čitaču: Microplate reader Model 550 (Bio-Rad); iEMS reader MF (Labsystems). Zatim je dodano 100 µL otopine GR i NADPH te je mjerena apsorbancija tijekom 5 min. Kao standard korištena je koncentracija reduciranog GSH (0-100 µM). Izvedeni su pravci za sve standarde kao promjena apsorbancije u vremenu. Očitani su nagibi pravaca, nacrtan je pravac kao ovisnost nagiba pravca o koncentraciji GSH. Konačno, taj dobiveni pravac korišten je za dobivanje koncentracije ukupnog GSH u uzorku prema sljedećoj formuli: c = ((nagib pravca uzorka – nagib pravca slijepe probe)/nagib pravca standarda) x razrijeđenje. Koncentracija ukupnog GSH prikazna je kao µM GSH po mL proteina. Otopine korištene u ovoj metodi i njihova priprema navedeni su u Tablici 13.

Tablica 13. Priprema otopine za određivanje koncentracije GSH

0,5 M pufer PBS	**17 mL 1 M $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$** i (3 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ i dH_2O do 17 mL) **183 mL 1 M $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$** (65,5 g $Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$ i dH_2O do 183 mL)
0,5 M EDTA	37,2g EDTA u 200 mL dH2O
0,5M pufer PBS s 0,5 M EDTA	200 mL 0,5M PBS + 200 mL 0,5M EDTA
0,035 M HCl	7 mL 0,1 HCl u dH_2O do 200 mL
10 mM DTNB	20 mg DTNB i 0,5M pufer PBS s 0,5 M EDTA do 5 mL
0,8 mM NADPH	6,67 mg NADPH i 0,5M pufer PBS s 0,5 M EDTA do 10 mL
Mješavina GR	20 µL GR (50 U/mL) u 9980 µL 0,8 mM NADPH

Razina enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

SOD aktivnost određena je prema metodi inhibicije redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza (XOD) (metoda po Flohéu i Öttingu, 1971). Metoda je izvedena tako da su najprije pripremljenije dvije slijepe probe. Prva se sastojala od otopine A (Tablica 14), kojoj je apsorbancija mjerena u spektrofotometru UV-160 (Shimadzu) na 550 nm tijekom 3 min. Druga slijepa proba služila je za namještanje aktivnosti ksantin oksidaze (XOD), čija je ciljna aktivnost morala iznositi oko 0,025 U/min. U kivetu je redom dodano 25 µL dH_2O, 1,45 mL otopine A (Tablica 14). Zatim je u istu kivetu dodan enzim XOD u početnom volumenu od 15 µL, sadržaj je izmiješan te mu je odmah mjerena apsorbancija na Spektrofotometru UV-160 (Shimadzu), tijekom 3 min na 550 nm. Postupak je ponavljan, uz izmjene volumena dodavanog enzima dok nije dobivena ciljana enzimska aktivnost pri kojoj je volumen XOD iznosio 25 – 30 µL. Dalje je slijedila analiza uzoraka, tako što je u svaku reakcijsku smjesu umjesto dH_2O dodavano 25 µL uzorka te odgovarajući volumen ksantin oksidaze, nakon čega je odmah mjerena apsorbancija u spektrofotometru.

Enzimska aktivnost mjerena je kao postotak inhibicije aktivnosti XOD te je i izražena kao % inhibicije, prema formuli % inhibicije = 100 – (ΔA_{uzorka} / $\Delta A_{slijepa\ proba}$) x 100. Nadalje je aktivnost SOD izražena kao U/mg proteina dobivena prema formuli: aktivnost SOD = 10 ^ ((%inhibicije + 12,757) /30,932).

Tablica 14. Priprema otopina za određivanje aktivnosti SOD

50 mM PBS	Pomiješati 17 mL (1,56 g $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ u 50 mL dH_2O) i 183 mL (5,678 g Na_2HPO_4 u 200 mL dH_2O), namjestiti pH=7,8 te nadopuniti do 800 mL
50 mM PBS s 0,1 mM EDTA	3,72 mg EDTA u 100 mL 50 mM PBS
Reakcijska otopina A	190 mL 0,05 mM citokroma C (29 mg citokroma C u 50 mM PBS s 0,1 mM EDTA do 190 mL) i 19 mL 1 mM ksantina (3 mg ksantina u 19,74 mL 1 mM NaOH, teško se otapa, lagano zagrijavati)
Reakcijska otopina B XOD (aktivnost 0,8 U/mL)	40 µL ksantin oksidaze i 960 µL dH_2O

Razina enzimske aktivnosti katalaze (CAT)

CAT aktivnost određena je spektrofotometrijskom metodom mjerenjem količine potrošenog H_2O_2 (metoda po Aebiju 1984). Aktivnost katalaze izražena je preko ekstinkcijskog koeficijenta H_2O_2 (e= 39,4 mM–1 cm–1) kao U/mg proteina što odgovara µmol razgrađenog H_2O_2 po minuti po miligramu proteina.

Metoda je izvedena tako da je u kivetu ukupnog volumena 1 ml dodano 980 µL10 mM H_2O_2, a ostatak do ukupnog volumena od 1 mL bio je uzorak odgovarajućeg razrijeđenja. Spektofotometrijski pri 240 nm je mjereno smanjenje količine H_2O_2 tijekom jedne minute. Korištena je formula c = (A_{uzorka} / (εH_2O_2 x l)) x razrijeđenje, gdje je l jednak putu koji zraka svijetla prođe kroz kivetu i iznosi 1 cm.

3.2.10. Vaganje maternica

Nakon žrtvovanja svakoj životinji odstranjena je maternica. Maternice su pojedinačno vagane na digitalnoj vagi (Electronic balance ABS 220-4, Kern&Sohn, Germany) koja važe točnošću ± 0,1 mg, a rezultati su korišteni za utvrđivanje fitoestrogenskog učinka na težinu tog organa.

3.2.11. Procjena stupnja oštećenja DNA - testovi genotoksičnosti

Za procjenu stupnja oštećenja DNA korišteni su Komet-test i Mikronukleus test. Priprema preparata je izvedena na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, gdje je učinjen Mikronukleus test, a sva ostala mjerenja izvršena su na opremi Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, gdje su i učinjena.

Komet-test

Korištena je standardna metoda komet testa u alkalnim uvjetima na bijelim krvnim stanicama (metoda po Singhu i sur. 1988). U pripremi preparata slijeđen je jasno definirani protokol polimerizacija, liza staničnih struktura, denaturacija, elktroforeza, neutralizacija i bojanje preparata). Na brušeno predmetno stakalce Pasteurovom pipetom nakapana je svježe priređena otopina 1% agaroze normalnoga tališta (NMP) i pokrivena pokrovnicom. Nakon polimerizacije agaroze na sobnoj temperaturi sa stakla je uklonjena pokrovnica i taj sloj gela. Na osušeno staklo pomoću mikropipete nakapano je 300 µL 0,6% NMP agaroze i pokriveno pokrovnicom. Stakalce je držano 10 minuta na ledu. Na stakalca s priređenim slojem NMP agaroze nanošen je slijedeći sloj koji se sastojao od 100 µL 0,5% agaroze niskoga tališta (LMP) pomiješane sa 5 µL uzorka krvi uzete iz aksilarne vene miša. Predmetno stakalce ponovno je pokriveno pokrovnicom. Nakon 10 minuta stajanja na ledu, taj sloj gela prekriven je sa 100 µL 0,5% agarozom niskog tališta (LMP) i preparat je ponovo postavljen na led 10 minuta. Priređenim preparatima nadalje su skinute pokrovnice i uronjeni su u pufer za lizu (NaCl, Na-laurilsarkozinat, Tris-HCl, DMSO, Triton X-100), pH=10 u kojem su stajali jedan sat na 4˚C. Preparati su zatim iz pufera za lizu prebačeni u pufer za denaturaciju (NaOH, Na_2EDTA), pH=13. Denaturacija je provedena na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. Nakon denaturacije, preparati su premješteni u aparat za elektroforezu. Elektroforeza je provedena u istom puferu kao i denaturacija, pri jakosti struje od 300 mA i naponu od 25 V, tijekom 20 minuta. Nakon elektroforeze, preparati su isprani tri puta po 5 minuta u neutralizacijskom Tris-

HCl puferu, pH=7,5. Nakon zadnjeg ispiranja, preparati su bojani sa 100 µL etidij-bromidom (20 µg mL^{-1}) u trajanju od 10 minuta. Obojeni gelovi kratko su isprani u Tris-HCl puferu, pH=7,5 i pokriveni pokrovnicom. Radi stabilizacije boje, preparati su prije početka analize držani u mraku najmanje 15 minuta. Obojani preparati analizirani su pomoću epifluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom od 515 - 560 nm. Obrisi jezgara stanica u gelu po obliku nalikuju na komete. Svakom kometu mjerio se niz parametara: dužina repa, postotak DNA u repu, repni moment kao i ukupna površina kometa. Mjerenja su provedena pomoću programa za analizu slike Comet Assay II, proizvođača Perceptive Instruments Ltd. Na svakom preparatu analizirano je po 100 kometa.

Mikronukleus test

U obojanom sušenom razmazu periferne krvi štakora određen je ukupni broj mikronukleusa na 2000 retikulocita (modificirani protokol iz 2000 prema Krishna i Hayashi) mikroskopskom analizom preparata na fluorescencijskom mikroskopu s ekscitacijskim filterom 502-525 nm.

Metoda je provedena u tamnoj sobi, tako da je na osušeni razmaz periferne krvi štakora dodan akridin oranž, te je predmetno stakalce pokriveno pokrovnicom. Zatim je slijedila analiza stanica na fluorescencijskom mikroskopu. Mikronukleusi promatrani pod mikroskopom fluoresciraju žuto, a citoplazma retikulocita ima crveni sjaj. U svakom pojedinačnom uzorku analizirano je 2000 retikulocita u kojima je utvrđen ukupni broj i raspodjela mikronukleusa (MN).

3.2.12. Statistička analiza

Svi pokusi provedeni su u duplikatu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SV ± SD) i/ili standardna pogreška (SV ± SP). Podaci su analizirani pomoću Kruskal-Wallis ANOVA-a testa. Daljnja analiza razlika između skupina napravljen je višestrukom komparacijom srednjih vrijednosti svih skupina. Statistička analiza je provedena pomoću STATISTICA 12 programa (StatSoft, Tulsa, OK, USA). Statistička točnost određena je sa $P < 0,05$.

4. REZULTATI

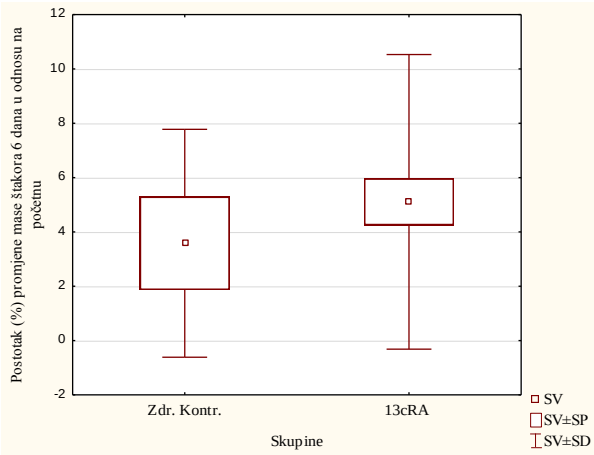
4.1. OSTEOGENI UČINAK BIOAKTIVNIH FLAVONOIDA

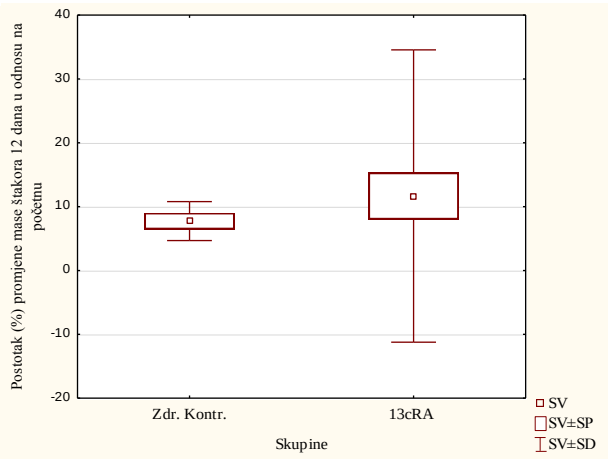
Homeostaza kosti se održava kroz ravnotežu između tvorbe osteoblasta kosti i osteoklastične resorpcije kosti. Starenje i oksdacijski stres uzrokuje gubitak koštane mase zbog smanjenog formiranja osteoblasta kostiju i povećana osteoklastičke resorpciju kosti. Farmakološki i nutritivni čimbenici mogu igrati ulogu u prevenciji i liječenju gubitka kosti povezane sa starenjem, oksidacijskim stresom i nedostatkom estrogena. Flavonoidi su bioaktivni spojevi koji stimuliraju mineralizaciju kosti. Temeljem navedenog istražili smo stimulirajuće djelovanje flavonoida (ikarina, naringenina, krizina, kvercetina i proantocijanidina) na mineralizaciju kostiju kroz povećanje koštane mase, mineralne gustoće kostiju, stimulaciju osteoblastogeneze i potiskivanje osteoklastogeneze praćenjem biljega koštanog preokreta (predgradnje i razgradnje koštane mase), razine vitamina D ključnog za apsorpciju kalcija u crijevima, razine kalcija i fosfora u serumu, fizikalnih mjera kostiju i indeksa tjelesne težine femura.

4.1.1. Promjena tjelesne težine (TT) životinja tijekom pokusa

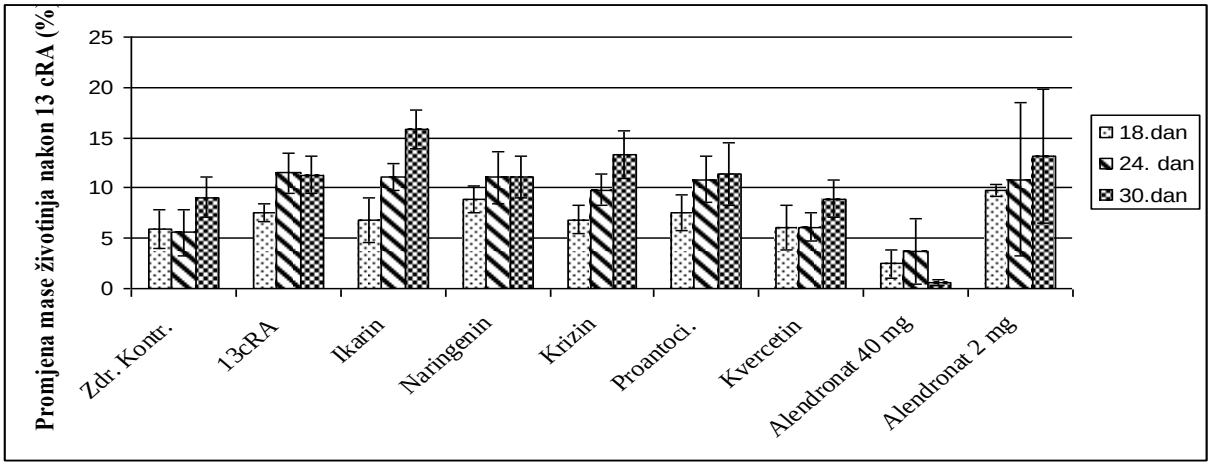
Postotak promjene TT životinja tijekom pokusa prikazan je na Slici 25. U svih životinja kontrolnih i/ili životinja obrađenih s 13cRA zapažen je prirast TT; % promjene TT kontrolne skupine 6. i 12. dana bio je 3,58 i 7,74% dok u životinja obrađenih s 13cRA% promjene TT je bio 5,10% i 11,66%. Prirast TT štakora obrađenih s 13cRA bio je veći za 1,52% - 3,9% u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (Slika 25a, b). Nakon prouzrokovanja osteoporoze s 13cRA, obrada životinja s flavonoidima u dozi od 100 mg kg^{-1}dovela je do daljnjeg prirasta težine od 18. – 30. dana za: ikarin 6,73% - 15,86%; naringenin 8,89% - 11,07%; krizin 6,87% - 13,29%; proantocijanidin 7,52% - 11,40%; kvercetin 6,02% - 8,95%. U skupini obrađenoj s Alendronatom u dozi od 40 mg kg^{-1} zabilježen je pad TT od 2,50% - 0,55%, dok je kod skupine obrađene s alendronatom u dozi od 2 mg kg^{-1} vidljiv prirast težine od 9,78% - 13,15%. U zdravoj kontrolnoj skupini kao i u skupini obrađenoj s 13cRA (model osteoporoze) vidljiv je daljnji prirast težine od 5,88% - 9,10%, odnosno 7,54% - 11,28% (Slika 25c).

Rezultati pokazuju da nema statistički značajne ($P > 0,05$) promjene u TT između zdrave kontrolne skupine i RMO tijekom pokusa ($P > 0,05$). Obrada RMO skupine s flavonoidima nije dovela do statistički značajne promjene u TT životinja; jedina statistički značajna promjena zapažena je kod životinja obrađenih ikarinom u odnosu na obradu životinja alendronatom u dozi od 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$).





a) b)



c)

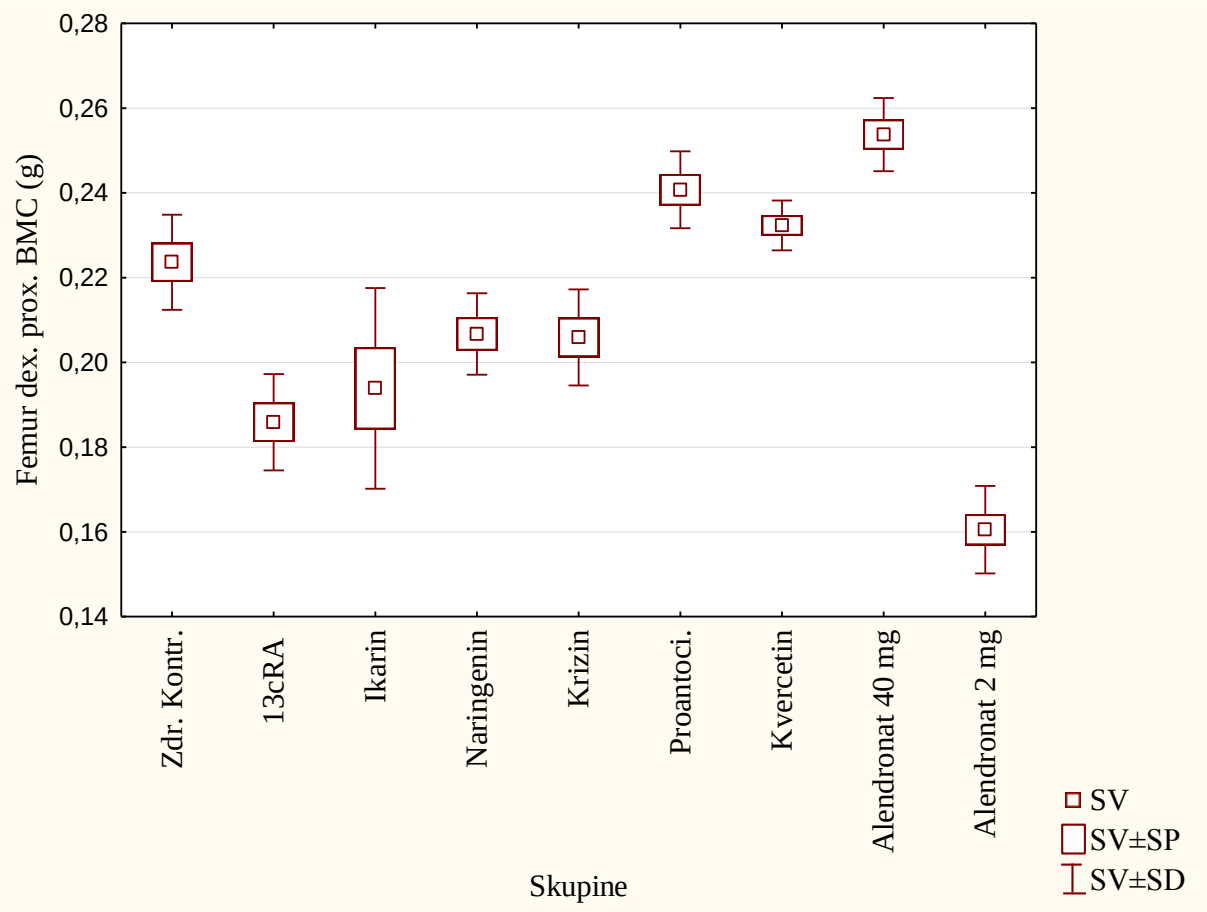
Slika 25. Učinak flavonoida ili alendronata na promjenu tjelesne težine (TT) u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. a, b) Postotak promjene tjelesne težine životinja u zdravoj kontroli i u skupini obrađenoj s 13cRA 6. i 12. dana. c) Postotak promjene tjelesne težine životinja tijekom obrade s flavonoidima. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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

4.1.2. Količina minerala u kostima (BMC; engl. *bone mineral content*)

Količinu minerala u kostima mjerena je u u proksimalnom i distalnom dijelu desne bedrene kosti.

Analizom podataka utvrđen je statistički značajan porast u BMC-u proksimalnog i distalnog dijela kosti (Slika 26) između zdrave kontrolne skupine i RMO skupine ($P < 0,05$); skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$); skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$); skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu ikarinom (prox. - $P < 0,01$; dist. - $P < 0,05$); skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,001$), skupine obrađene kvercetinom u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,001$).

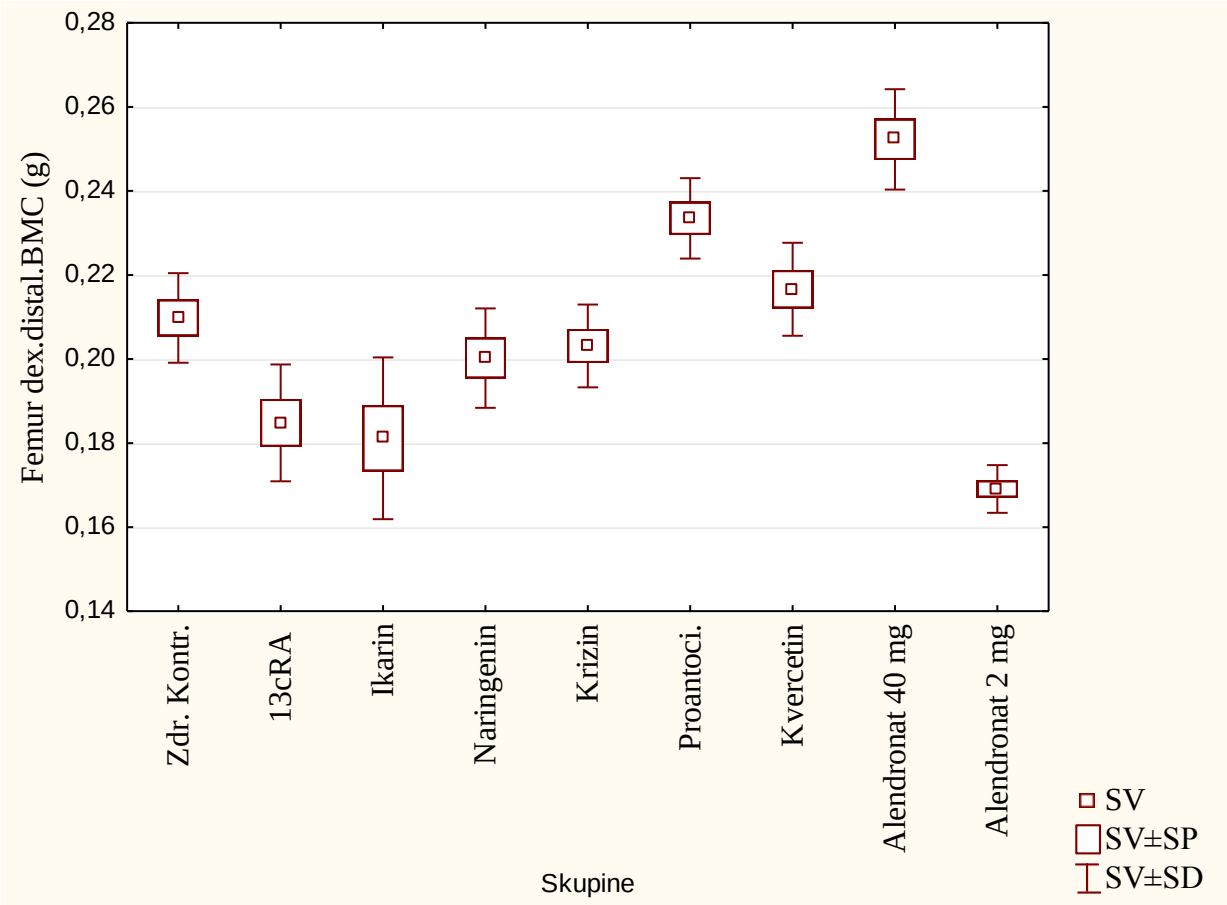


a)

Slika 26. Učinak flavonoida ili alendronata na BMC proksimalnog (a) i distalnog (b) dijela femura u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Slika 26 a): Zdr. Kontr. *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,01$); 13cRA *vs* Proantoci. ($P < 0,05$); Ikarin *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); Proantoci. *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,001$); Kvercetin *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,01$); Alendronat 40 mg kg^{-1} *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,001$)

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; BMC količina minerala u kostima (BMC; engl. *bone mineral content*); SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD - standardna devijacija



b)

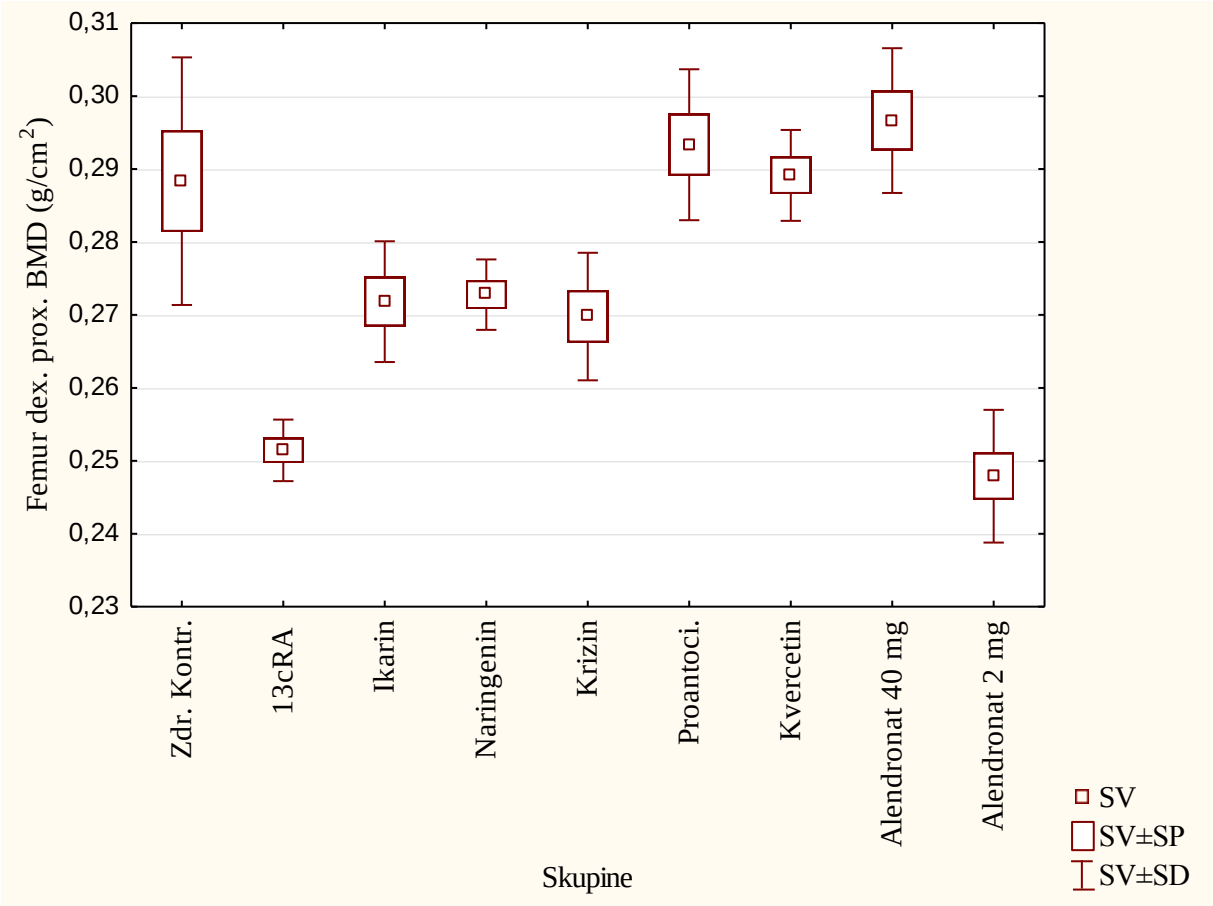
Nastavak slike 26.

Slika 26 b): 13cRA *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,01$); 13cRA *vs* Proantoci. ($P < 0,05$); Ikarin *vs* Proantoci. ($P < 0,05$); Ikarin *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,01$); Proantoc *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,001$); Kvercetin *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); Alendronat 40 mg kg^{-1} *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,001$)

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; BMC količina minerala u kostima (BMC; engl. *bone mineral content*); SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD - standardna devijacija

4.1.3. Mineralna gustoća kosti (BMD; engl. *Bone Mineral Density*)

Mineralna gustoća kosti mjerena je u proksimalnom i distalnom dijelu desne bedrene kosti. Analizom podataka utvrđen je statistički značajan porast BMD - a u proksimalnom i distalnom dijelu kosti (Slika 27) između: zdrave kontrolne skupine i RMO skupine u proksimalnom dijelu kosti ($P < 0,05$); zdrave kontrolne skupine i skupine obrađene alendronatom (2 mg kg^{-1}) u proksimalnom dijelu kosti ($P < 0,01$); skupine obrađene proantocijanidinom i RMO skupine u oba dijela kosti ($P < 0,01$); skupine obrađene kvercetinom i RMO skupine u proksimalnom dijelu kosti ($P < 0,05$); skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) i RMO skupine u oba dijela kosti (prox. - $P < 0,01$; dist. - $P < 0,001$); skupine obrađene proantocijanidinom i skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u oba dijela kosti ($P < 0,001$); skupine obrađene kvercetinom i skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u proksimalnom dijelu kosti ($P < 0,01$); skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) i skupine obrađene ikarinom u distalnom dijelu kosti ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u oba koštana dijela ($P < 0,001$).

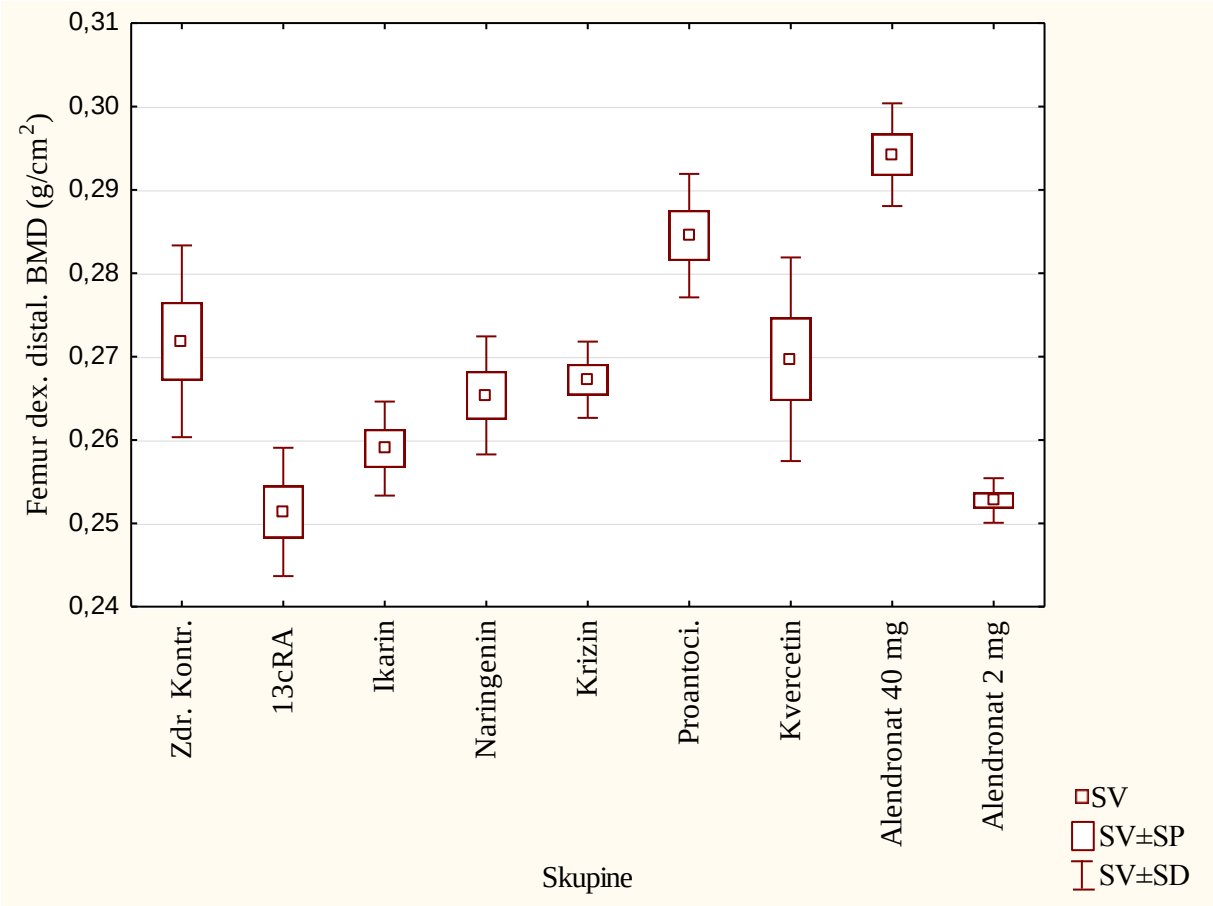


a)

Slika 27. Učinak flavonoida ili alendronata na BMD proksimalnog (a) i distalnog (b) dijela femura u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Slika 27 a): Zdr. Kontr. *vs* 13cRA (P < 0,05); Zdr. Kontr. *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} (*P* < 0,01); 13cRA *vs* Proantoci. (*P* < 0,01); 13cRA *vs* Kvercetin (*P* < 0,05); 13cRA *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} (*P* < 0,01); Proantoci. *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} (*P* < 0,001); Kvercetin *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} (*P* < 0,01); Alendronat 40 mg kg^{-1} *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} (*P* < 0,001)

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; BMC količina minerala u kostima (BMC; engl. *bone mineral content*); SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD - standardna devijacija



b)

Nastavak Slike 27.

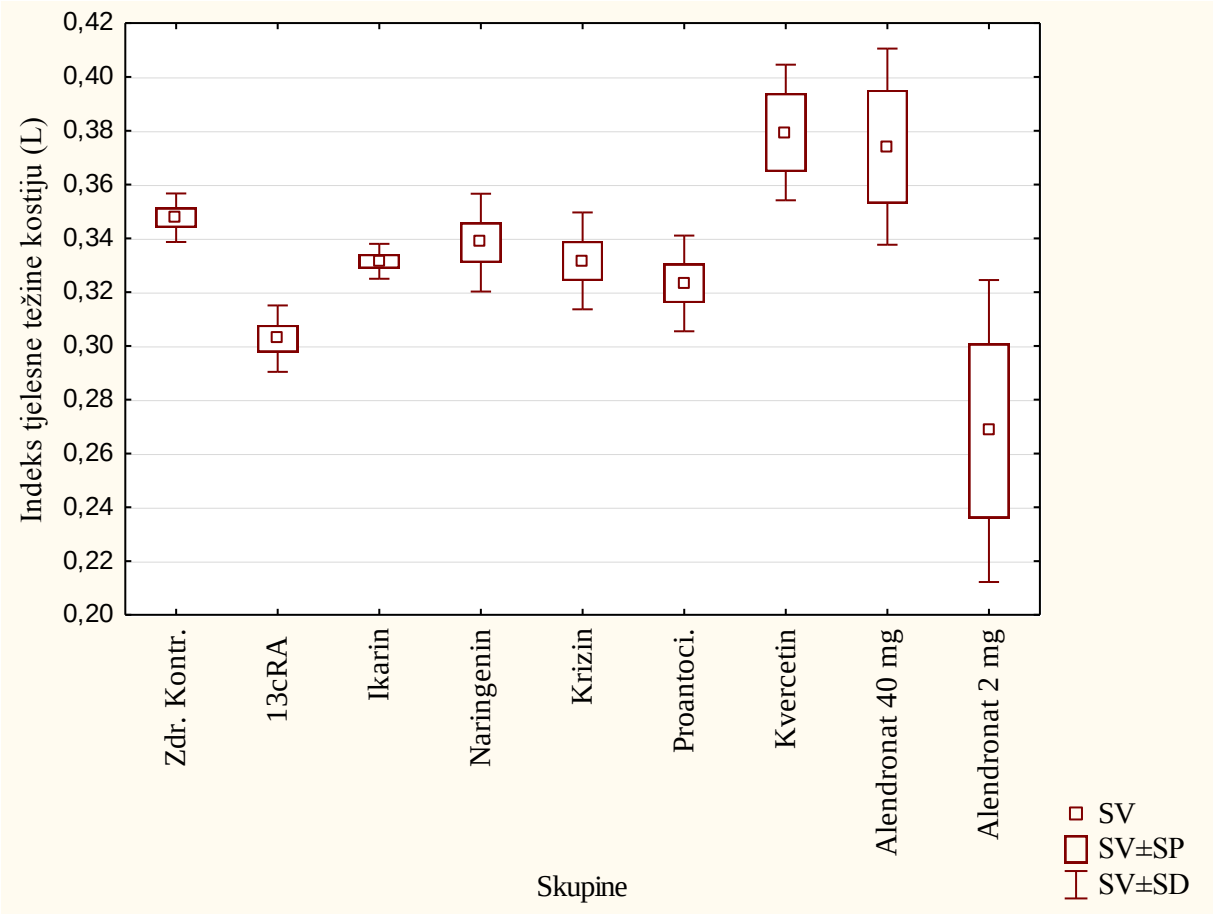
Slika 27 b): 13cRA *vs* Proantoci. ($P < 0{,}01$); 13cRA *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0{,}001$); Ikarin *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0{,}05$); Proantoci. *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0{,}001$); Alendronat 40 mg kg^{-1} *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0{,}001$)

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; BMC količina minerala u kostima (BMC; engl. *bone mineral content*); SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD - standardna devijacija

4.1.4. Rezultati fizikalnih mjerenja kosti

4.1.4a. Indeksa težine bedrenih kostiju

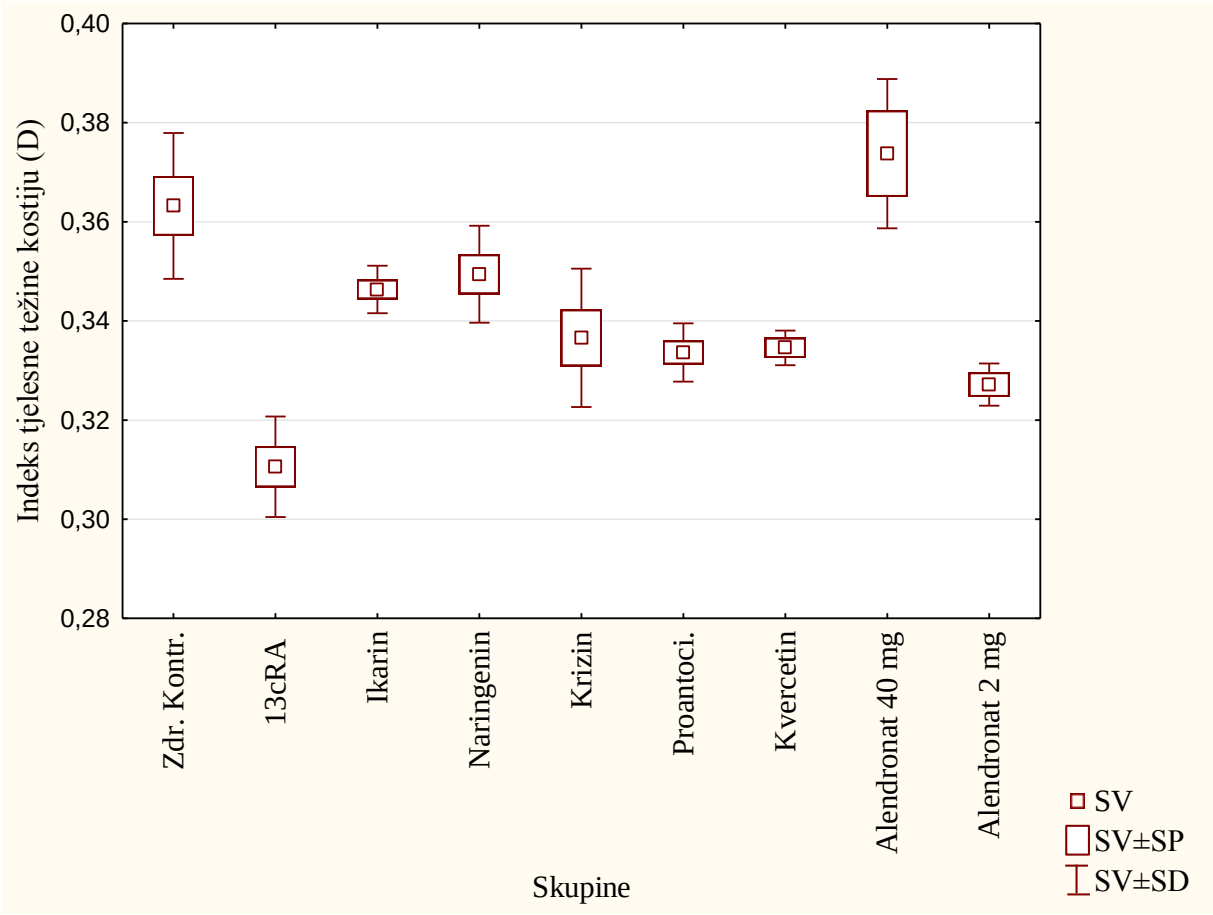
Radi točnosti rezultata indeks težine kosti izračunat je kao omjer težine kosti i tjelesne težine svake pojedinačne životinje. Iz rezultata mjerenja koja su izvršena na lijevim bedrenim kostima (Slika 28) vidljiv je statistički značajan porast indeksa težine kosti kod: zdrave kontrolne skupine u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$); skupine obrađene kvercetinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$). Iz rezultata mjerenja desnih bedrenih kostiju (Slika 29) vidljiv je statistički značajan porast indeksa težine kosti kod: zdrave kontrolne skupine u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,001$); skupine obrađene ikarinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$); skupine obrađene naringeninom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$).



Slika 28. Učinak flavonoida ili alendronata na indeks težina lijevih bedrenih kostiju u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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

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



Slika 29. Učinak flavonoida ili alendronata na indeks težina desnih bedrenih kostiju u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

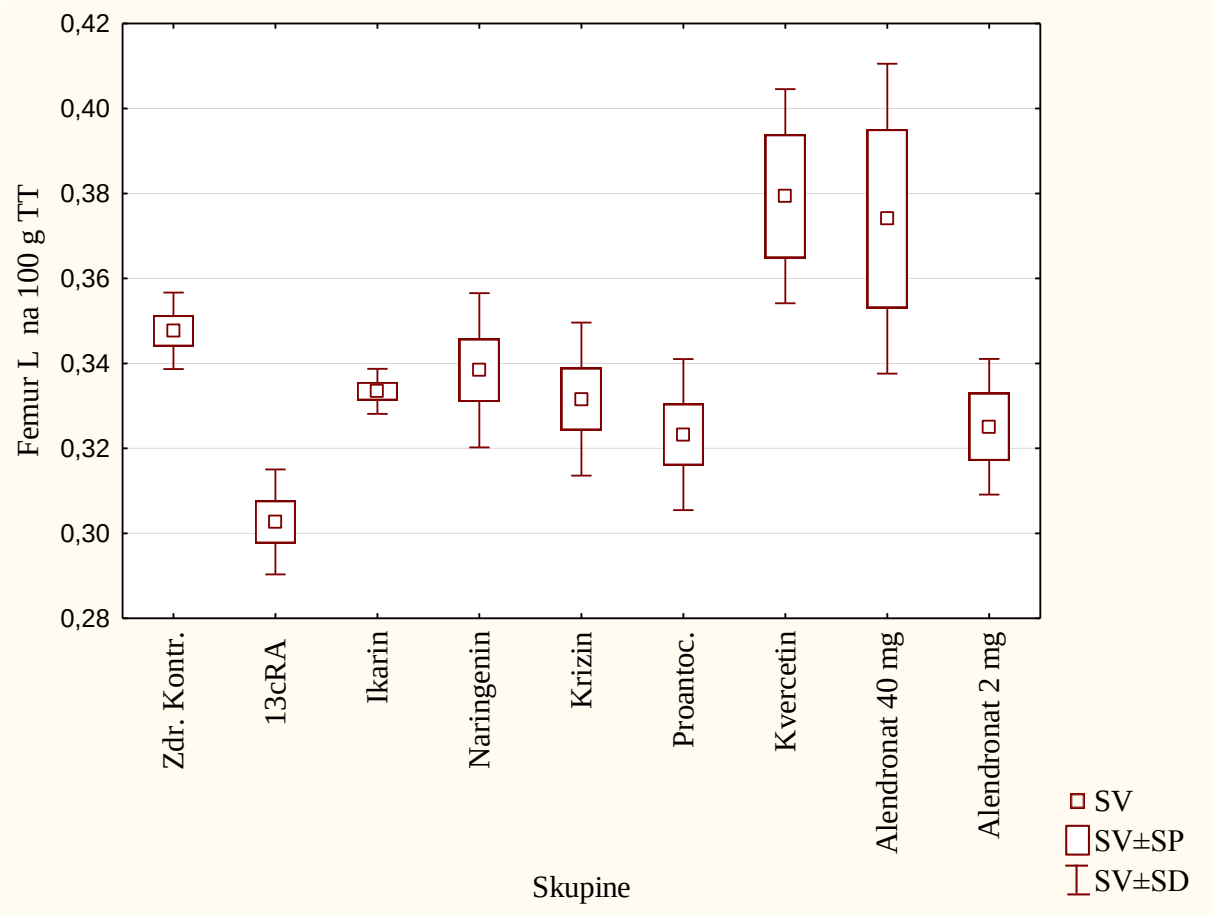
Zdr. Kontr. *vs* 13cRA ($P < 0,001$); 13cRA *vs* Ikarin ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Naringenin ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,01$)

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

4.1.4b. Relativna težina bedrenih kostiju

Relativne težine kosti su preračunate na 100 g tjelesne težine radi točnosti rezultata s obzirom na gubitak ili pojačani prirast težine pojedinih skupina. Iz rezultata mjerenja lijevih bedrenih kostiju (Slika 30) vidljiv je statistički značajan porast relativnih težina kosti između: zdrave kontrolne skupine i RMO skupine ($P < 0,05$); skupine obrađene kvercetinom i RMO skupine ($P < 0,01$); skupine obrađene alendronatom 40 mg kg^{-1} i RMO skupine ($P < 0,05$).

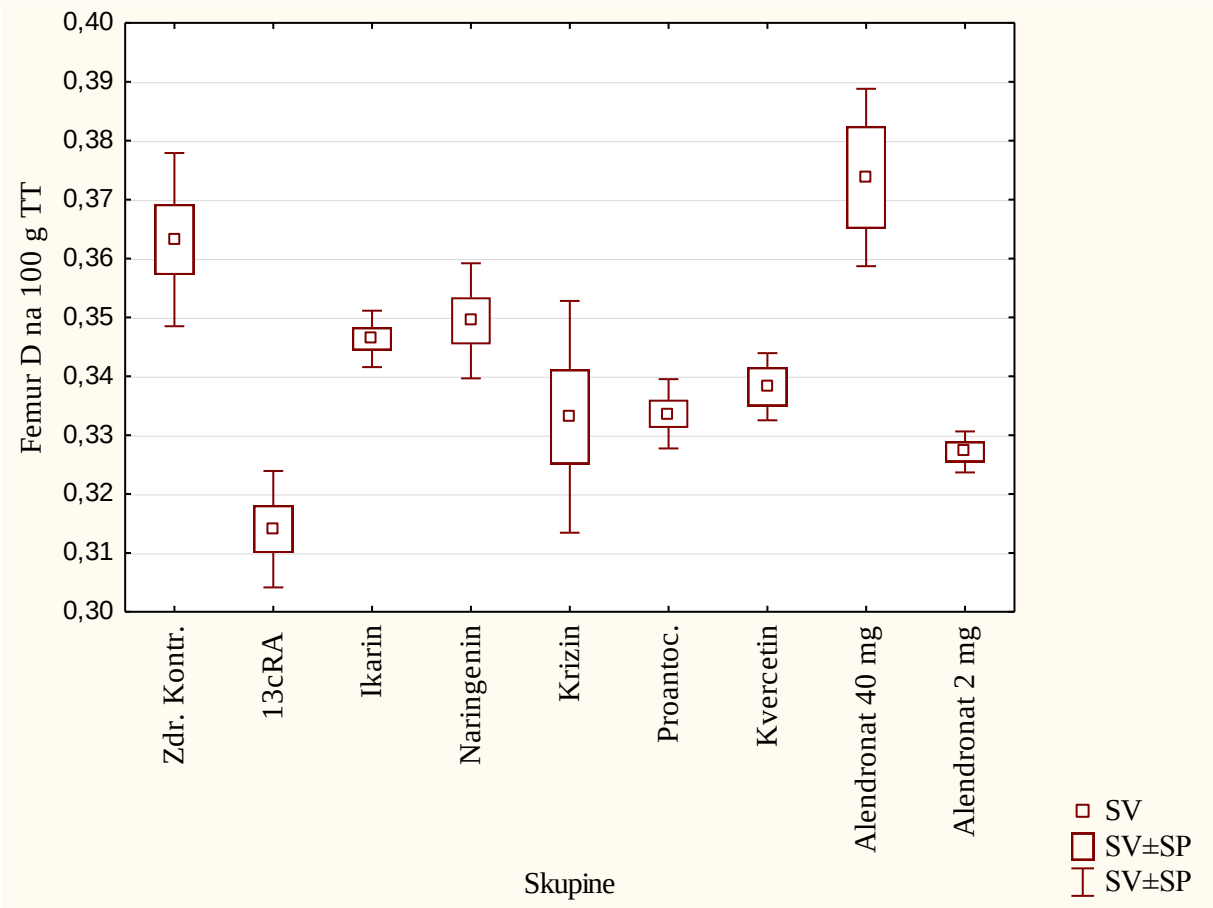
Iz rezultata mjerenja desnih bedrenih kostiju (Slika 31) vidljiv je statistički značajan porast relativnih težina kosti između: zdrave kontrolne skupine i RMO skupine ($P < 0,001$); skupine obrađene ikarinom i RMO skupine ($P < 0,05$); skupine obrađene naringeninom i RMO skupine ($P < 0,05$); skupine obrađene alendronatom 40 mg kg^{-1} i RMO skupine ($P < 0,01$).



Slika 30. Učinak flavonoida ili alendronata na relativnu težinu lijevih bedrenih kostiju u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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

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



Slika 31. Učinak flavonoida ili alendronata na relativnu težinu desnih bedrenih kostiju u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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

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

4.1.4c. Geometrijske koštane odrednice bedrenih kosti

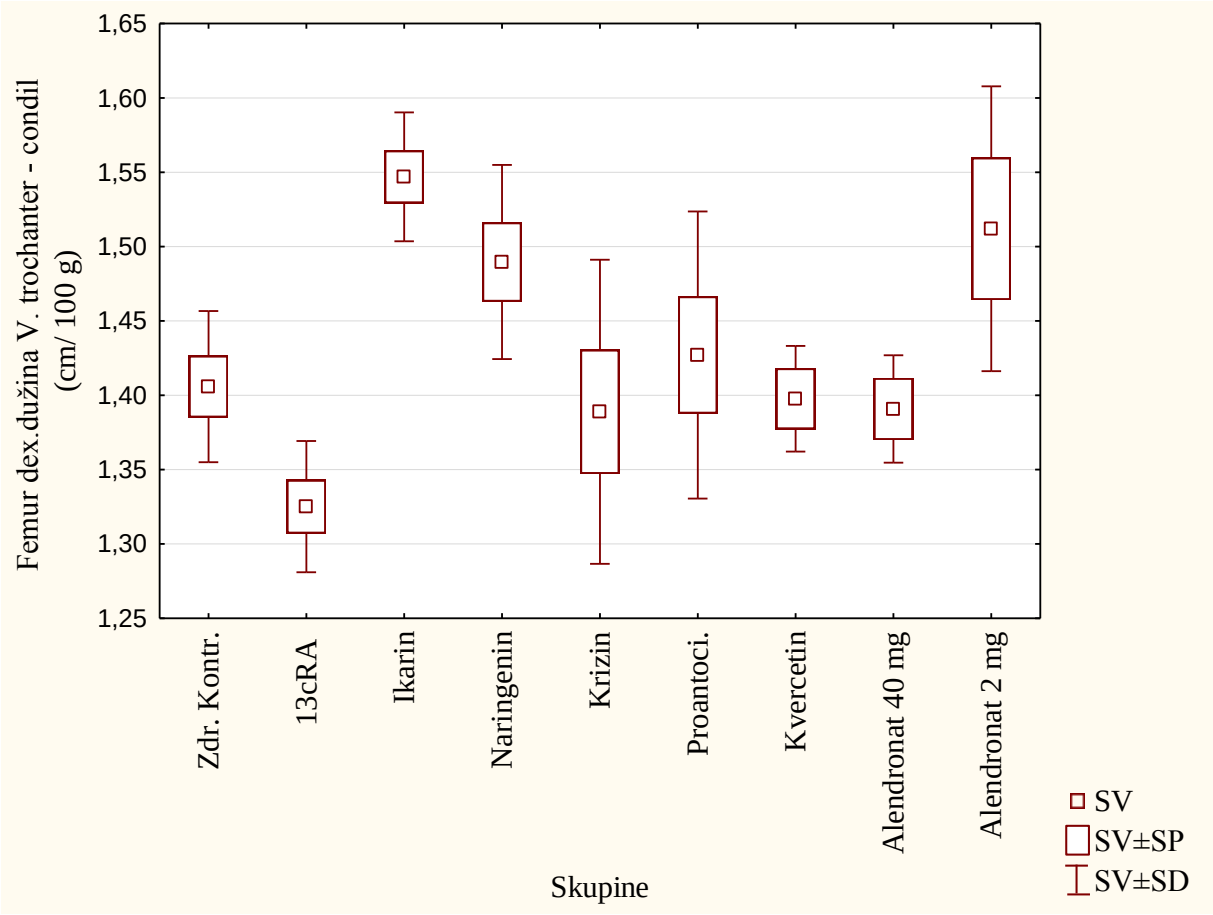
Rezultati geometrijskih koštanih odrednica preračunati su na 100 g tjelesne težine radi točnosti rezultata, a rezultati su prikazani kao cm/100g. Mjerenja su izvršena na desnim bedrenim kostima (femurima). Mjereni su duljina kosti (veliki trohanter - kondil), antero- posteriorna dužina (AP) i medio-lateralna dužina (ML) proksimalnog dijela kosti, srednjeg dijela kosti (dijafize) i distalnog dijela kosti (Slike 32 - 35).

Analizom podataka dobivenih mjerenjem duljina desnih bedrenih kosti (Slika 32) utvrđen je statistički značajan porast duljine kosti između: skupine obrađene ikarinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,001$); skupine obrađene naringeninom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$).

Analizom podataka dobivenih mjerenjem ML i AP dužina proksimalnih dijelova desnih bedrenih kostiju (Slika 33) utvrđen je statistički značajan porast ML dužine kosti između skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$) i skupinu obrađenu krizinom ($P < 0,001$); skupine obrađene proanocijanidinom u donosu na skupinu obrađenu krizinom ($P < 0,01$). Također je utvrđen statistički značajan porast AP dužine kosti između skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) i skupine obrađene kvercetinom u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom 2 (mg kg^{-1}) ($P < 0,05$).

Analizom podataka dobivenih mjerenjem ML i AP dužina dijafiza desnih bedrenih kostiju (Slika 34) utvrđen je statistički značajan porast ML dužine kosti između zdrave kontrolne skupine u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) i skupinu obrađenu krizinom ($P < 0,05$). Također je utvrđen statistički značajan porast AP dužine kosti između skupine obrađene ikarinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) i skupinu obrađenu krizinom ($P < 0,01$); skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$).

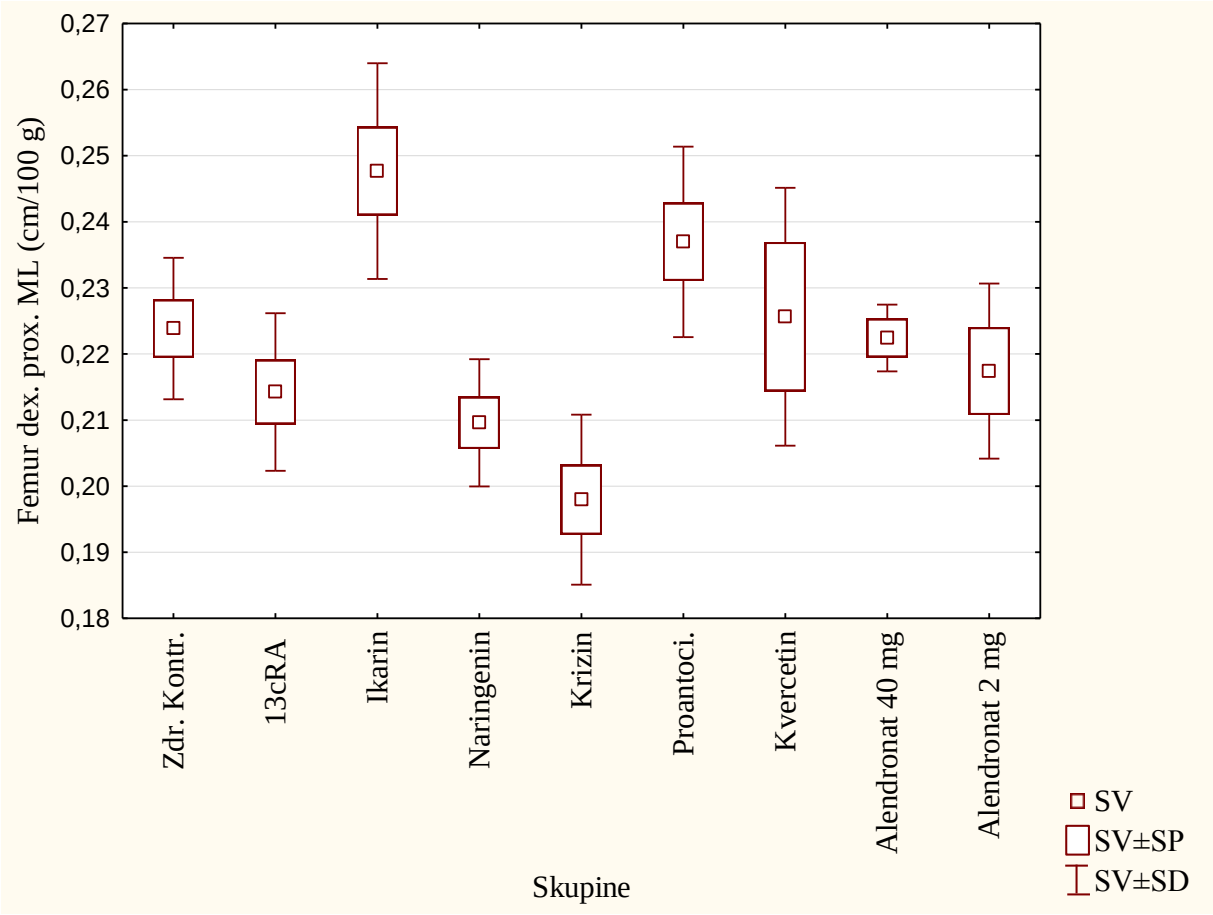
Analizom podataka dobivenih mjerenjem ML i AP dužina distalnih dijelova desnih bedrenih kostiju (Slika 35) utvrđen je statistički značajan porast ML dužine kosti između skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupinu obrađenu krizinom ($P < 0,05$); skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na skupinu obrađenu krizinom ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu krizinom ($P < 0,01$). Također je utvrđen statistički značajan porast AP dužine kosti između skupine obrađene ikarinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) i skupine obrađene naringeninom ($P < 0,05$) i Krizinom $P < 0,01$).



Slika 32. Učinak flavonoida ili alendronata na duljinu desnih bedrenih kosti u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

13cRA *vs* Ikarin ($P < 0,001$); 13cRA *vs* Naringenin ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$)

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

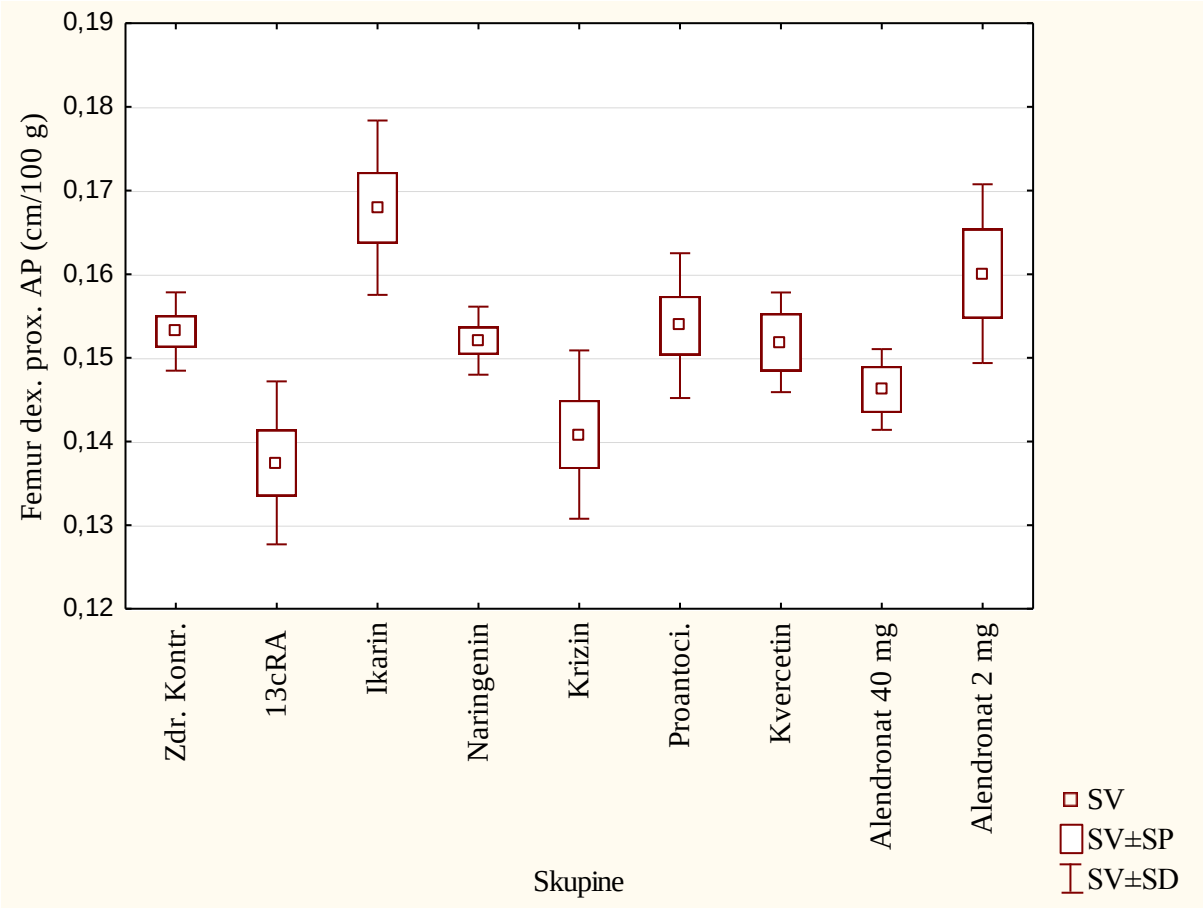


a)

Slika 33. Učinak flavonoida ili alendronata na ML (a) i AP (b) dužine proksimalnih dijelova desnih bedrenih kostiju u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Slika 33a): Ikarin *vs* Naringenin ($P < 0,05$); Ikarin *vs* Krizin ($P < 0,001$); Krizin *vs* Proantocijanidin ($P < 0,01$)

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD- standardna devijacija; ML - medio-lateralna dužina; AP - anterio-posteriorna dužina.

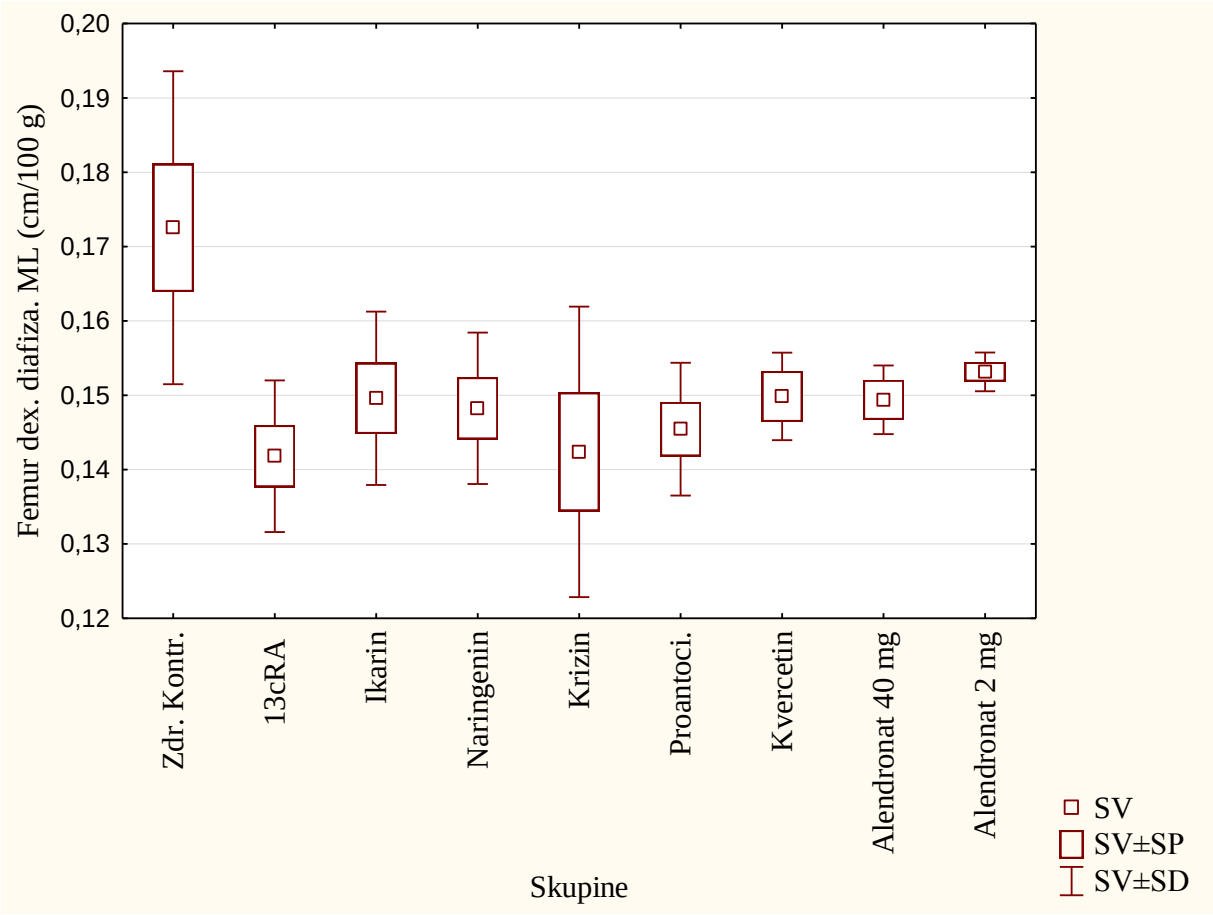


b)

Nastavak Slike 33.

Slika 33b): Zdr. Kontr. *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); Kverectin *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$)

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD- standardna devijacija; ML - medio-lateralna dužina; AP - anterio-posteriorna dužina.

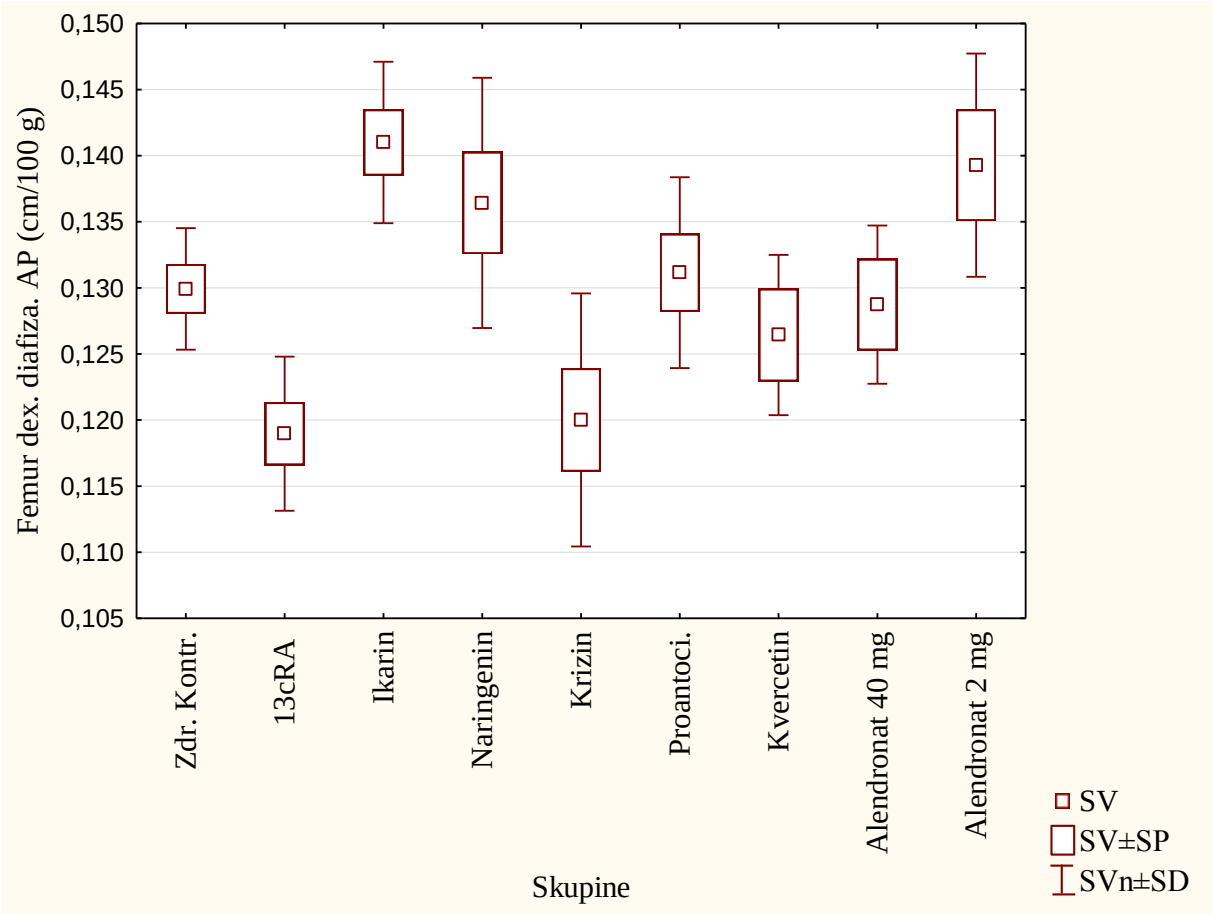


a)

Slika 34. Učinak flavonoida ili alendronata na ML (a) i AP (b) dužine dijafiza desnih bedrenih kostiju u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Slika 34a): Zdr. Kontr. *vs* RMO ($P < 0,05$); Zdr. Kontr. *vs* Krizin ($P < 0,05$)

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD- standardna devijacija; ML - medio-lateralna dužina; AP - anterio-posteriorna dužina.

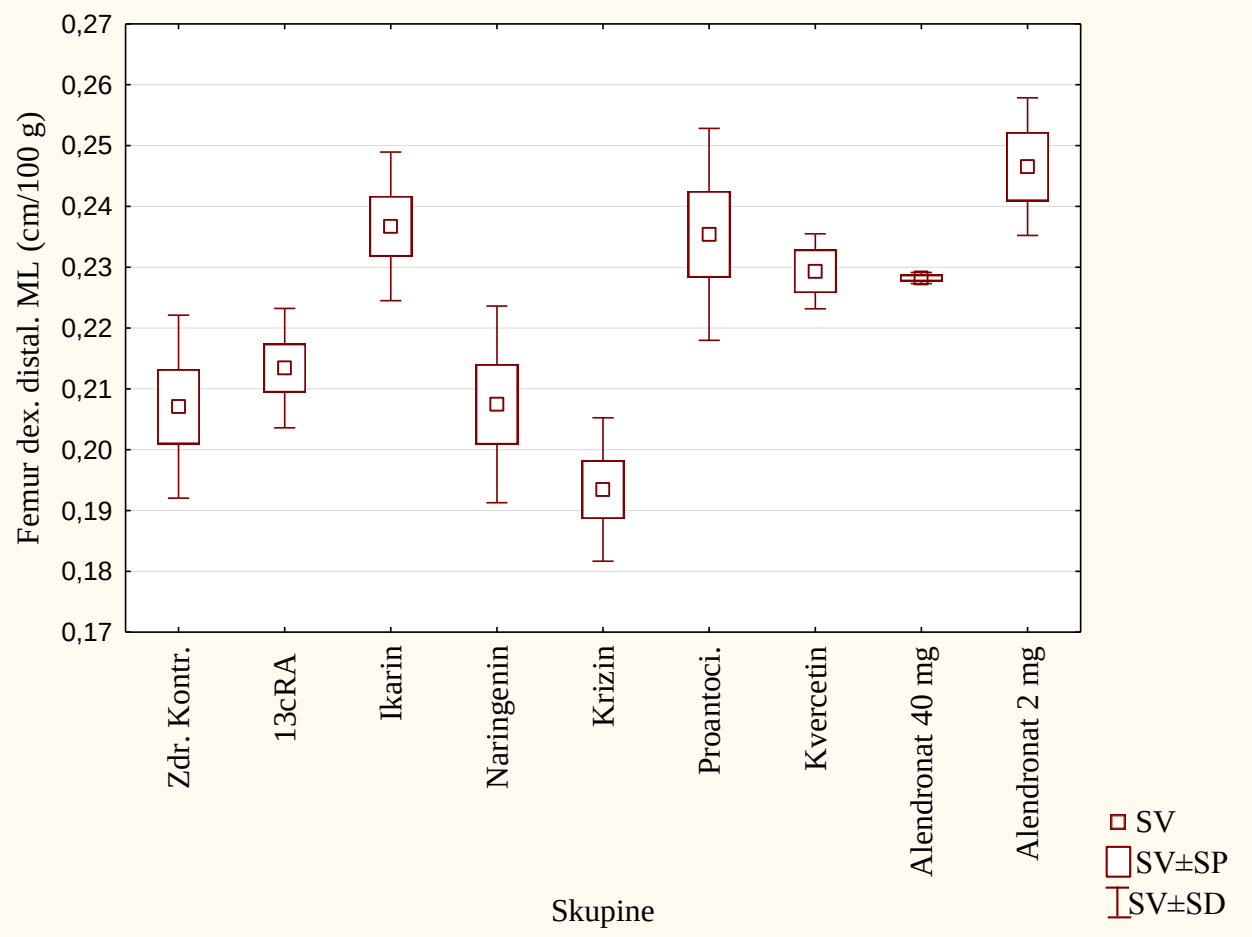


b)

Nastavak Slike 34.

Slika 34b): 13cRA *vs* Ikarin ($P < 0,01$); 13cRA *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); Ikarin *vs* Krizin ($P < 0,01$)

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD- standardna devijacija; ML - medio-lateralna dužina; AP - anterio-posteriorna dužina.

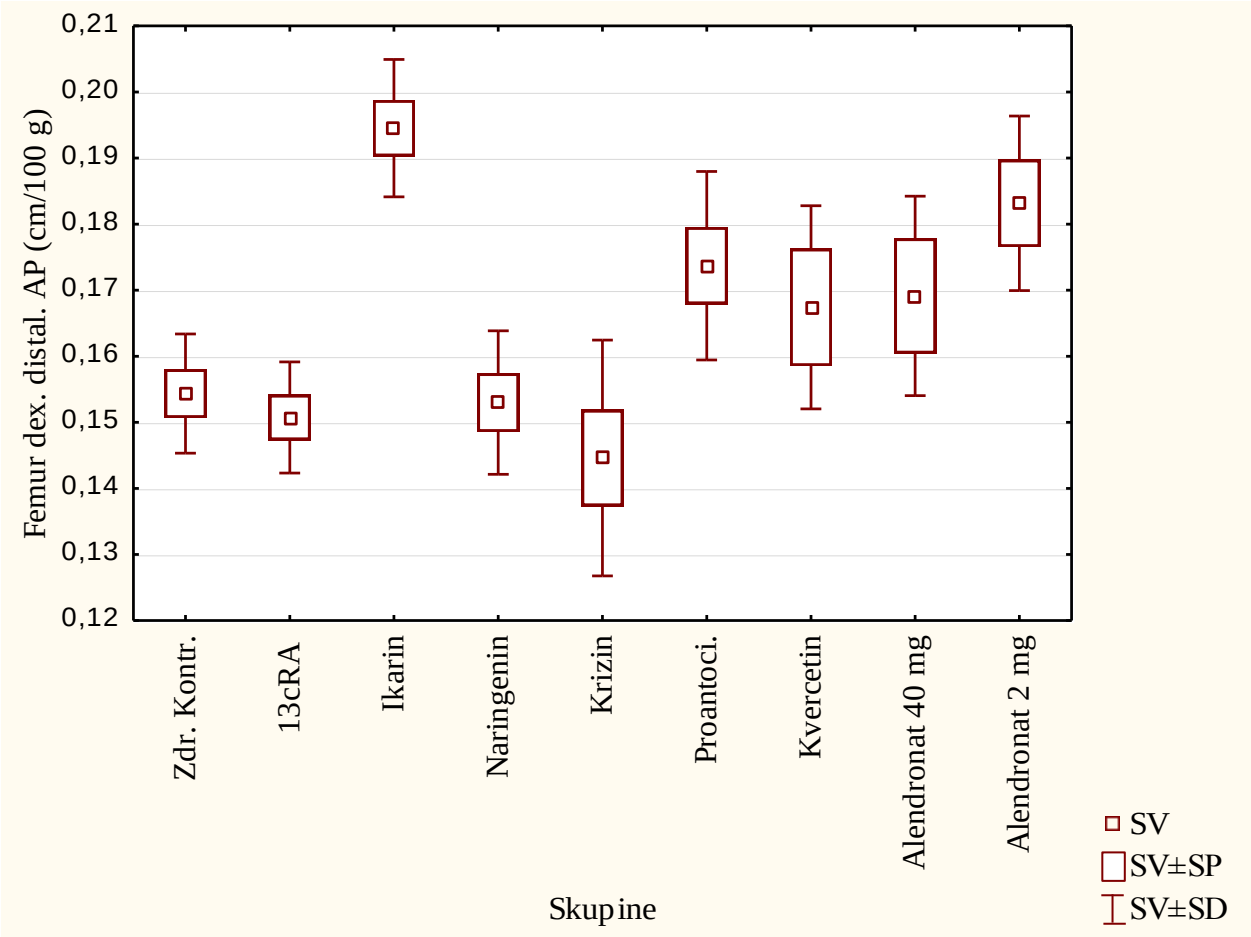


a)

Slika 35. Učinak flavonoida ili alendronata na ML (a) i AP (b) dužine distalnih dijelova desnih bedrenih kostiju u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Slika 35a): Ikarin *vs* Krizin ($P < 0,05$); Krizin *vs* Proantocijanidin ($P < 0,05$); Krizin *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,01$)

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD- standardna devijacija; ML - medio-lateralna dužina; AP - anterio-posteriorna dužina.



b)

Nastavak Slike 35.

Slika 35b): 13cRA *vs* Ikarin ($P < 0,01$); Ikarin *vs* Naringenin ($P < 0,05$); Ikarin *vs* Krizin ($P < 0,01$)

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD- standardna devijacija; ML - medio-lateralna dužina; AP - anterio-posteriorna dužina.

4.1.5. Histološka analiza bedrenih kostiju

Histološka analiza distalnog dijela dijafize femura kontrolnih štakora pokazuje da je korteks femura građen pretežno od cirkumferentnog lamelarnog koštanog tkiva koje se sastoji od lamela i osteocita smještenih u okruglim ili ovalnim lakunama (Slika 36a, c, d), dok se manje zastupljeni osteoni nalaze u središnjem dijelu koštanog tkiva (Slika 36c, d), a naročito u anteriornom dijelu reza (Slika b). U tkivu je nađeno i par manjih intrakortikalnih šupljina

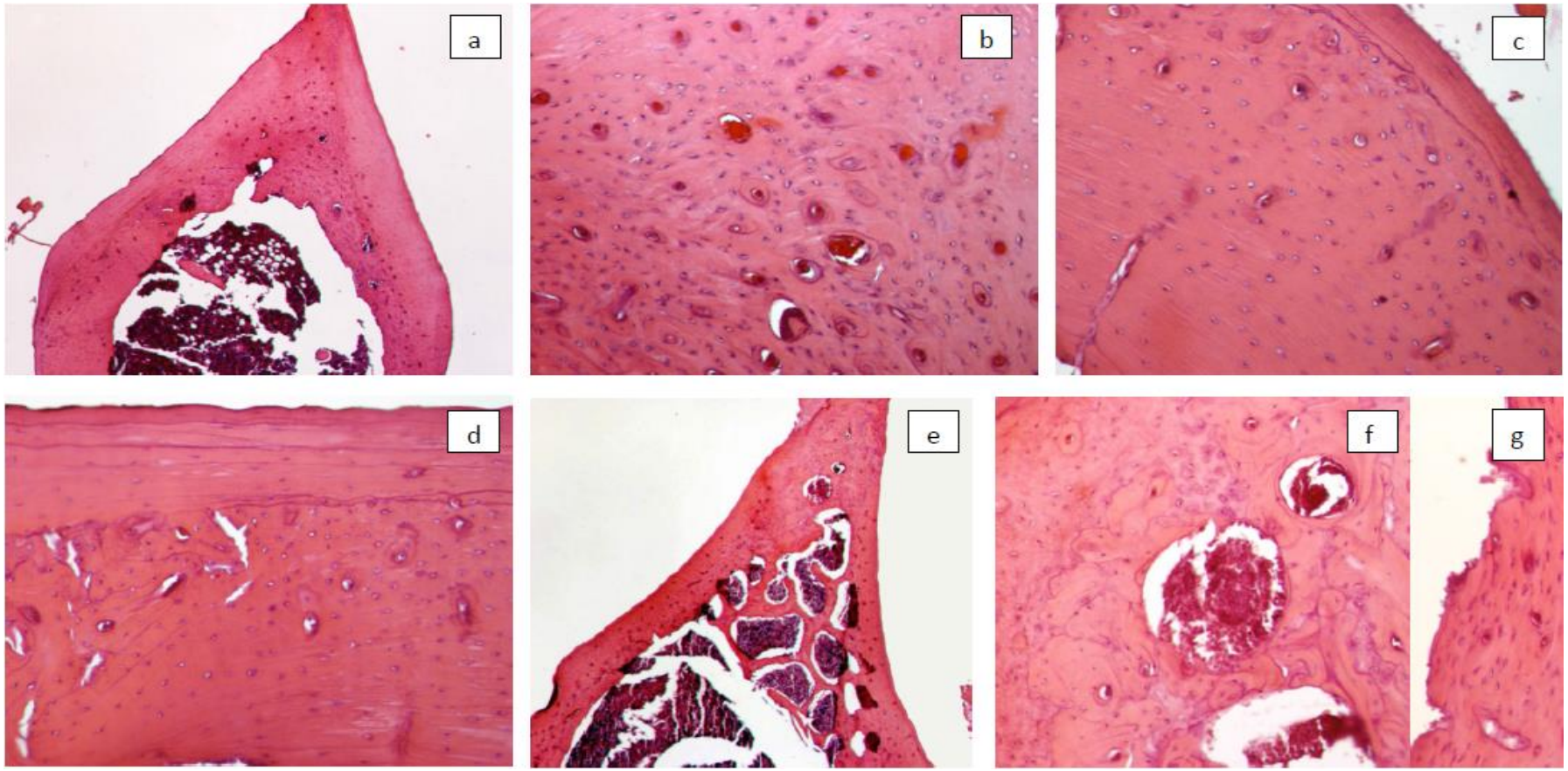
(resorpcijskih šupljina) ispunjenih koštanom srži (Slika 36a, b) te ostaci „nelamelarnog koštanog tkiva“ (woven bone) (Slika 36d). Periost i endost su glatki bez nepravilnosti.

U usporedbi s kontrolnom skupinom, korteks dijafize femura štakora obrađenih s retinoičnom kiselinom karakterizira stanjivanje praćeno značajnom poroznošću uzrokovanom formiranjem brojnih intrakortikalnih šupljina različitih veličina (Slika 36e, f), kao i mjestimično erodiranu endostalnu površinu kosti (unutarnja površina kosti) (Slika 36g). Šupljine su s kortikalne strane djelomično omeđene osteoidom, dok su na luminalnoj površini mjestimično uočeni osteoklasti (Slika 36f), koji su također nađeni i u udubljenjima erodirane endostalne površine kosti (Slika 36g).

Sličnu građu, no s nešto manje intrakortikalnih šupljina pokazuje i femur osteoporotičnih štakora obrađenih s naringeninom (Slika 36h).

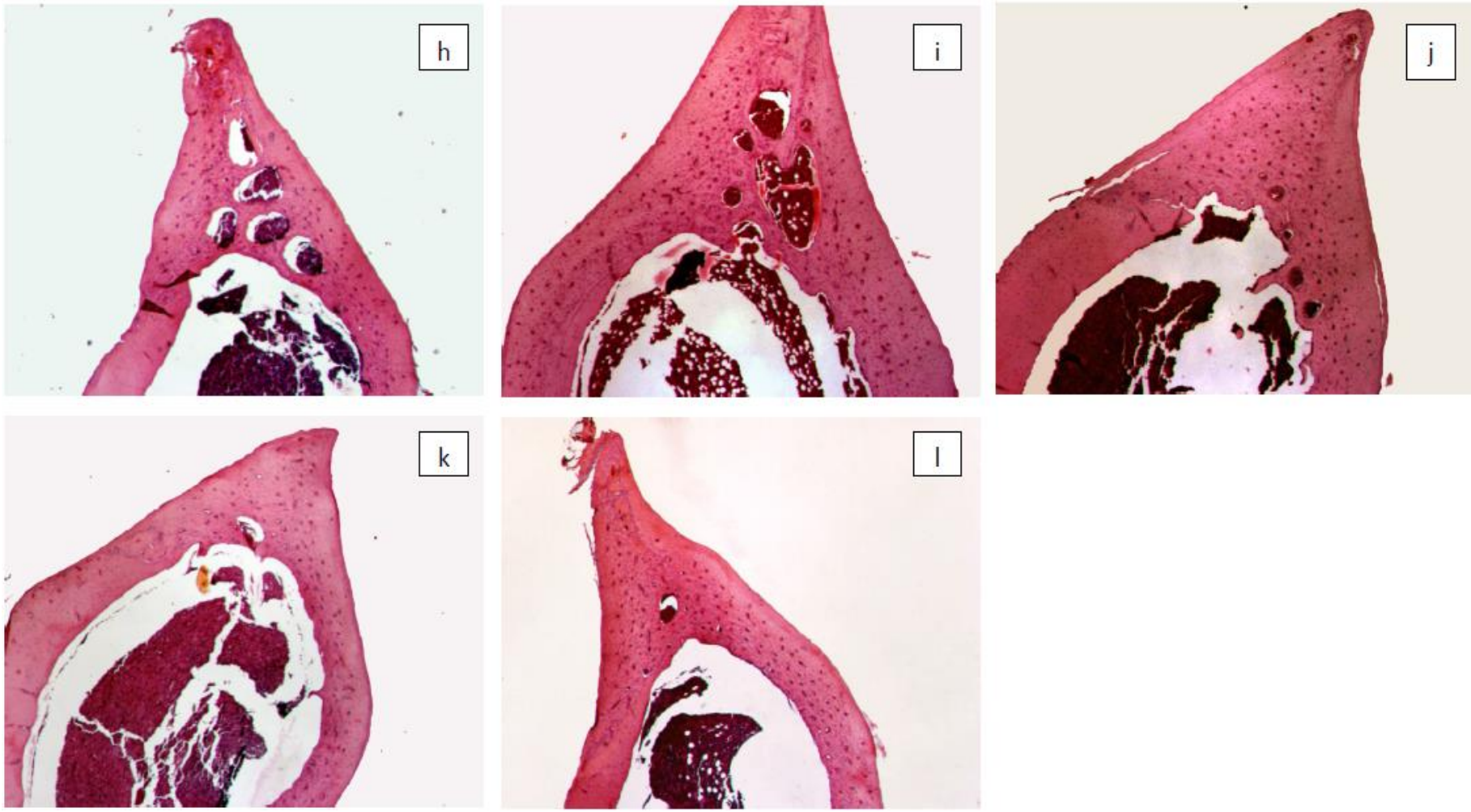
Kortikalna kost osteoporotičnih štakora obrađenih s alendronatomu dozi od 40 mg kg^{-1} pokazuje znakove poboljšanja strukture femura (Slika 36i). Debljina kortikalne kosti se povećala, broj kao i veličina intrakortikalnih šupljina je značajno smanjena, dok unutarnja površina korteksa i dalje pokazuje nepravilnosti na pojedinim mjestima.

Osteoporotični štakori obrađeni s kvercetinom (Slika 36j), proantocijanidinom (Slika 36k) kao i krizinom (Slika 36l) pokazuju značajno poboljšanje strukture kortikalne kosti dijafize femura koja pokazuje debljinu sličnu onoj u kontrolnoj skupini, iako je još uvijek prisutno par manjih intrakortikalnih šupljina, dok endostalna površina pokazuje tek sporadičnu vrlo malu erodinaronost.



Slika 36. Učinak flavonoida ili alendronata na histološku analizu bedrenih kostiju u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Slika prikazuje poprečni presjek distalnog dijela dijafize femura ženskih štakora obojenih HE.

(a-d) Kontrola. (a) Korteks se sastoji većim dijelom od vanjskog i unutarnjeg osnovnog lamelarnog koštanog tkiva (c,d) te od malobrojnih osteona koje se nalaze u središnjem dijelu tkiva (c, d), a brojniji su tek u anteriornom dijelu reza. Par manjih intrakortikalnih šupljina (b) i ostaci nezrelog koštanog tkiva (woven) (d). (e-g) Štakori obrađeni s retinoičnom kiselinom (osteoporotična grupa). (e) Formiranje brojnih intrakortikalnih šupljina i stanjivanje korteksa. (f) Intrakortikalne šupljine okružene novo formiranom kosti, osteoklasti na luminalnoj površini šupljine. (g) Osteoklast u udubljenju erodirane endostalne površine kosti. x4 (a,e), x20 (b, c, d, f,g).



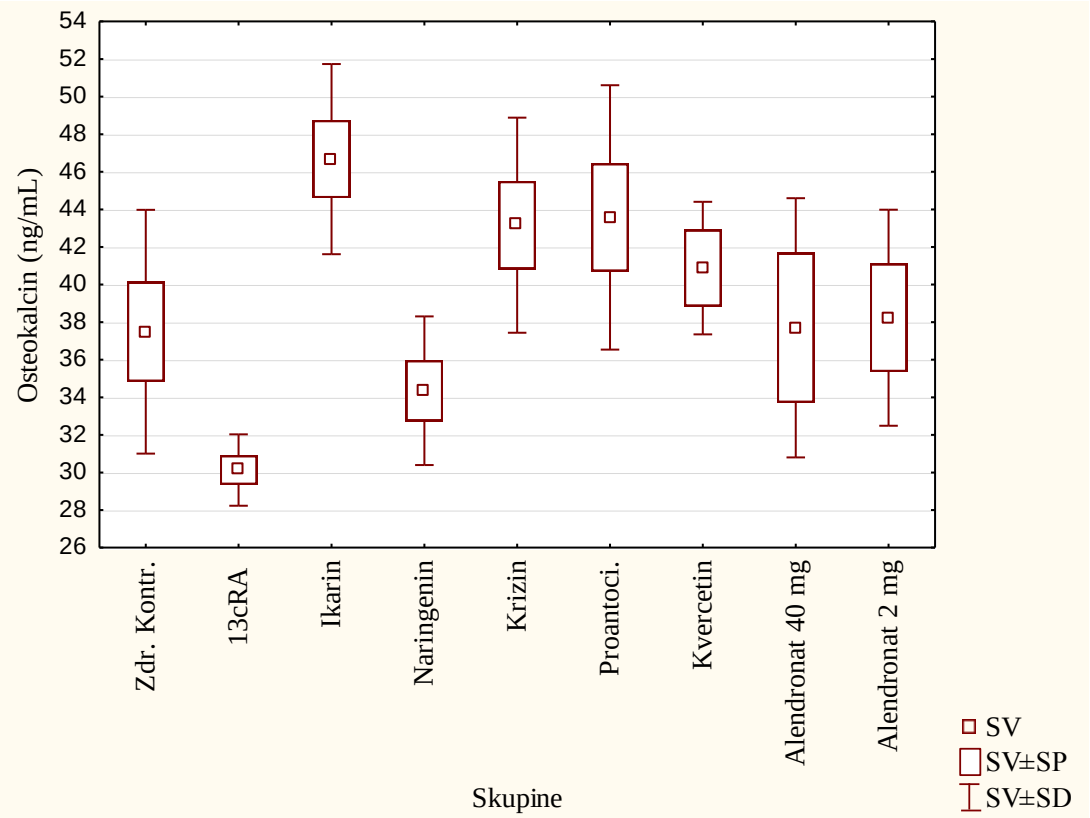
Nastavak Slike 36.

(h) Manje intrakortikalnih šupljina kod osteoporotičnih štakora obrađenih s naringeninom. (i) Osteoporotična skupina obrađena s alendronatom. Debljina kortikalne kosti se povećala, broj i veličina intrakortikalnih šupljina je značajno smanjena. Osteoporotični štakori obrađeni s kvercetinom (j), proantocijanidinom (k) kao i krizinom (l) pokazuju značajno poboljšanje strukture kortikalne kosti dijafize femura koja pokazuje debljinu sličnu onoj u kontrolnoj skupini, iako je još uvijek prisutno par manjih intrakortikalnih šupljina. x4 (h-l).

4.1.6. Rezultati biokemijskih biljega koštanog preokreta

4.1.6a. Vrijednosti biljega koštane izgradnje - osteokalcina

Analizom podataka utvrđen je statistički značajan porast vrijednosti osteokalcina u serumu između RMO skupine i skupina obrađenih ikarinom ($P < 0,01$); krizinom ($P < 0,05$) i proantocijanidinom ($P < 0,05$) (Slika 37).



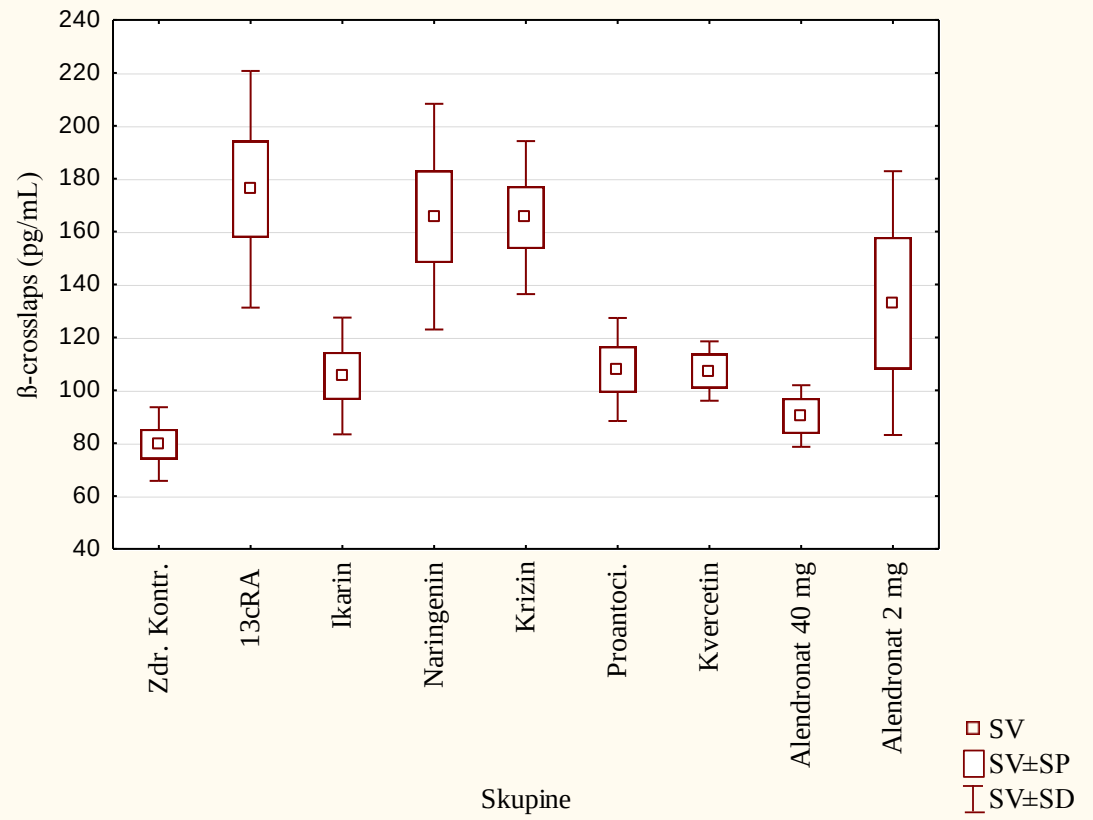
Slika 37. Učinak flavonoida ili alendronata na vrijednosti biljega koštane izgradnje osteokalcina u serumu RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

13cRA *vs* Ikarin ($P < 0,01$); 13cRA *vs* Krizin ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Proantocijanidin ($P < 0,05$)

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

4.1.6b. Vrijednosti biljega koštane razgradnje, C-terminalnog fragmenta tipa I kolagena (CTX) ili Beta CrossLapsa (β-CTx)

Analizom podataka utvrđen je statistički značajan porast vrijednosti β-CTx-a između RMO skupine i zdrave kontrolne skupine ($P < 0{,}01$); skupine obrađene naringeninom i zdrave kontrolne skupine ($P < 0{,}05$) i skupine obrađene krizinom i zdrave kontrolne skupine ($P < 0{,}05$) (Slika 38).



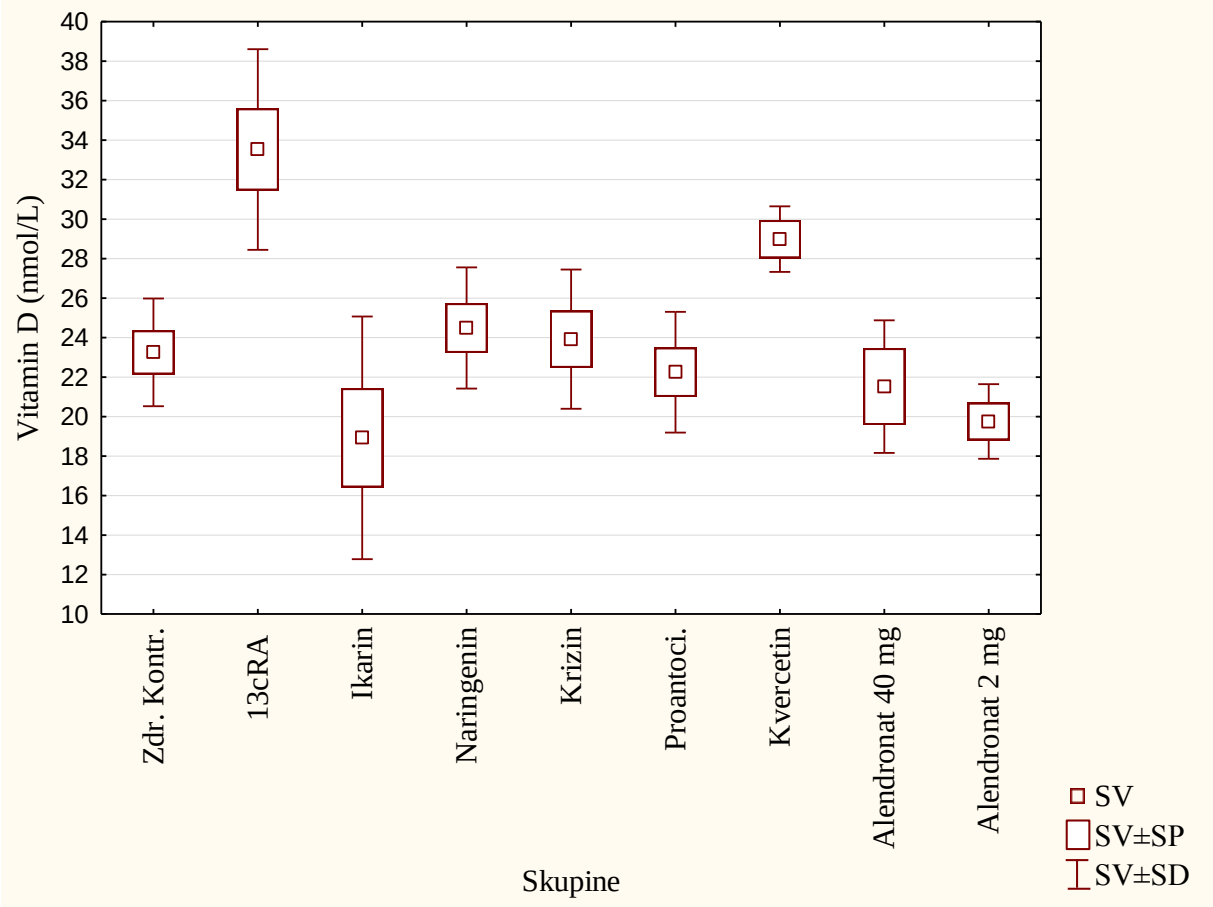
Slika 38. Učinak flavonoida ili alendronata na vrijednosti biljega koštane razgradnje Beta CrossLapsa (β-CTx) u serumu RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Zdr. Kontr. *vs* 13cRA ($P < 0{,}01$); Zdr. Kontr. *vs* Naringenin ($P < 0{,}05$); Zdr. Kontr. *vs* Krizin ($P < 0{,}05$)

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

4.1.7. Razina 25-OH Vitamin D u serumu

Iz rezultata mjerenja koncentracije 25-OH Vitamina D (Slika 39) vidljiv je statistički značajan porast koncentracija vitamina D između RMO skupine u odnosu na skupine obrađene alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,01$) i skupine obrađene ikarinom ($P < 0,05$).



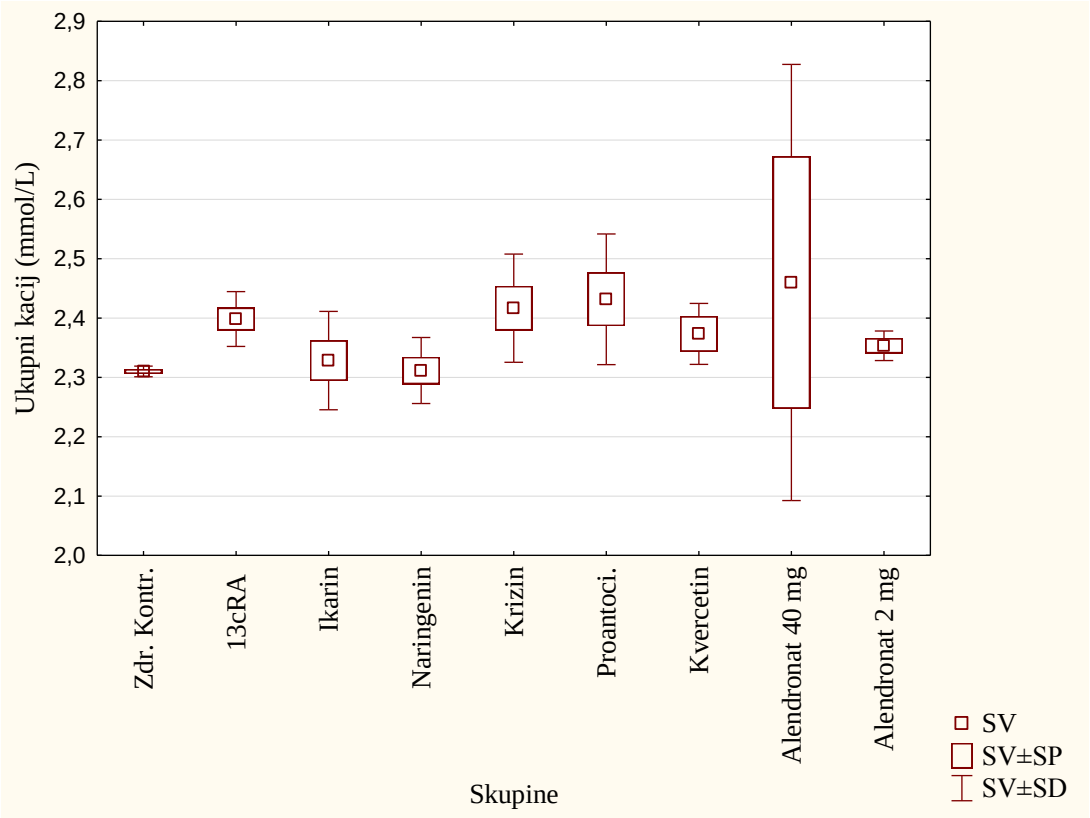
Slika 39. Učinak flavonoida ili alendronata na vrijednosti koncentracije 25-OH Vitamina D u serumu RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

13cRA *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,01$); 13cRA *vs* Ikarin ($P < 0,05$)

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

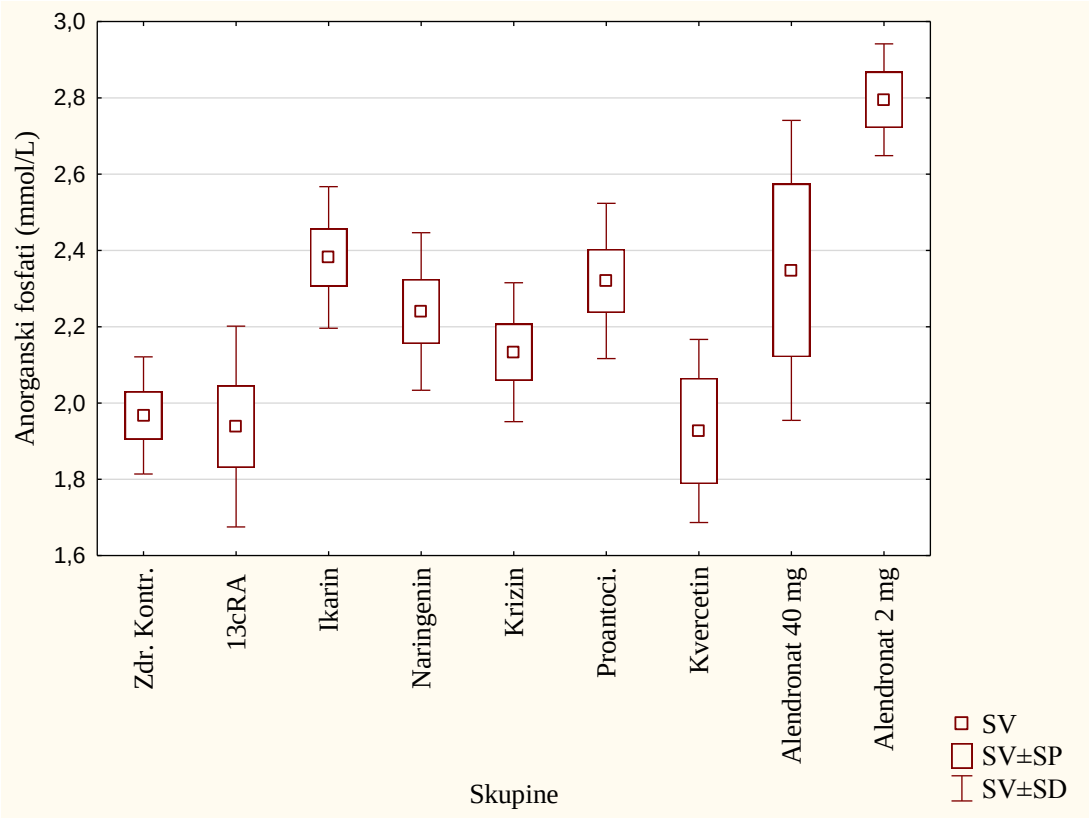
4.1.8. Razina kalcija i fosfora u serumu

Razina kalcija i fosfora prikazana je na Slici 40 i 41. Na Slici 40 nije vidljiva statistički značajna razlika u vrijednostima koncentracije ukupnog kalcija u krvi RMO štakora nakon obrade s flavonoidima i alendronatom dok na Slici 41 je vidljiv statistički značajan porast anorganskog fosfata kod skupine obrađene alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,01$); RMO skupinu ($P < 0,05$) i skupinu obrađenu kvercetinom ($P < 0,05$) (Slika 41).



Slika 40. Učinak flavonoida ili alendronata na razinu kalcija u serumu RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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



Slika 41. Učinak flavonoida ili alendronata na razinu anorganskog fosfata u serumu RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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

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

4.2. PROTUUPALNI UČINAK FLAVONOIDA

Epidemiološki dokazi pokazuju da visok unos biljne hrane bogate flavonoidima je povezana s nižim rizikom od kroničnih bolesti uključujući osteoporozu. Flavonoidi igraju ključnu ulogu u prevenciji bolesti kroz brojne ciljne molekule uključene u modulaciju imunološkog sustava i upalnog odgovora. Točnije, ako upalni odgovor nije pravilno kontroliran, izazvani visoki upalni stres može biti ključni modulator dodatnih oštećenja strukture kosti, posebice kroz aktivaciju osteoklasta, postajući rizični čimbenik u osteoporozi. Upalni citokini, ključni posrednici upalnog odgovora, mogu pojačati ili inhibirati upalni proces kroz regulaciju i aktivaciju leukocita i njihovog sazrijevanja, proizvodnju i oslobađanje citokina i kemokina te proizvodnju reaktivnih posrednika kisika i dušika.

Temeljem navedenog mjerenje razine upalnih citokina, biokemijskih i hematoloških odrednica u serumu uključujući broj leukocita, diferencijalnu analizu krvi, C-reaktivne proteine te enzime kao pokazatelje oštećenja organa te mjerenje težine organa poslužiti će nam kao pokazatelji upalnog/protuupalnog odgovora flavonoida u osteoporozi.

4.2.1. Rezultati hematoloških i biokemijskih pokazatelja u punoj krvi i serumu

4.2.2. Hematološki pokazatelji u krvi

Od hematoloških parametara određivan je broj etrirocita (E), koncentracija hemoglobina (Hb), hematokrit (Hct), broj leukocita (L), broj trombocita (Trc) (Tablice 15) i morfološko diferenciranje krvnog razmaza (Tablica 16, Slika 42).

Analizom rezultata hematoloških parametara vidljiv je statistički značajan porast broja eritrocita kod zdrave kontrolne skupine u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,05$) (Tablica 15); statistički značajan porast vrijednosti hematokrita kod zdrave kontrolne skupine u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,05$); statistički značajan porast broja leukocita kod skupina obrađenih proantocijanidinima i alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) ($P < 0,05$); statistički značajan porast broja trombocita kod skupina obrađenih proantocijanidinom u odnosu na skupinu obrađenu ikarinom ($P < 0,05$).

Tablica 15. Učinak flavonoida ili alendronata na hematološke pokazatelje u krvi RMO štakora

Skupine[a]	**Hematološki pokazatelji (X ± SD)**								
	L (10^9 L^{-1})	**E (10^{12} L^{-1})**	**Hgb (g L^{-1})**	**Hct (L L^{-1})**	**MCV (fL)**	**MCH (pg)**	**MCHC (g L^{-1})**	**RDW (%)**	**Trc (10^9 L^{-1})**
Zdr. Kontr.	2,70±1,17	7,28±0,46	145,40±12,98	0,43±0,03	60,15±1,56	19,96±0,90	332,00±9,31	15,58±0,71	729,20±77,10
13cRA	3,88±1,12	6,88±0,30	132,33±5,00	0,40±0,01	56,75±3,47	19,23±0,31	329,16±5,63	16,08±0,60	722,00±55,40
Ikarin	4,01±1,01	6,84±0,25	129,83±3,43	0,39±0,01	58,31±2,25	19,03±0,63	326,16±3,65	16,08±0,75	586,83±54,47
Naringenin	3,85±0,47	6,99±0,24	136,83±2,78	0,41±0,01	59,58±1,10	19,58±0,52	328,83±3,97	15,48±0,55	707,16±38,12
Krizin	4,51±1,33	6,72±0,20	133,66±3,66	0,40±0,01	60,15±0,90	19,90±0,31	330,00±3,28	15,43±0,49	707,16±54,02
Proantoci.	5,35±1,36♦	6,73±0,33	133,33±6,15	0,40±0,02	60,03±1,64	19,80±0,39	330,00±5,79	15,11±0,77	752,00±71,02Δ
Kvercetin	4,50±0,60	6,91±0,32	130,00±5,56	0,39±0,02	57,66±0,35	18,86±0,25	327,33±6,02	15,63±0,11	666,33±24,44
Alendronat 40	4,70±0,75	6,57±0,34	127,00±6,55	0,38±0,01	58,86±1,24	19,26±0,23	328,00±6,00	15,43±0,66	749,33±28,21
Alendronat 2	5,90±1,48♦	6,32±0,21♦	128,50±6,35	0,37±0,02♦	59,32±1,79	20,36±1,24	329,25±6,34	15,50±0,28	723,50±38,95

[a] Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze *ig* primjenom 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana, štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom slijedećih 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SD.

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

Δ Statistički značajno različito u odnosu na ikarin (Δ $P < 0,05$).

Kratice: L- leukociti; E - eritrociti; Hgb – hemoglobin; Hct – hematokrit; MCV- prosječni volumen eritrocita; MCH - prosječna količina hemoglobina u eritrocitu; MCHC - prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima; RDW- raspodjela eritrocita po veličini; Trc - trombociti

Diferencijalnom analizom leukocita krvi uočeno je jasno povećanje apsolutnog broja kao i postotka monocita, bazofila i eozinofila u skupini obrađenoj alendronatom u dozi od 40 i 2 mg kg^{-1} (Tablica 16, Slika 42). Nadalje, u svih skupina životinja s osteoporozom vidljivo je povećanje apsolutnog broja i postotka limfocita i neutrofila u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. Statistički značajna razlika u apsolunom broju limfocita je zapažena između zdrave kontrole i RMO skupine ($P < 0,05$) te zdrave kontrolne skupine i obrade proantocijanidinima ($P < 0,05$). Apsolutni broj neutrofila je statistički značajno veći u skupini obrađenoj ikarinom i proantocijanidinom u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) ($P < 0,01$).

U Tablici 16 vidljiva je statistički značajna razlika u % neutrofila u životinja obrađenih s alendronatom (40 i 2 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$; $P < 0,05$). Također, statistički značajna razlika postoji u postotku neutrofila u skupini obrađenoj alendronatom (40 i 2 mg kg^{-1}) ($P < 0,01$; $P < 0,01$) i proantocijanidinima ($P < 0,05$) u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom.

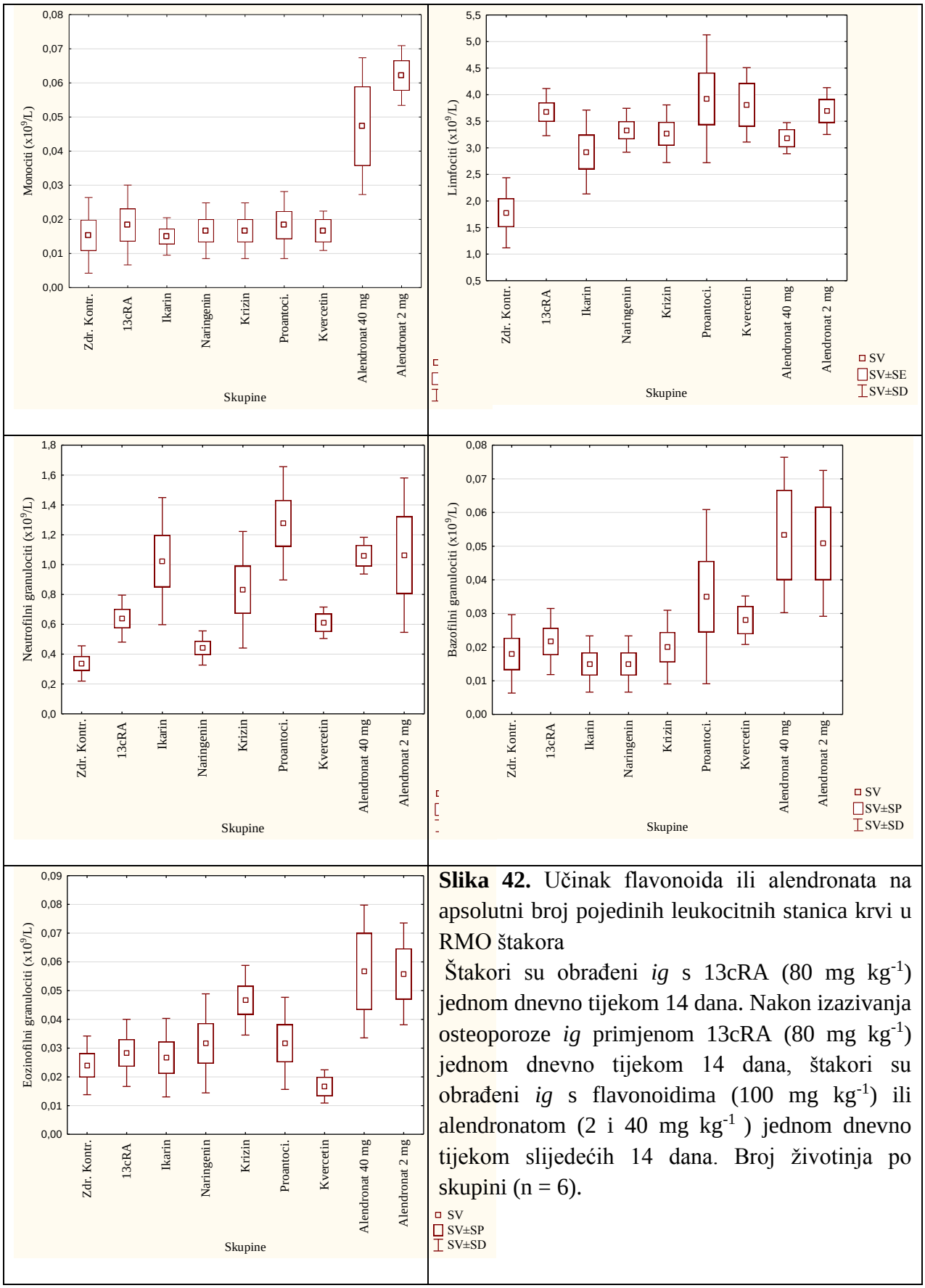
Tablica 16. Učinak flavonoida ili alendronata na diferencijalnu krvnu sliku u RMO štakora

Skupine[a]	Diferencijalna krvna slika (X ± SD)				
	Limfociti (%)	**Monociti (%)**	**Neutrofili (%)**	**Bazofili (%)**	**Eozinofili (%)**
Zdr. Kontr.	79,06±7,99	0,42±0,21	13,46±2,97	0,38±0,21	0,61±0,27
13cRA	83,96±2,74	0,45±0,16	15,18±2,28	0,55±0,17	0,73±0,36
Ikarin	78,01±3,57	0,40±0,18	20,15±2,91	0,40±0,16	0,70±0,34
Naringenin	86,95±2,02	0,38±0,21	11,45±2,37	0,36±0,23	0,85±0,38
Krizin	79,55±6,86	0,36±0,22	15,33±3,29	0,46±0,15	1,05±0,25
Proantoc.	73,90±4,81	0,35±0,12	21,90±3,13[#]	0,66±0,33	0,71±0,24
Kvercetin	84,70±4,21	0,36±0,05	13,96±4,36	0,63±0,20	0,36±0,11
Alendronat 40	70,16±3,29	0,86±0,20	28,00±4,33[♦##]	1,23±0,50	0,73±0,41
Alendronat 2	70,95±3,47	1,22±0,41	25,91±3,56[♦##]	1,06±0,44	1,16±0,12

[a] Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze *ig* primjenom 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana, štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom slijedećih 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SD.

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

[#] Statistički značajno različito u odnosu na naringenin ([#]$P < 0,05$; [##]$P < 0,01$)



Slika 42. Učinak flavonoida ili alendronata na apsolutni broj pojedinih leukocitnih stanica krvi u RMO štakora

Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze *ig* primjenom 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana, štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom slijedećih 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6).

4.2.3. Biokemijski pokazatelji u krvi

Od biokemijskih pokazatelja određivana je koncentracija proteina u krvi (ukupni proteini i C-reaktivni protein (CRP)), metabolita i supstrata (glukoza, ureja, kreatinin, ukupni bilirubin), te aktivnosti enzima aspartat - aminotransferaze (AST), alanin - aminotransferaze (ALT), gama - glutamiltransferaze (GGT), alkalne fosfataze (ALP), laktat - dehidrogenaze (LDH) i amilaze (AMS) (Tablica 17). Najznačajnije promjene enzimske aktivnosti dodatno su prikazane na Slikama 43-45.

Analizom rezultata biokemijskih pokazatelja enzimske aktivnosti aspartat - aminotransferaze (AST), (Tablica 17, Slika 43) vidljiv je statistički značajan porast aktivnosti AST između RMO skupine i skupine obrađene naringeninom ($P < 0,05$). Nije vidljivo statistički značajnih razlika u enzimskoj aktivnosti alanin - aminotransferaze (ALT) gama - glutamiltransferaze (GGT) i amilaze (AMS) u krvi RMO štakora nakon obrade s flavonoidima i alendronatom (Tablica 17).

Analizom rezultata biokemijskih pokazatelja enzimske aktivnosti alkalne fosfataze (ALP) (Slika 44) vidljiv je statistički značajan porast aktivnosti ALP između RMO skupine u odnosu na skupine obrađene naringeninom ($P < 0,05$); skupine obrađene kvercetinom ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 40 mg kg^{-1} ($P < 0,01$).

Analizom rezultata biokemijskih pokazatelja enzimske aktivnosti laktat - dehidrogenaze (LDH) (Slika 45) vidljiv je statistički značajan porast aktivnosti LDH između RMO skupine u odnosu na skupine obrađene naringeninom ($P < 0,001$) i skupine obrađene proantocijanidinom ($P < 0,01$). Jednako tako vidljiv je statistički značajan porast aktivnosti LDH između skupine obrađene alendronatom 2 mg kg^{-1} u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$).

Rezultati mjerenja koncentracije ukupnog bilirubina i ureje (Tablica 18) nisu pokazali značajne promjene između skupina. U odnosu na zdravu kontrolnu skupinu obrada životinja s naringeninom polučila je statistički značajan ($P < 0,05$) pad kretinina u životinja s osteoporozom dok je obrada s alendronatom (2 mg kg^{-1}) dovela do povećanje koncentracije glukoze ($P < 0,05$).

Iz Tablice 18 vidljiv je statistički značajan porast koncentracija ukupnih proteina kod RMO skupine u odnosu na skupinu obrađenu ikarinom ($P < 0,05$) i skupine obrađene proantocijanidom u donosu na skupinu obrađenu ikarinom ($P < 0,01$) i skupinu obrađenu alendronatom 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$). Rezultati mjerenja C-reaktivnih proteina (CRP) (Tablica 18) ne pokazuju nikakve promjene između skupina.

4.2.3a. Aktivnost enzima u krvi

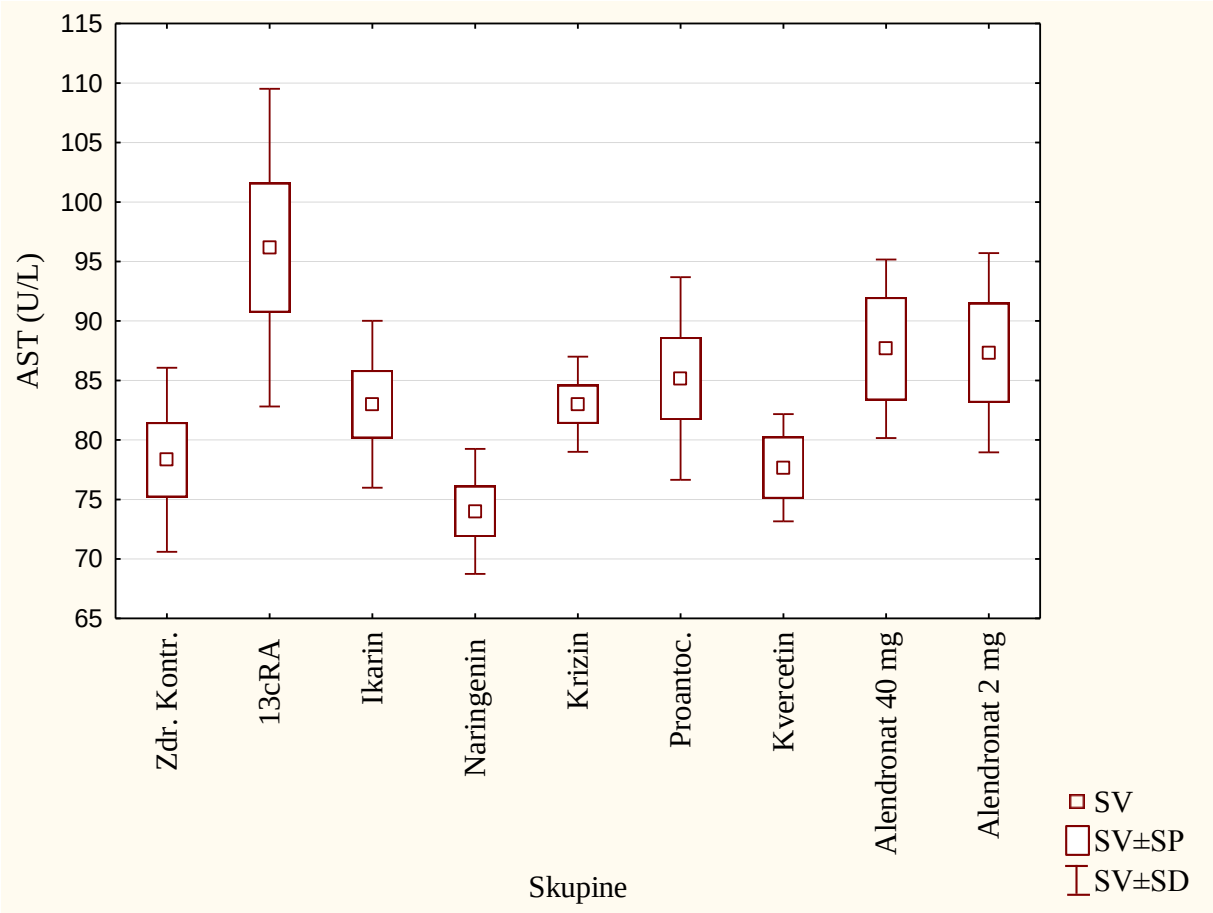
Tablica 17. Učinak flavonoida ili alendronata na enzimske biokemijske pokazatelje u krvi RMO štakora

Skupine[a]	**Biokemijski pokazatelji-enzimi (X ± SD)**					
	AST (U L^{-1})	**ALT (U L^{-1})**	**ALP (U L^{-1})**	GGT (**U L^{-1})**	**LDH (U L^{-1})**	**Amilaza (U L^{-1})**
Zdr. Kontr.	78,33±7,73	46,40±9,52	170,13±24,54	0,00±0,00	464,50±130,97	1751,00±609,96
13cRA	96,16±13,34	43,16±4,66	224,00±15,01	0,66±0,51	725,66±157,59	2046,16±213,69
Ikarin	83,00±7,01	51,16±5,19	164,00±20,36	0,33±0,51	385,83±65,98	1549,66±397,01
Naringenin	74,00±5,25*	41,00±3,89	147,50±30,09*	0,33±0,51	201,50±97,65***	1897,00±311,35
Krizin	83,00±4,00	41,00±4,19	186,33±45,60	0,16±0,40	325,16±121,79	1912,16±510,88
Proantoci.	85,16±8,51	42,40±6,94	186,66±26,01	0,33±0,51	286,50±45,85**	1831,66±247,39
Kvercetin	77,66±4,50	38,00±3,60	139,66±12,05*	0,33±0,57	422,00±58,02	2032,66±131,95
Alendronat 40 mg	87,66±7,50	42,00±2,64	115,00±12,00**	0,33±0,57	402,00±122,74	2184,00±419,06
Alendronat 2 mg	87,33±8,37	47,00±4,54	179,33±17,82	0,00±0,00	527,66±116,67[#]	2161,33±535,76

[a] Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze *ig* primjenom 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana, štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom slijedećih 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SD.

[*] Statistički značajno različito u odnosu na 13cRA ($^{*}P < 0,05$; $^{**}P < 0,001$; $^{***}P < 0,001$); [#] Statistički značajno različito u odnosu na naringenin ($^{\#}P < 0,05$);

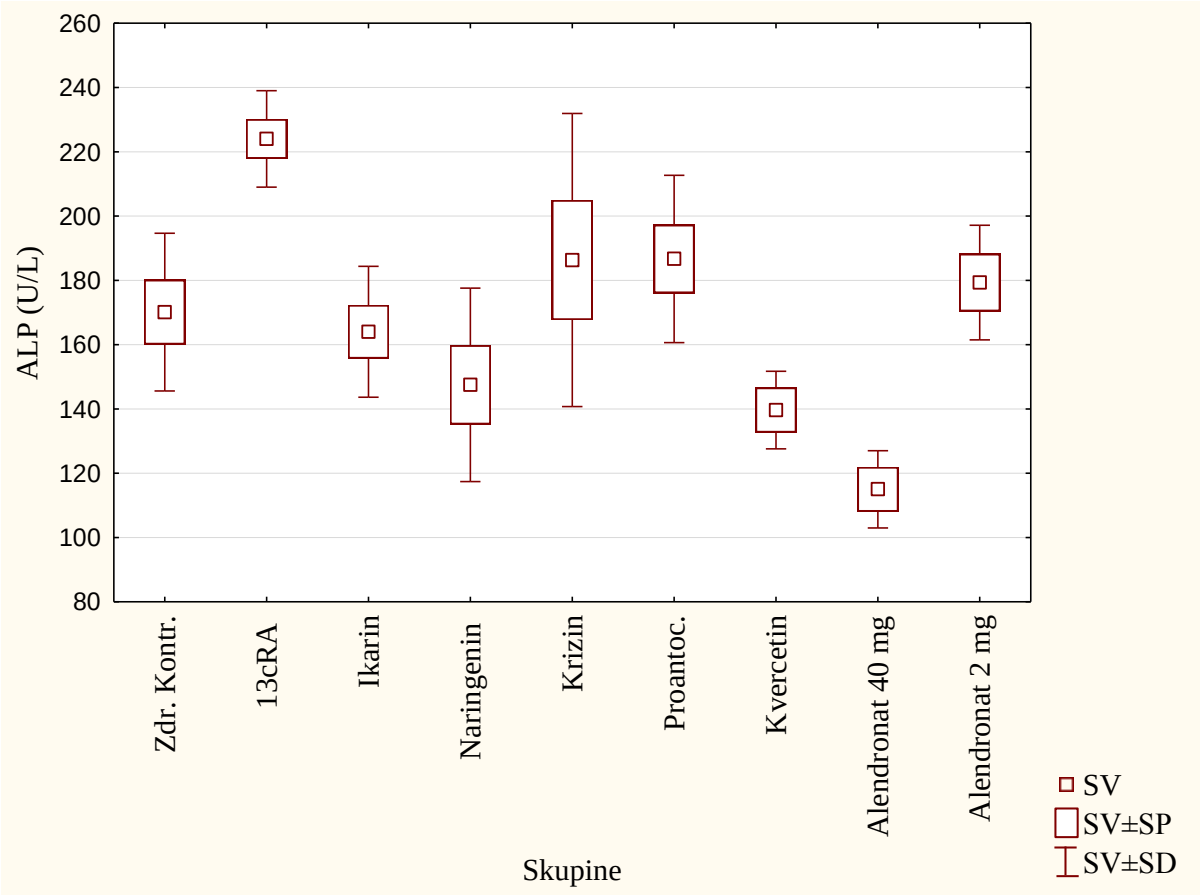
Kratice: AST - aspartat aminotransferaza; ALT - alanin aminotransferaza; ALP - alkalna fosfataza; LDH - laktat dehidrogenaza; GGT - glutamiltransferaza



Slika 43. Učinak flavonoida ili alendronata na enzimsku aktivnost aspartat - aminotransferaze (AST) u krvi RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze *ig* primjenom 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana, štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom slijedećih 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

13cRA *vs* Naringenin ($P < 0,05$)

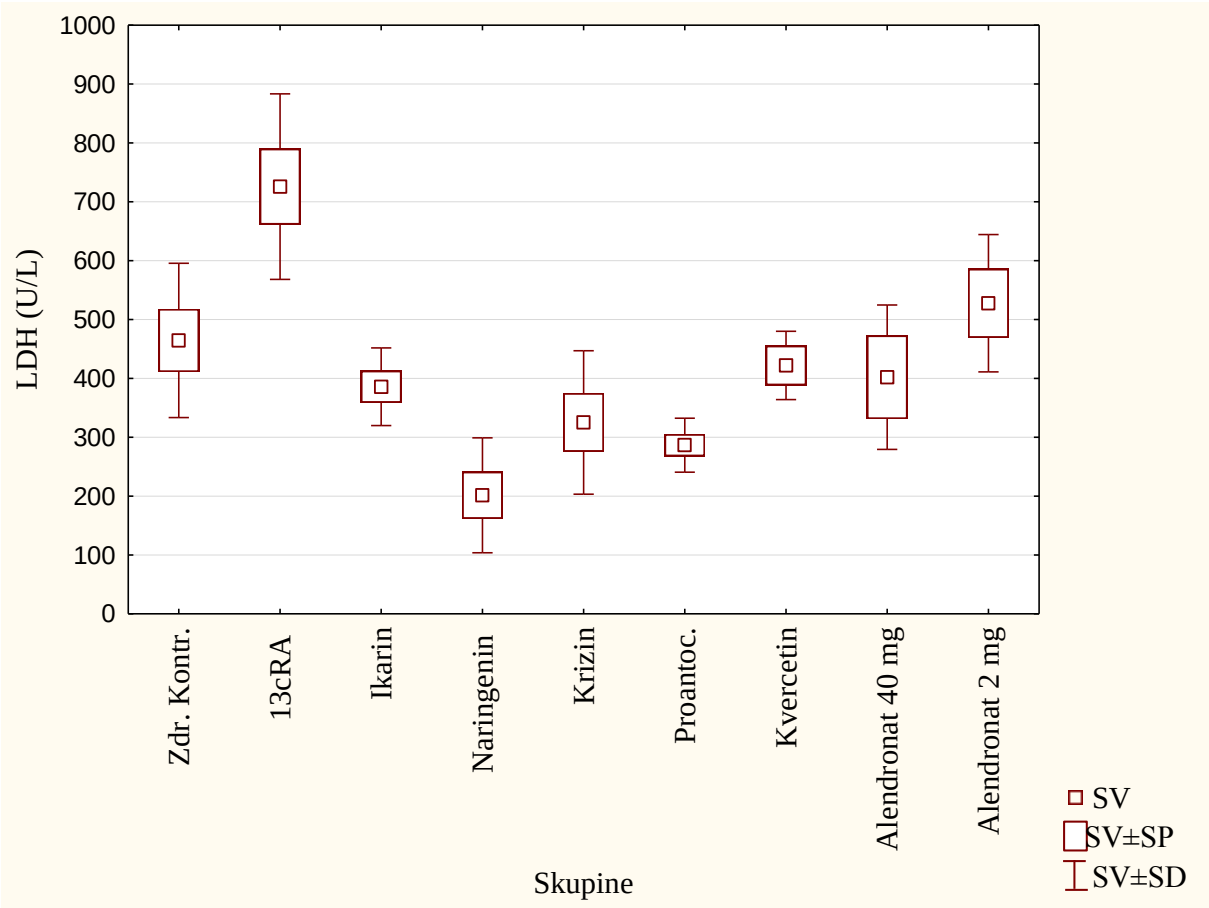
Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; AST - aspartat aminotransferaza; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD- standardna devijacija



Slika 44. Učinak flavonoida ili alendronata na alkalne fosfataze (ALP) u krvi RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze *ig* primjenom 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana, štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom slijedećih 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

13cRA *vs* Naringenin ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Kvercetin ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,01$)

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



Slika 45. Učinak flavonoida ili alendronata na enzimsku aktivnost laktat - dehidrogenaze (LDH) u krvi RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze *ig* primjenom 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana, štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom slijedećih 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

13cRA *vs* Naringenin (P < 0,001); 13cRA *vs* Proantocijanidin (P < 0,01); Naringenin *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} (P < 0,05)

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

4.2.3b. Proteini, metaboliti i supstrati

Tablica 18. Učinak flavonoida ili alendronata na metabolite, proteine i supstrate u krvi RMO štakora

Skupine[a]	**Biokemijski pokazatelji – proteini, metaboliti i supstrati (X ± SD)**					
	TP ($g\ L^{-1}$)	**CRP ($mg\ L^{-1}$)**	**GLU ($mmol\ L^{-1}$)**	**UREA ($mmol\ L^{-1}$)**	**Kreatinin ($\mu mol\ L^{-1}$)**	**Ukupni bilirubin ($mmol\ L^{-1}$)**
Zdr. Kontr.	53,66±1,36	0,08±0,04	13,96±0,68	6,26±1,01	36,33±4,17	2,33±0,81
13cRA	56,00±1,41	0,11±0,04	17,28±1,74	5,65±0,78	32,50±2,16	2,83±0,40
Ikarin	50,00±2,96*◊◊	0,03±0,05	15,58±1,04	6,00±0,67	33,00±2,75	2,16±0,75
Naringenin	53,66±1,50	0,10±0,00	16,48±1,38	5,50±0,52	27,66±1,63♦	3,00±0,00
Krizin	54,00±2,09	0,06±0,05	16,61±1,41	6,65±0,44	34,16±3,18	2,667±0,51
Proantoci.	56,66±1,75	0,10±0,00	16,56±1,57	6,01±0,59	33,66±5,64	2,66±0,51
Kvercetin	53,33±0,57	0,06±0,05	14,60±1,65	5,66±0,30	30,33±2,08	2,66±0,57
Alendronat 40 mg	51,66±4,04	0,10±0,00	17,93±1,53	6,76±0,37	35,00±4,00	2,66±0,57
Alendronat 2 mg	49,75±4,03◊	0,07±0,00	18,87±2,51♦♦	6,07±1,05	27,75±6,50	3,00±0,00

[a] Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 $mg\ kg^{-1}$) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze *ig* primjenom 13cRA (80 $mg\ kg^{-1}$) jednom dnevno tijekom 14 dana, štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 $mg\ kg^{-1}$) ili alendronatom (2 i 40 $mg\ kg^{-1}$) jednom dnevno tijekom slijedećih 14 dana. Broj životinja po skupini (n = 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SD.

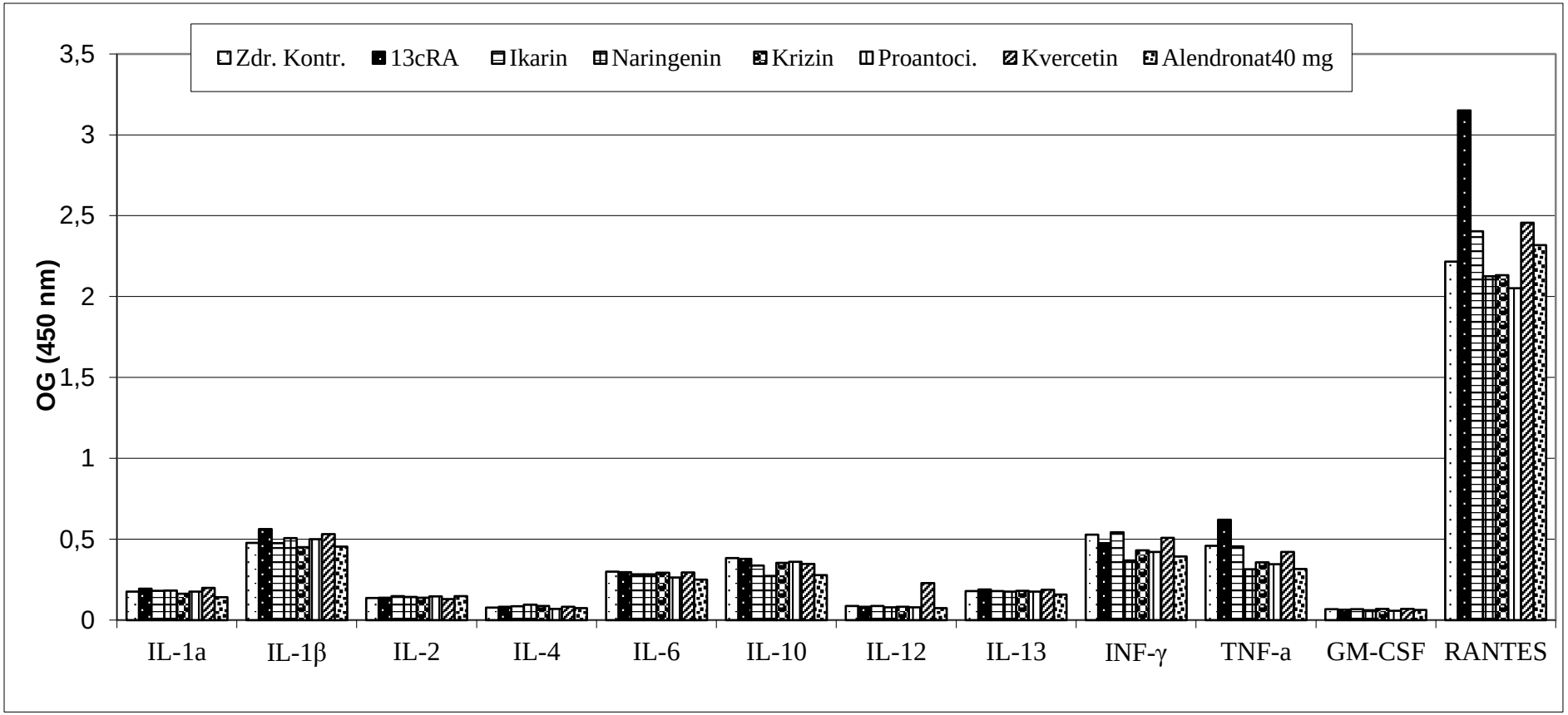
♦ Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (♦$P < 0,05$; ♦♦ $P < 0,01$); * Statistički značajno različito u odnosu na 13cRA (*$P < 0,05$);

◊ Statistički značajno različito u odnosu na proantoci. (◊$P < 0,05$; ◊◊$P < 0,01$)

Kratice: TP - total protein; CRP - C-reaktivni proteini; GLU – glukoza

4.2.4. Razina upalnih citokina u serumu

Iz rezultata mjerenja razine upalnih citokina u serumu (Slika 46) vidljiv je izražen porast razine upalnih citokina kod RMO skupine, među kojima je najizraženiji porast RANTES kemokina. Također je izraženiji porasti TNF-α, i IL-1β, kod RMO skupine. Među skupinama obrađenim flavonoidima zapažena je snižena razina RANTES kemokina, TNF-α, i IL-1β te porast IL-12 kod skupine obrađene kvercetinom.



Slika 46. Učinak flavonoida ili alendronata na razinu upalnih citokina u serumu RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV. Kratice: Zdr.Kontr.- zdrava kontrola; 13cRA- RMO (retinoični model osteoporoze); Proantoci.- proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; Granulocitno-makrofagni kolono-stimulirajući faktor (GM-CSF; *engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*); RANTES (od engl. *regulated on activation and secretion normal T cell expressed*).

4.2.5. Rezultati mjerenja težine unutarnjih organa

Rezultati mjerenja težine jetre, slezene i bubrega prikazani su kao indeks težine organa i kao relativna težina organa.

4.2.5a. Indeks težine organa

Radi točnosti rezultata indeks težine organa izračunat je kao omjer težine organa i tjelesne težine svake pojedinačne životinje. Iz Tablice 19 vidljivo je statistički značajno povećanje indeksa težina jetre kod skupine obrađene naringeninom u odnosu na skupinu obrađenu proantocijanidinom ($P < 0,05$) i skupine obrađene naringeninom u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$). Nisu zapažene statistički značajne promjene indeksa težina slezena i bubrega (Tablica 19).

Tablica 19. Učinak flavonoida ili alendronata na indeks tjelesne težine organa u RMO štakora

Skupine[a]	**Indeks tjelesne težine organa**		
	Indeks težine jetre (g g^{-1})	**Indeks težine bubrega (g g^{-1})**	**Indeks težine slezene (g g^{-1})**
Zdr. Kontr.	0,0341±0,0011	0,0069±0,0003	0,0032±0,0002
13cRA	0,0332±0,0009	0,0068±0,0002	0,0033±0,0001
Ikarin	0,0359±0,0021	0,0075±0,0004	0,0038±0,0004
Naringenin	0,0323±0,0007	0,0075±0,0004	0,0034±0,0001
Krizin	0,0330±0,0019	0,0073±0,0002	0,0032±0,0004
Proantoci.	0,0368±0,0020[#]	0,0078±0,0005	0,0036±0,0002
Kvercetin	0,0334±0,0007	0,0072±0,0004	0,0034±0,0001
Alendronat 40	0,0342±0,0057	0,0067±0,0003	0,0034±0,0004
Alendronat 2	0,0384±0,0047[#]	0,0079±0,0005	0,0036±0,0004

[a]Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SD.

[#] Statistički značajno različito u odnosu na naringenin ([#]$P < 0,05$)

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

4.2.5b. Relativna težina organa

Relativne težine organa su preračunate na 100 g tjelesne težine radi točnosti rezultata s obzirom na gubitak ili pojačani prirast težine pojedinih skupina. Iz rezultata relativnih težina jetre vidljivo je statistički značajno povećanje kod skupina obrađenih proantocijanidinom i alendronatom 2 mg kg^{-1} u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$) ($P < 0,05$) (Tablica 20). Rezultati relativne težine slezene i bubrega nisu pokazali značajne promjene (Tablica 20).

Tablica 20. Učinak flavonoida ili alendronata na relativnu težinu organa u RMO štakora

Skupine[a]	Relativna težina organa		
	Relativna težina jetre (g/100 g)	**Relativna težina bubrega (g/100 g)**	**Relativna težina slezene (g/100 g)**
Zdr. Kontr.	3,41±0,12	0,70±0,03	0,33±0,03
13cRA	3,32±0,09	0,69±0,03	0,34±0,02
Ikarin	3,59±0,21	0,75±0,05	0,39±0,05
Naringenin	3,23±0,07	0,76±0,05	0,35±0,02
Krizin	3,31±0,19	0,74±0,03	0,33±0,04
Proantoci.	3,68±0,20[#]	0,78±0,06	0,37±0,02
Kvercetin	3,33±0,08	0,722±0,04	0,35±0,02
Alendronat 40	3,42±0,58	0,68±0,03	0,34±0,04
Alendronat 2	3,84±0,47[#]	0,79±0,06	0,37±0,04

Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SD.

[#] Statistički značajno različito u odnosu na naringenin ([#]$P < 0,05$)

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

4.3. PROTUOKSIDATIVNI UČINAK FLAVONOIDA

Oksidativni stres nastaje uslijed neravnoteže između povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala i nedovoljne aktivnosti protuoksidativnih sustava. Oksidativni stres (OS) karakteriziran je stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) za koje je utvrđeno da uzrokuju oštećenja brojnih biomolekula, što je povezano sa prirodnim procesom starenja kao i s mnogim kroničnim degenerativnim bolestima u koje se ubraja osteoporoza. Utvrđena je jasna poveznica između OS i osteoporoze. Opisano je kako ROS smanjuju diferencijaciju osteoblasta i povećavaju osteoklastičnu aktivnost. Tako nedostatan protuoksidativni sustav tj. loša neutralizacija ROS-a doprinosi patogenezi osteoporoze, a protuoksidansi mogu smanjiti resorpciju kosti. Kada proizvodnja slobodnih radikala nadvlada prirodne protuoksidativne mehanizme, oksidativni stres koji uslijedi može dovesti do izraženog gubitka koštane mase, fragilnosti kostura te ostalih stanja karakterističnih za osteoporozu. Nadalje, osteoklastogeneza i aktivnost osteoklasta mogu biti potaknuti primjenom brojnih lijekova uključujući 13cRA. Glavni učinci 13cRA koji pridonose gubitku koštane mase su: a) povećan oksidativni stres (OS) i stvaranje reaktivnih radikala, smanjena aktivnost osteoblasta i povećana aktivnost osteoklasta; b) smanjena razina estrogena, pojavnost upalnih citokina i aktivnost osteoklasta te apoptoza osteoblasta; c) smanjenje aktivnosti receptora vitamina D, smanjenje apsorpcije Ca^{2+} u crijevima, povećanje izlučivanja Ca bubrezima; d) učinci na paratireoidni hormon.

Temeljem navedenog protuosksidativni učinak flavonoida iskazali smo kroz mjerenje razine lipidne peroksidacije, koncentracije ukupnog glutationa (GSH), enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i enzimske aktivnosti katalaze (CAT) u uzorcima tkiva jajnika, bubrega, slezene i jetre.

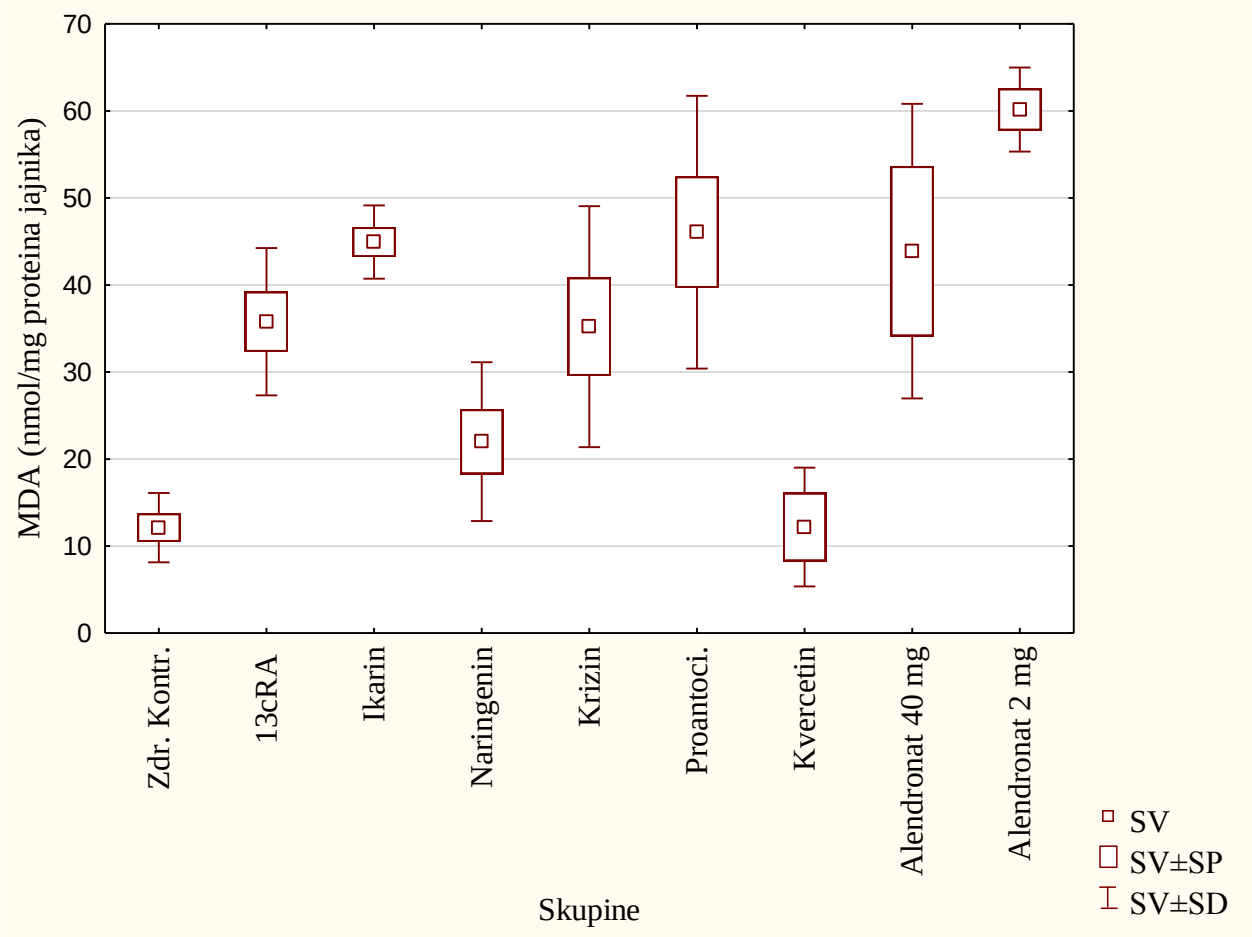
4.3.1. Vrijednosti lipidne peroksidacije jajnika, bubrega, slezene i jetre

Analizom podataka zapažena je povišena koncentracija malondialdehida (MDA) u jajniku (Slika 47) kod skupine obrađene ikarinom u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$); skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$); skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,001$); skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$) i skupinu obrađenu kvercetinom ($P < 0,05$).

U bubregu (Slika 48) obrađenih životinja zapažena je povećana vrijednost MDA kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) i skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,01$); skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$).

Analizom koncentracije MDA u slezeni (Slika 49) zapažena je statistički viša vrijednost kod skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,01$); skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$) i skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na skupinu obrađenu kvercetinom ($P < 0,05$).

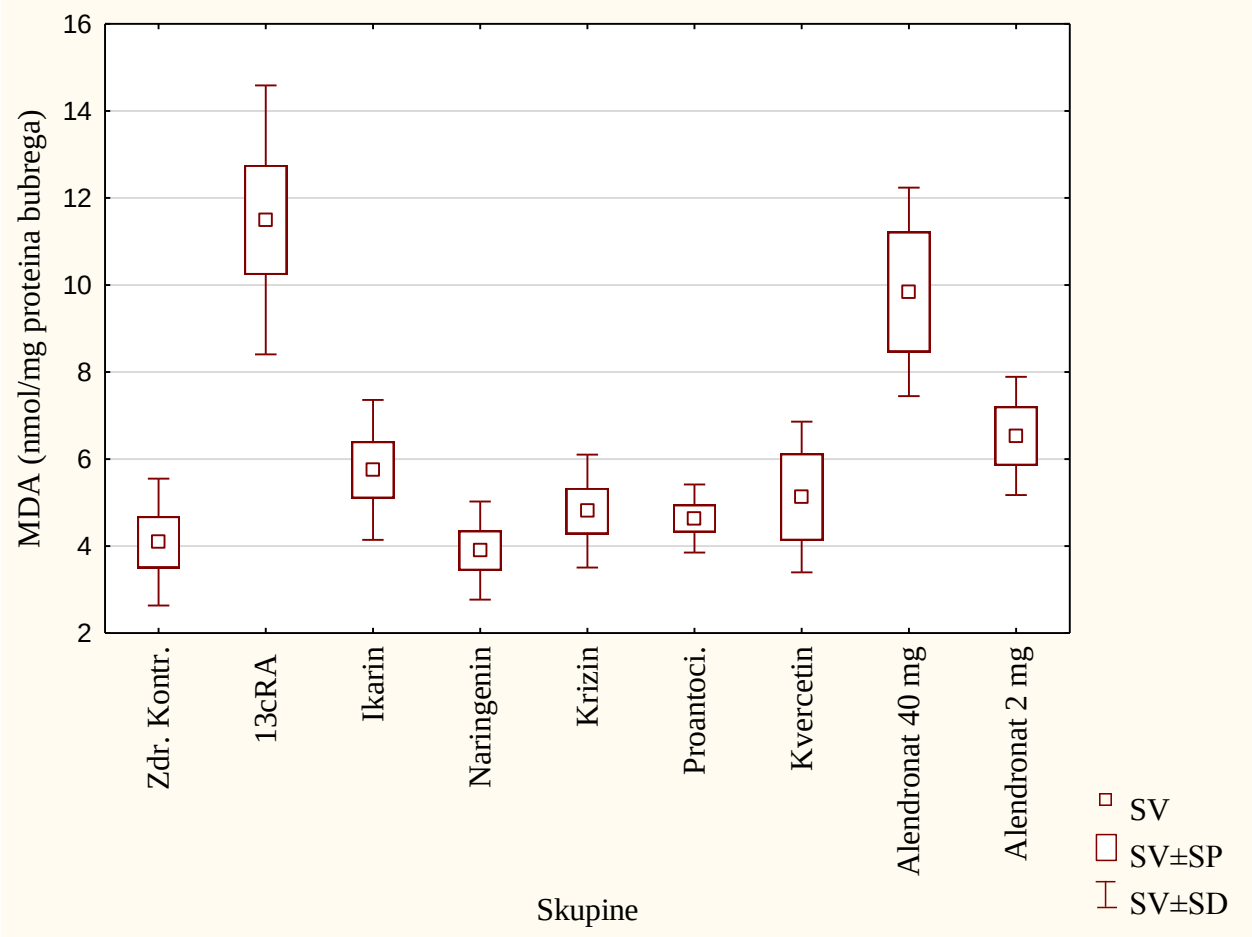
Analizom koncentracije MDA u jetri (Slika 50) zapažena je statistički viša vrijednost kod skupine obrađene krizinom u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$); skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$); skupine obrađene alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,01$) i skupine obrađene alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu kvercetinom ($P < 0,05$).



Slika 47. Učinak flavonoida ili alendronata na koncentraciju malondialdehida (MDA) jajnika u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Zdr. Kontr. *vs* Ikarin ($P < 0,05$); Zdr. Kontr. *vs* Proantoci. ($P < 0,05$); Zdr. Kontr. *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,001$); Naringenin *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); Kvercetin *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$)

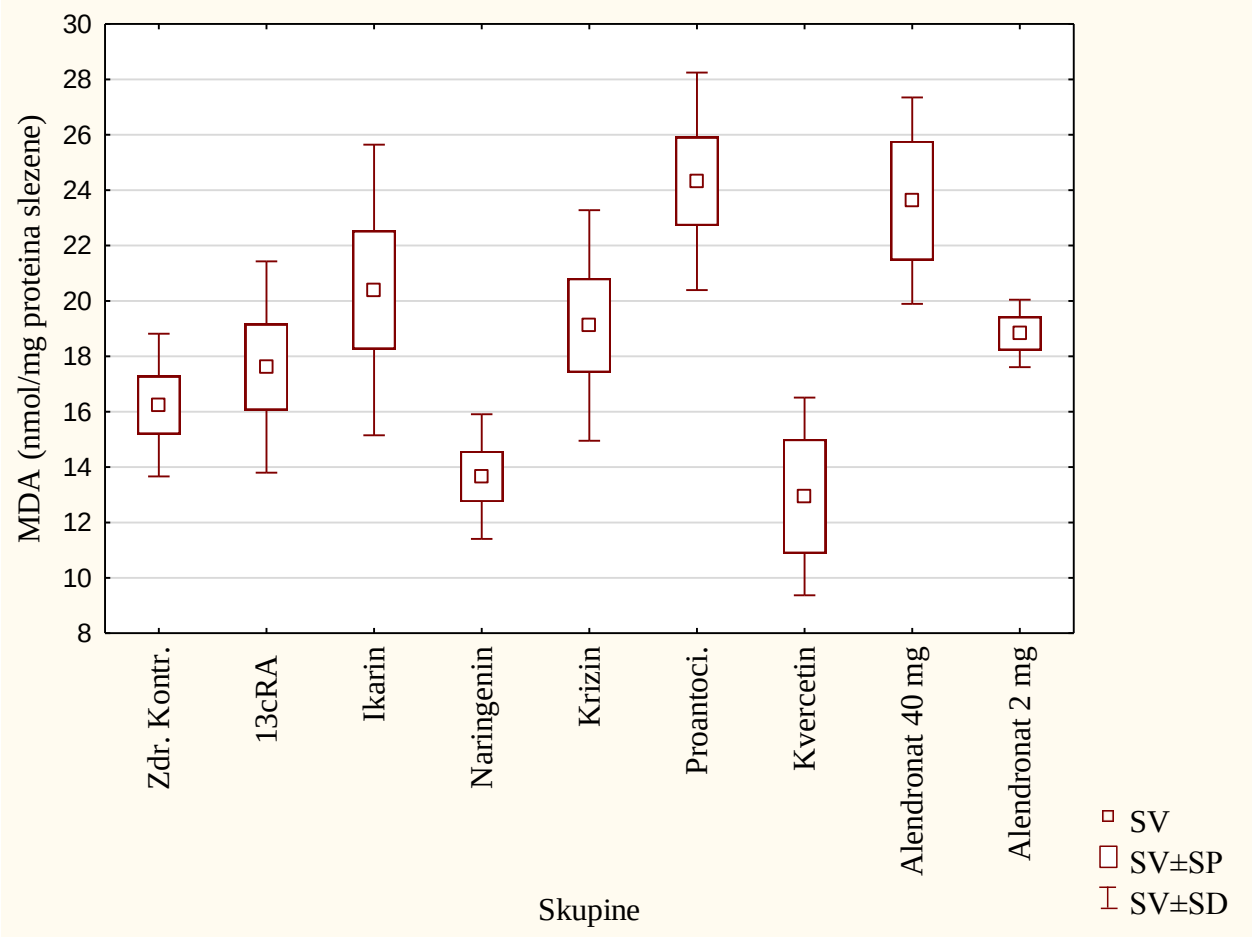
Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD - standardna devijacija



Slika 48. Učinak flavonoida ili alendronata na koncentraciju malondialdehida (MDA) bubrega u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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

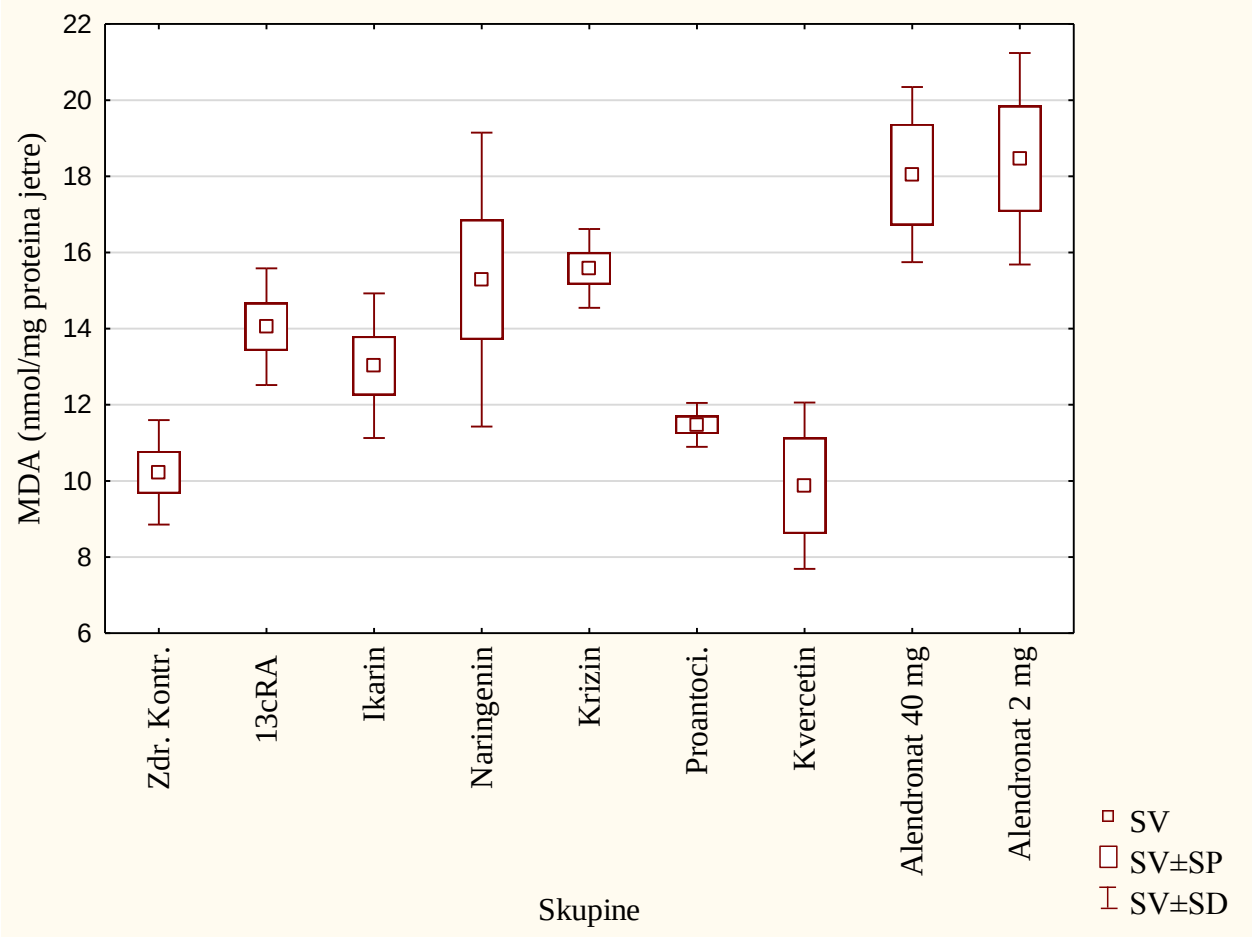
Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD - standardna devijacija



Slika 49. Učinak flavonoida ili alendronata na koncentraciju malondialdehida (MDA) slezene u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Naringenin *vs* Proantoci. ($P < 0,01$); Naringenin *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} (P 0,05); Kvercetin *vs* Proantoci. ($P < 0,05$)

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



Slika 50. Učinak flavonoida ili alendronata na koncentraciju malondialdehida (MDA) jetre u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Zdr. Kontr. *vs* Krizin ($P < 0,05$); Zdr. Kontr. *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); Zdr. Kontr. *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,01$); Kvercetin *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$)

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

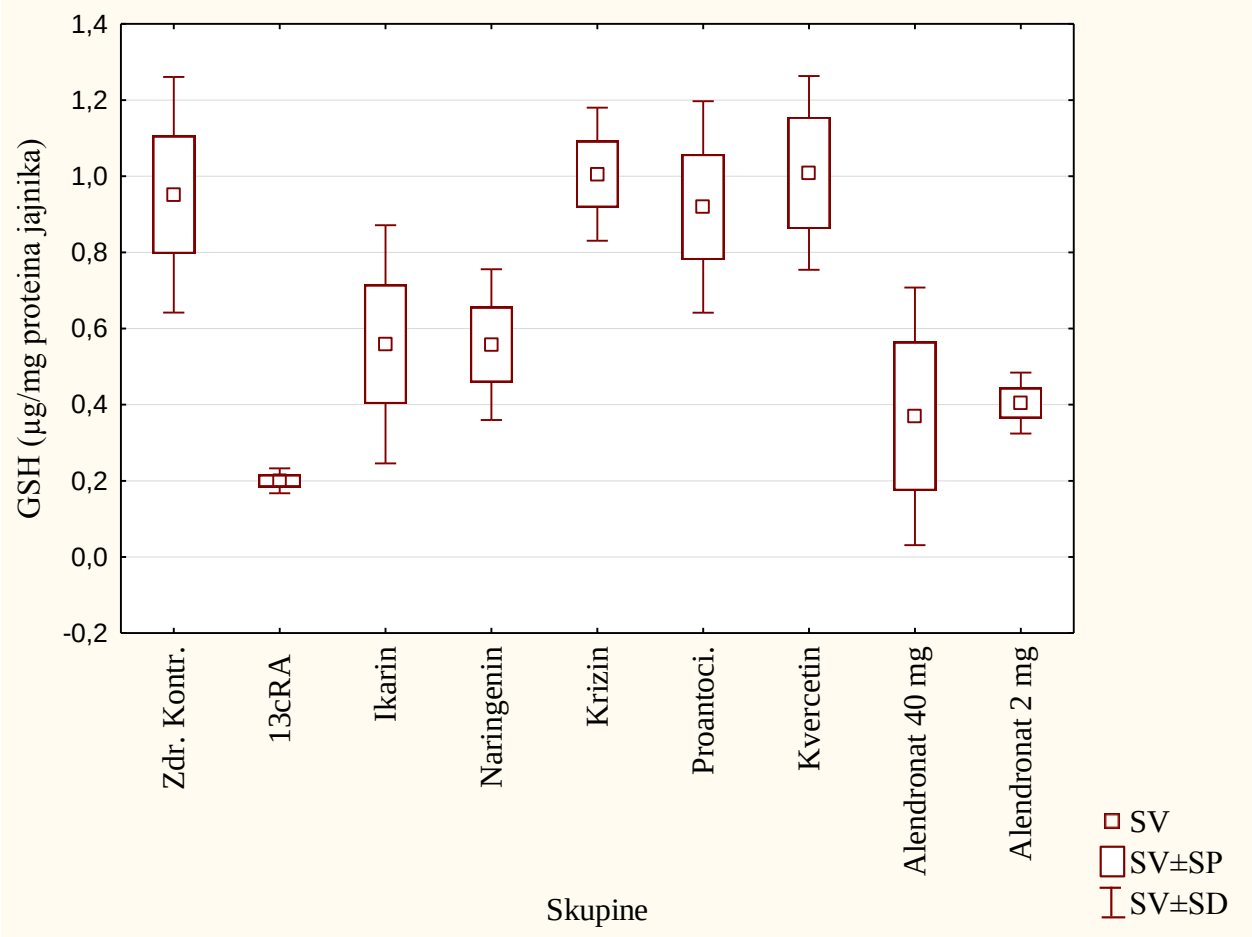
4.3.2. Vrijednosti ukupnog glutationa (GSH) jajnika, bubrega, slezene i jetre

Analizom podataka koncentracije glutationa (GSH) u jajnicima obrađenih životinja (Slika 51) vidljiva je statistički značajno snižena vrijednost GSH kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,01$) i skupine obrađene krizinom ($P < 0,01$) i kvercetinom ($P < 0,05$).

Analizom podataka koncentracije glutationa (GSH) u bubrezima obrađenih životinja (Slika 52) vidljiva je statistički značajno snižena vrijednost GSH kod RMO skupine u odnosu na skupine obrađene naringeninom ($P < 0,01$), alendronatom (40 mg kg^{-1}) ($P < 0,01$) i alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,01$).

Podatci dobiveni analizom slezene (Slika 53) pokazuju statistički značajno višu koncentraciju GSH kod skupine obrađene Ikarinom u odnosu na skupine obrađene kvercetinom ($P < 0,01$) i alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,05$).

Statistički značajno viša koncentracija GSH zapažena je analizom podataka dobivenih iz jetrenih uzoraka (Slika 54) kod skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,05$).

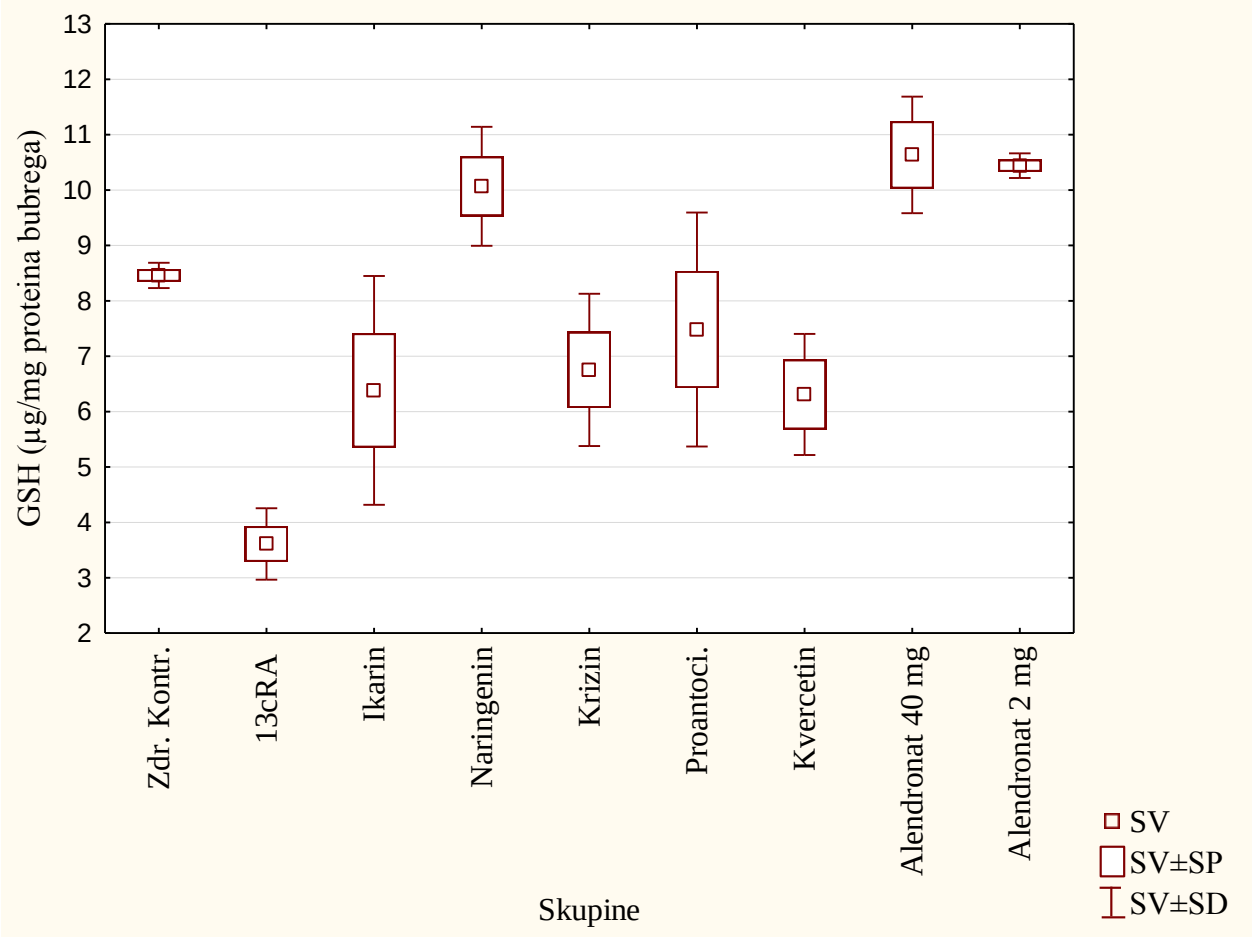


Slika 51. Učinak flavonoida ili alendronata na koncentraciju glutationa (GSH) jajnika u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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

Kvercetin *vs* 13cRA ($P < 0,05$)

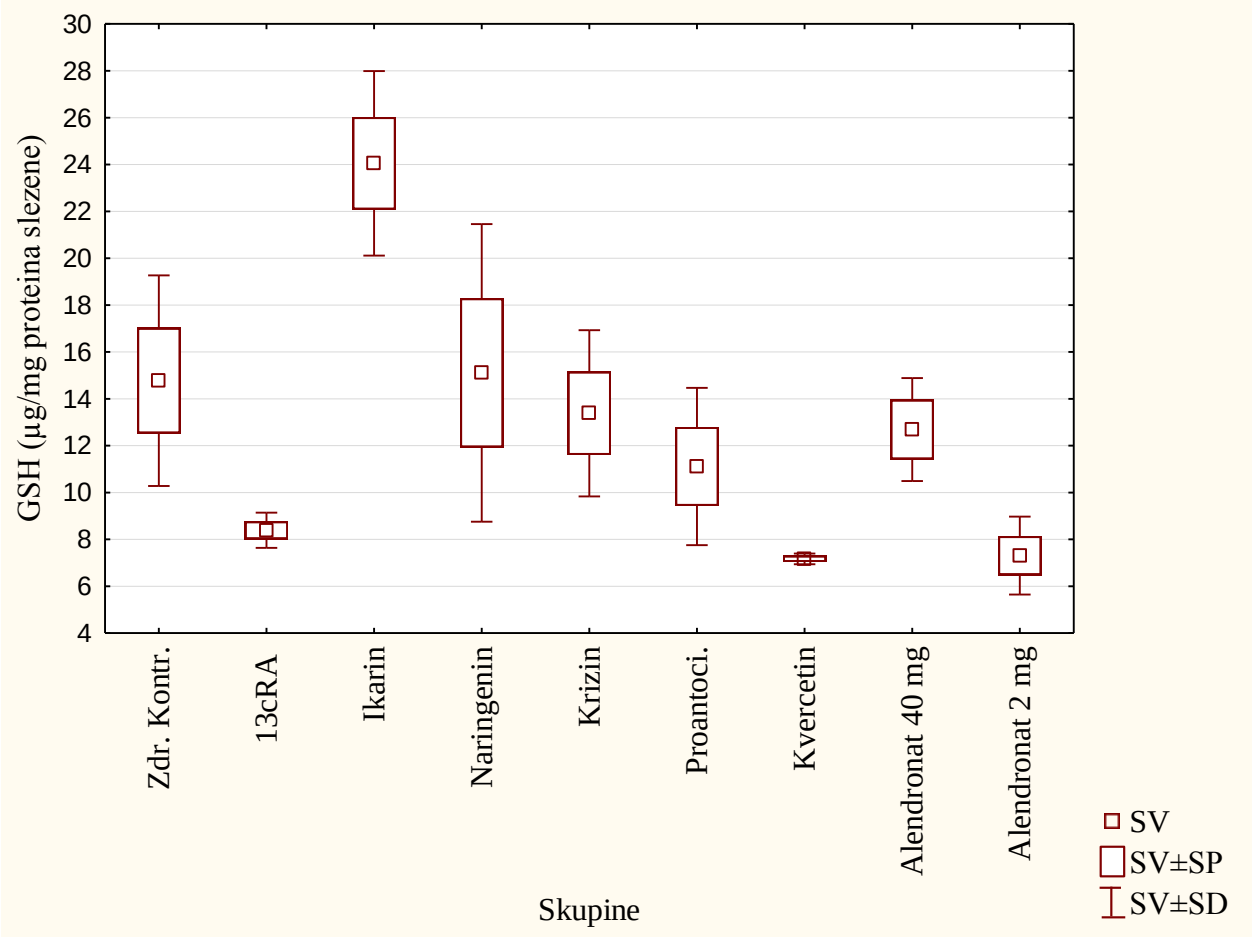
Kratice: Zdr.Kontr.- zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci.- proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD- standardna devijacija



Slika 52. Učinak flavonoida ili alendronata na koncentraciju glutationa (GSH) bubrega u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Naringenin *vs* 13cRA ($P < 0,01$); Alendronat 40 mg kg^{-1} *vs* 13cRA ($P < 0,01$); Alendronat 2 mg kg^{-1} *vs* 13cRA ($P < 0,01$)

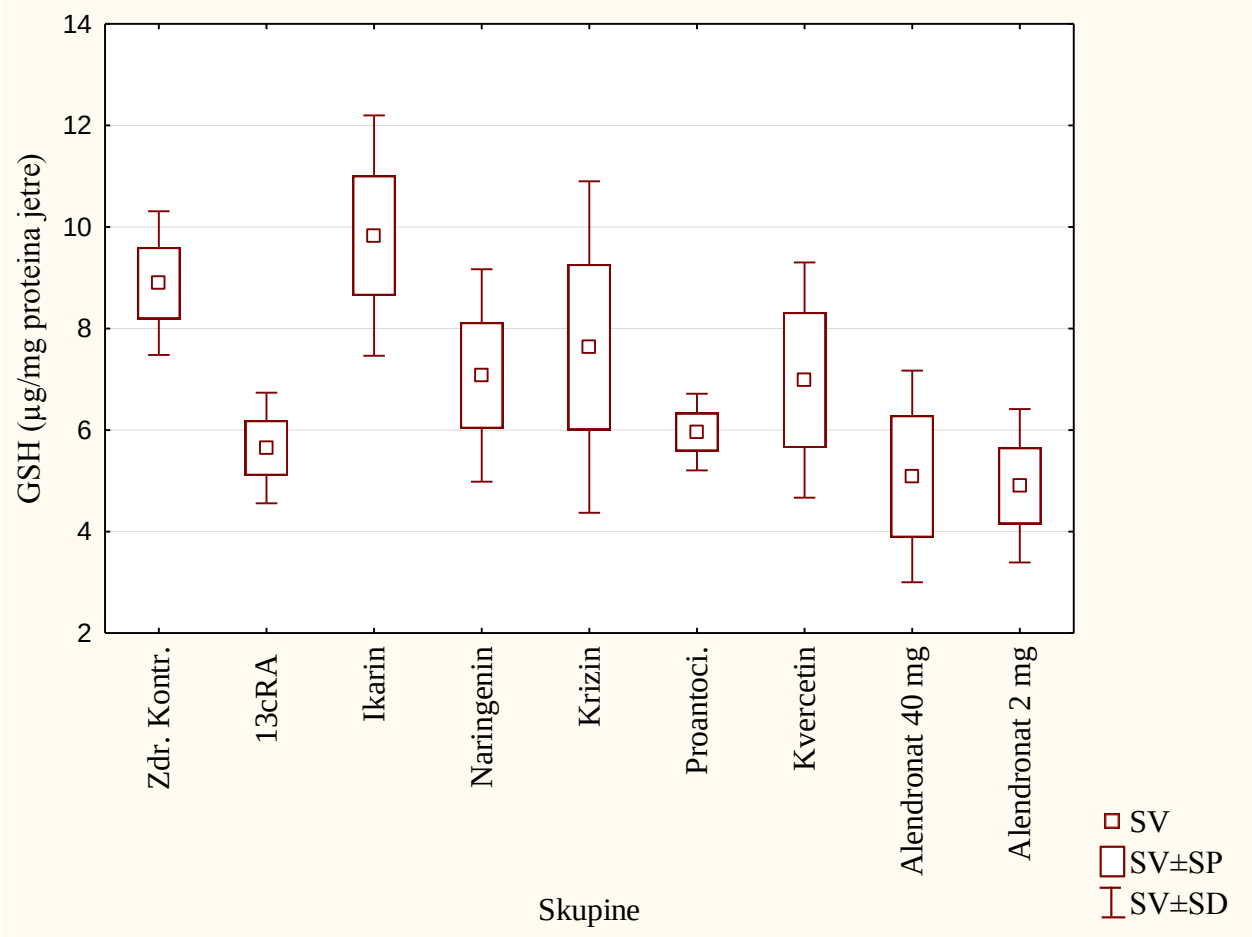
Kratice: Zdr.Kontr.- zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci.- proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD- standardna devijacija



Slika 53. Učinak flavonoida ili alendronata na koncentraciju glutationa (GSH) slezene u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV±SP.

Ikarin *vs* Kvercetin ($P < 0,01$); Ikarin *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$)

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



Slika 54. Učinak flavonoida ili alendronata na koncentraciju glutationa (GSH) jetre u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Ikarin *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$)

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

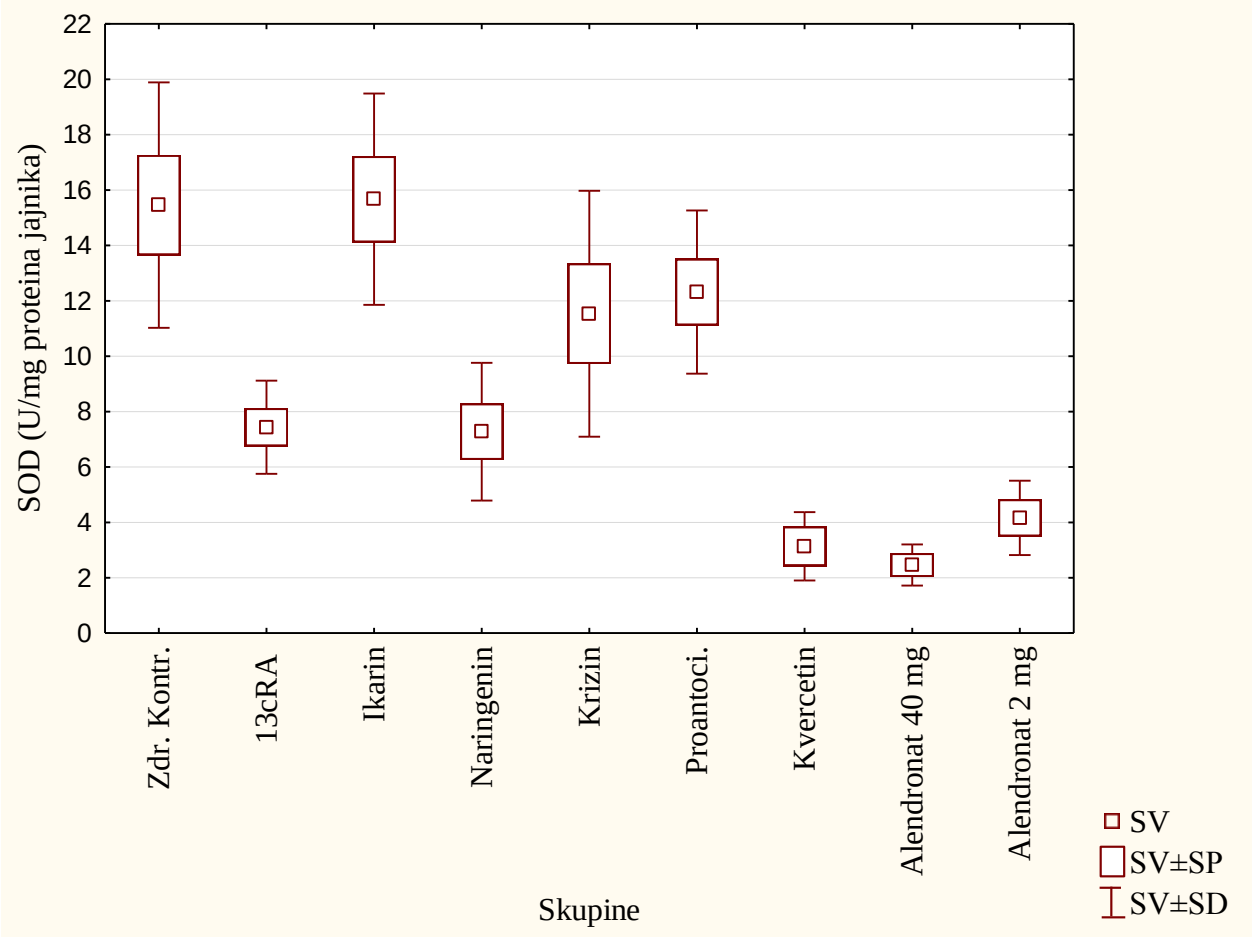
4.3.3. Vrijednosti enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) jajnika, bubrega, slezene i jetre

Analizom podataka uzoraka jajnika (Slika 55) utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) kod zdrave kontrolne skupine u odnosu na skupinu obrađenu kvercetinom ($P < 0,05$); zdrave kontrolone skupine u odnosu na skupine obrađene alendronatom 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$) i alendronatom 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$). Također je vidljiv statistički značajan porast enzimske aktivnosti kod skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupine obrađene kvercetinom ($P < 0,05$), alendronatom 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$) i alendronatom 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$).

Analizom podataka enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) uzoraka bubrega kod RMO štakora nakon obrade s flavonoidima i alendronatom (Slika 56) nema vidljive statistički značajne razlike u enzimskoj aktivnosti među skupinama.

Analizom podataka enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) uzoraka slezene kod RMO štakora nakon obrade s flavonoidima i alendronatom (Slika 57) nema vidljive statistički značajne razlike u enzimskoj aktivnosti među skupinama, osim zabilježene povišene enzimske aktivnosti između skupina obrađenih ikarinom i proantocijanidinom ($P < 0,05$) .

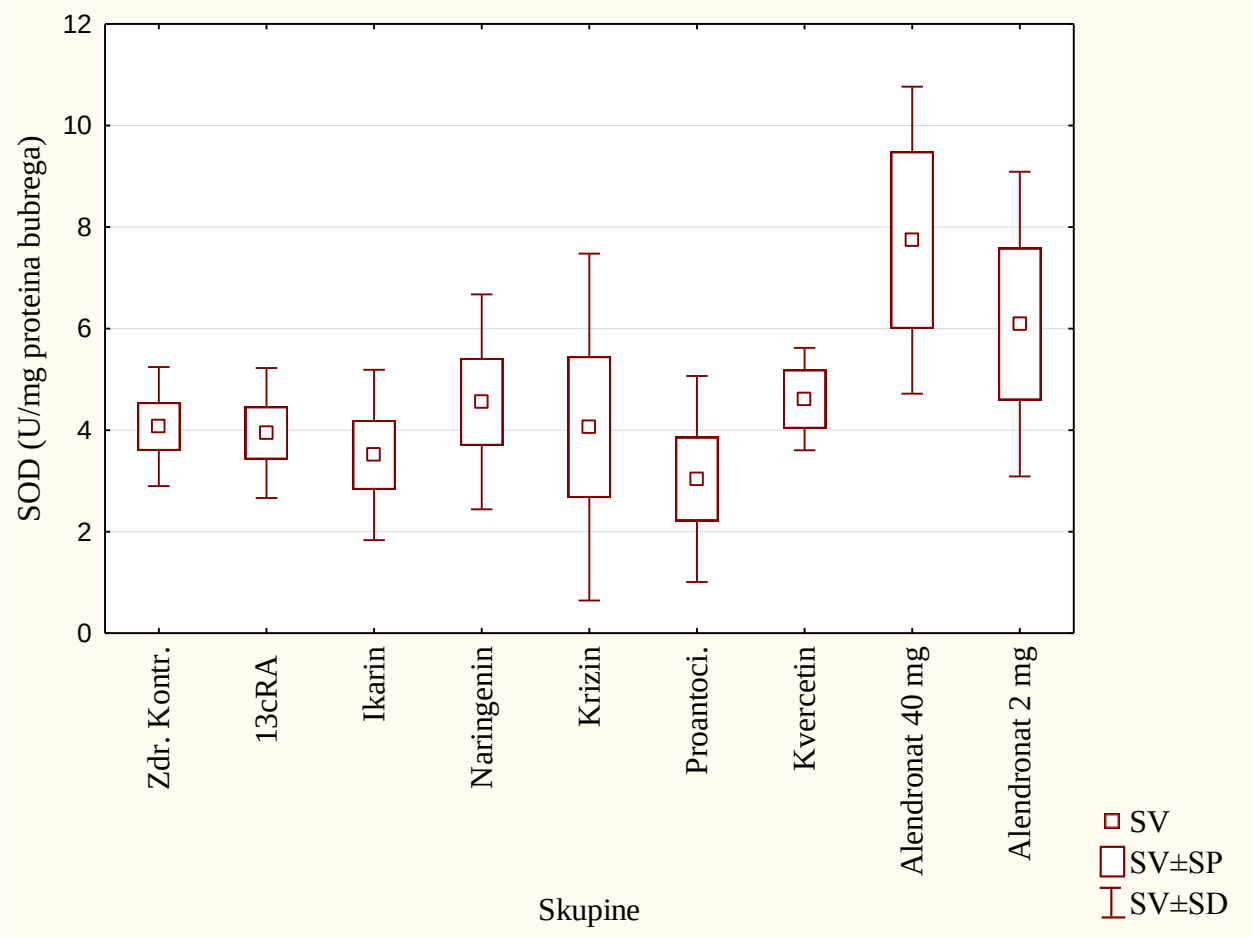
Analizom podataka uzoraka jetra (Slika 58) utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) kod skupina obrađenih ikarinom ($P < 0,05$) i naringeninom ($P < 0,01$) u odnosu na RMO skupinu. Također je zabilježen porast enzimske aktivnosti kod skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupinu obrađenu proantocijanidinom ($P < 0,05$) i skupine obrađene naringeninom u odnosu na skupinu obrađenu proantocijanidinom ($P < 0,05$).



Slika 55. Učinak flavonoida ili alendronata na razinu enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) jajnika u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

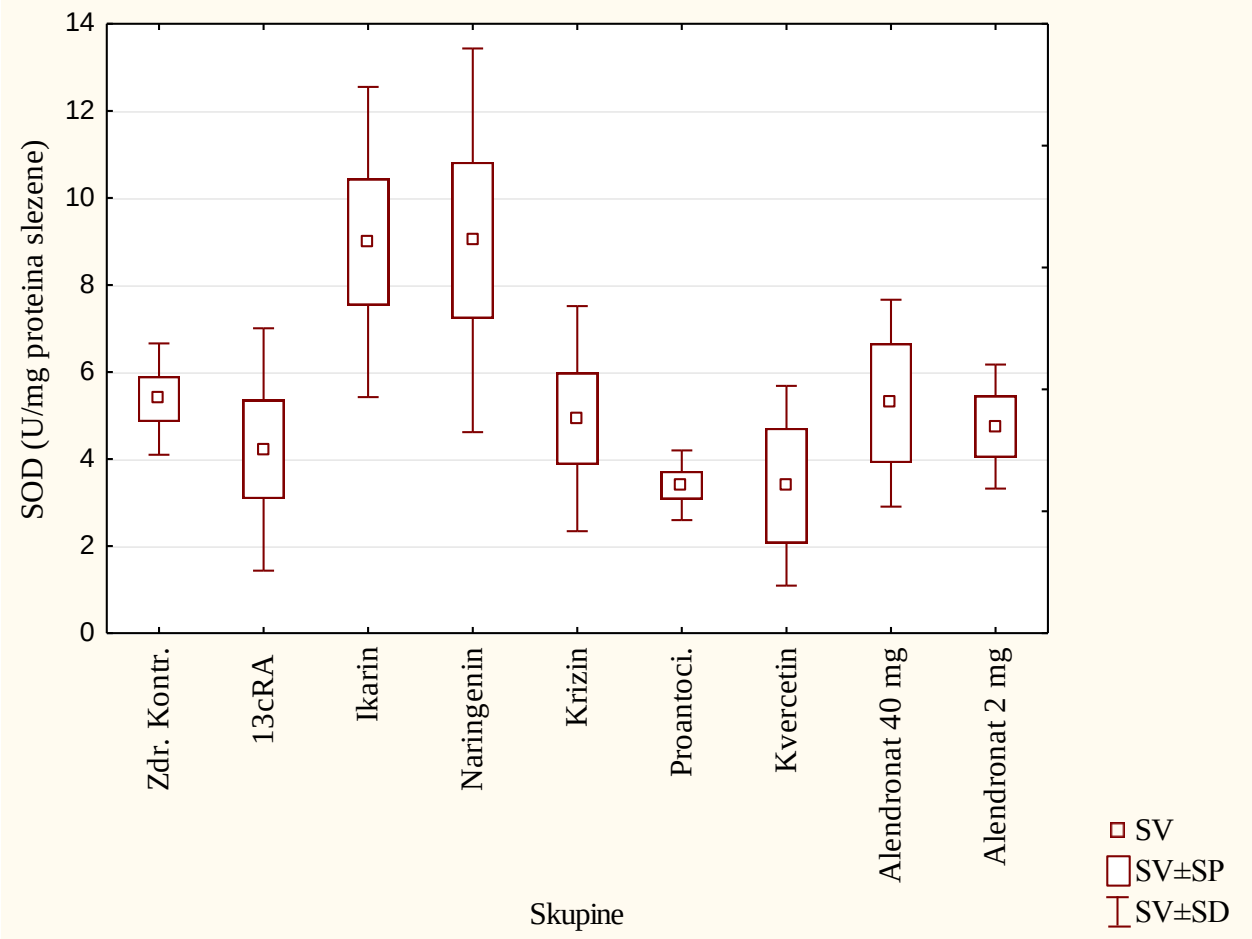
Zdr. Kontr. *vs* Kvercetin ($P < 0,05$); Zdr. Kontr. *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); Zdr. Kontr. *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); Ikarin *vs* Kvercetin ($P < 0,05$); Ikarin *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); Ikarin *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$)

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



Slika 56. Učinak flavonoida ili alendronata na razinu enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) bubrega u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

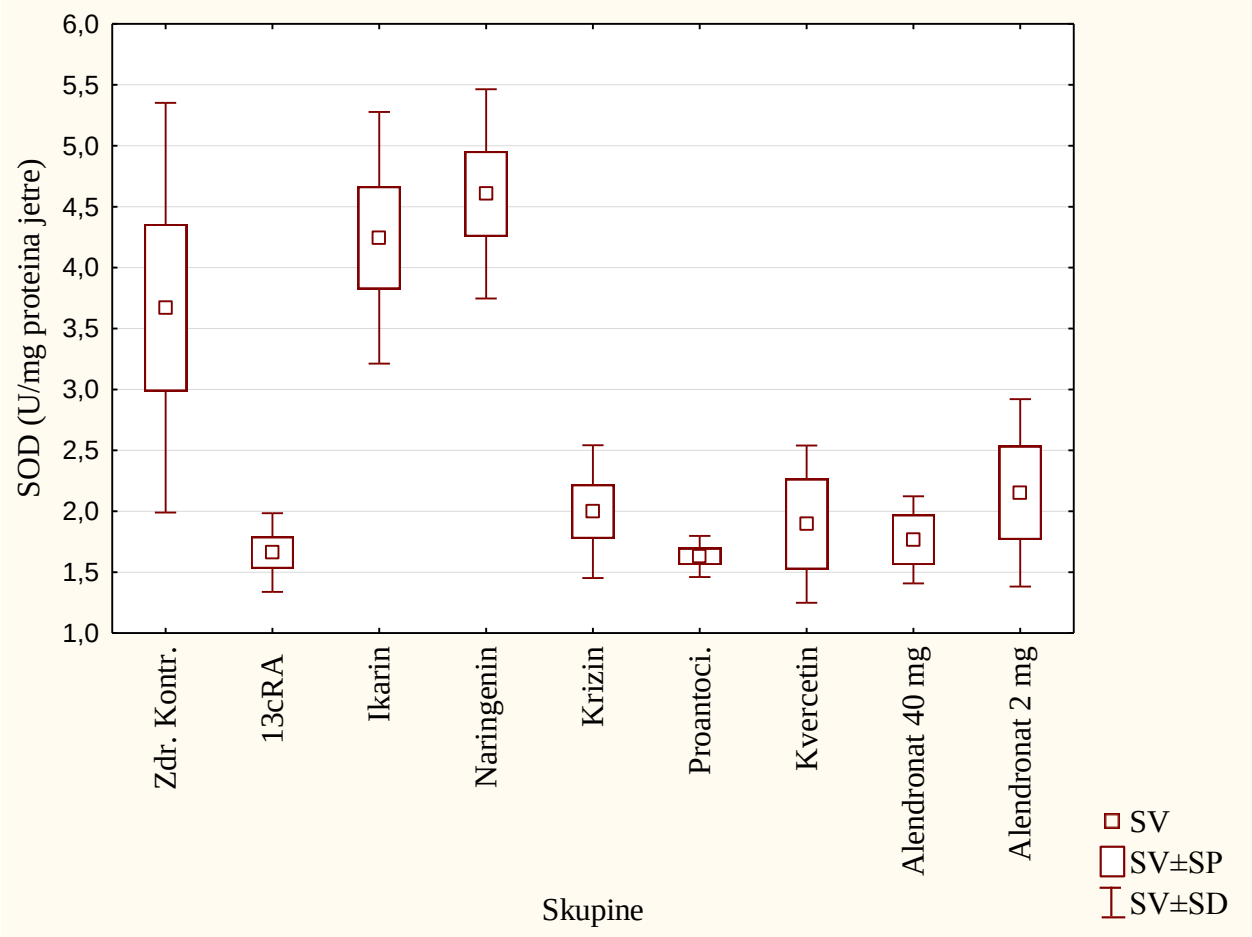
Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD - standardna devijacija



Slika 57. Učinak flavonoida ili alendronata na razinu enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) bubrega u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Ikarin *vs* Proantoci. ($P < 0,05$)

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



Slika 58. Učinak flavonoida ili alendronata na razinu enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) jetre u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

13cRA *vs* Ikarin ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Naringenin ($P < 0,01$); Ikarin *vs* Proantoci. ($P < 0,05$);

Naringenin *vs* Proantoci. ($P < 0,05$)

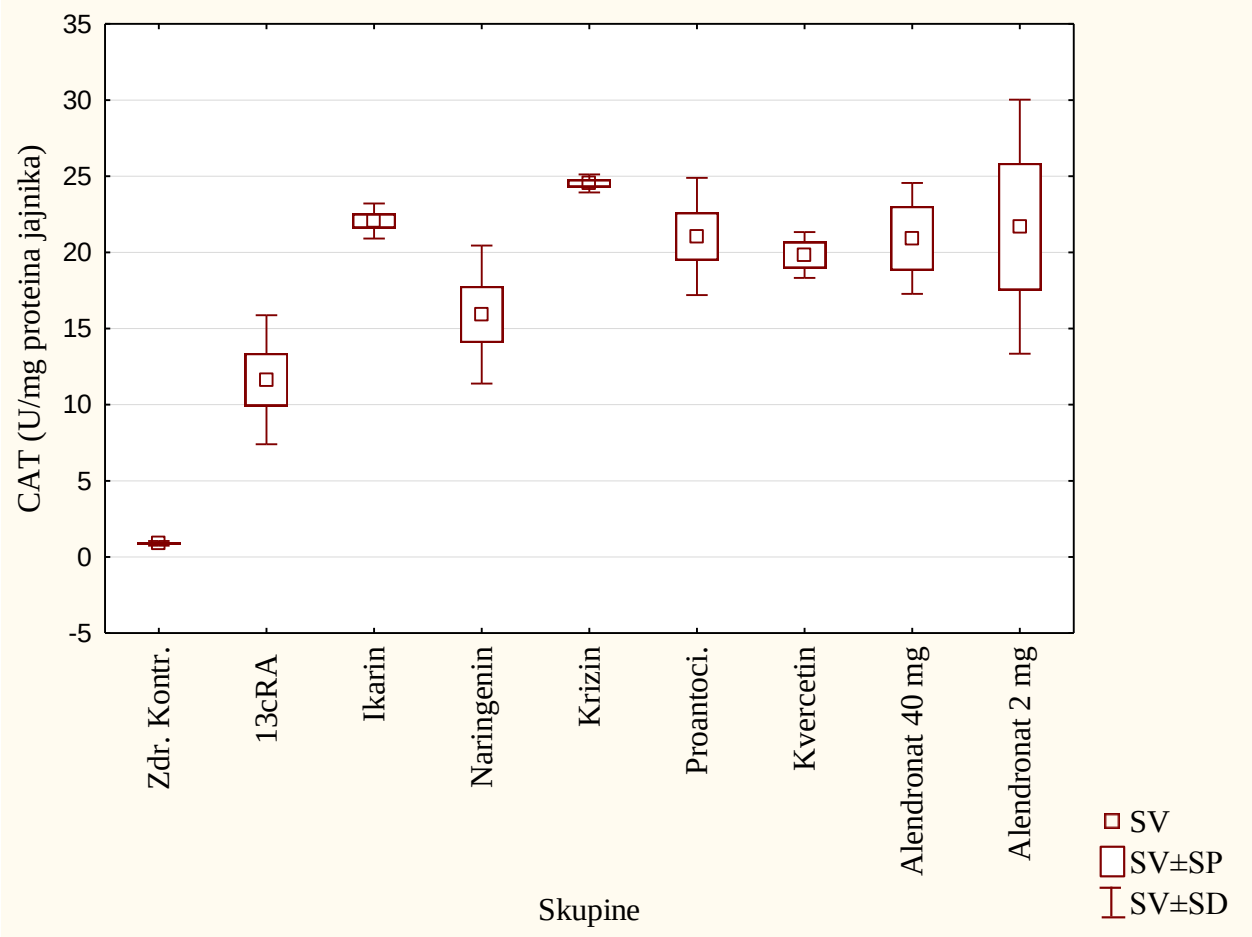
Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD - standardna devijacija

4.3.4. Vrijednosti enzimske aktivnosti katalaze (CAT) jajnika, bubrega, slezene i jetre

Analizom podataka uzoraka jajnika (Slika 59) utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti katalaze (CAT) kod skupina obrađenih ikarinom ($P < 0,05$), krizinom ($P < 0,001$) i proantocijanidinom ($P < 0,05$) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. Također je zapažena povećana enzimska aktivnost kod skupine obrađene krizinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$)

Analizom podataka uzoraka bubrega (Slika 60) utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti katalaze (CAT) kod skupine obrađene alendronatom 2 mg kg^{-1}u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$); skupine obrađene naringeninom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$); skupine obrađene kvercetinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$); skupina obrađenih alendronatom (40 mg kg^{-1}) i alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) ($P < 0,001$). Također je zabilježena povećana enzimska aktivnost skupina obrađenih alendronatom (40 mg kg^{-1}) i alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu ikarinom ($P < 0,05$) ($P < 0,01$).

Analizom podataka enzimske aktivnosti CAT- alaze uzoraka slezene i jetre kod RMO štakora nakon obrade s flavonoidima i alendronatom (Slika 61 i 62) nema vidljive statistički značajne razlike u enzimskoj aktivnosti među skupinama.

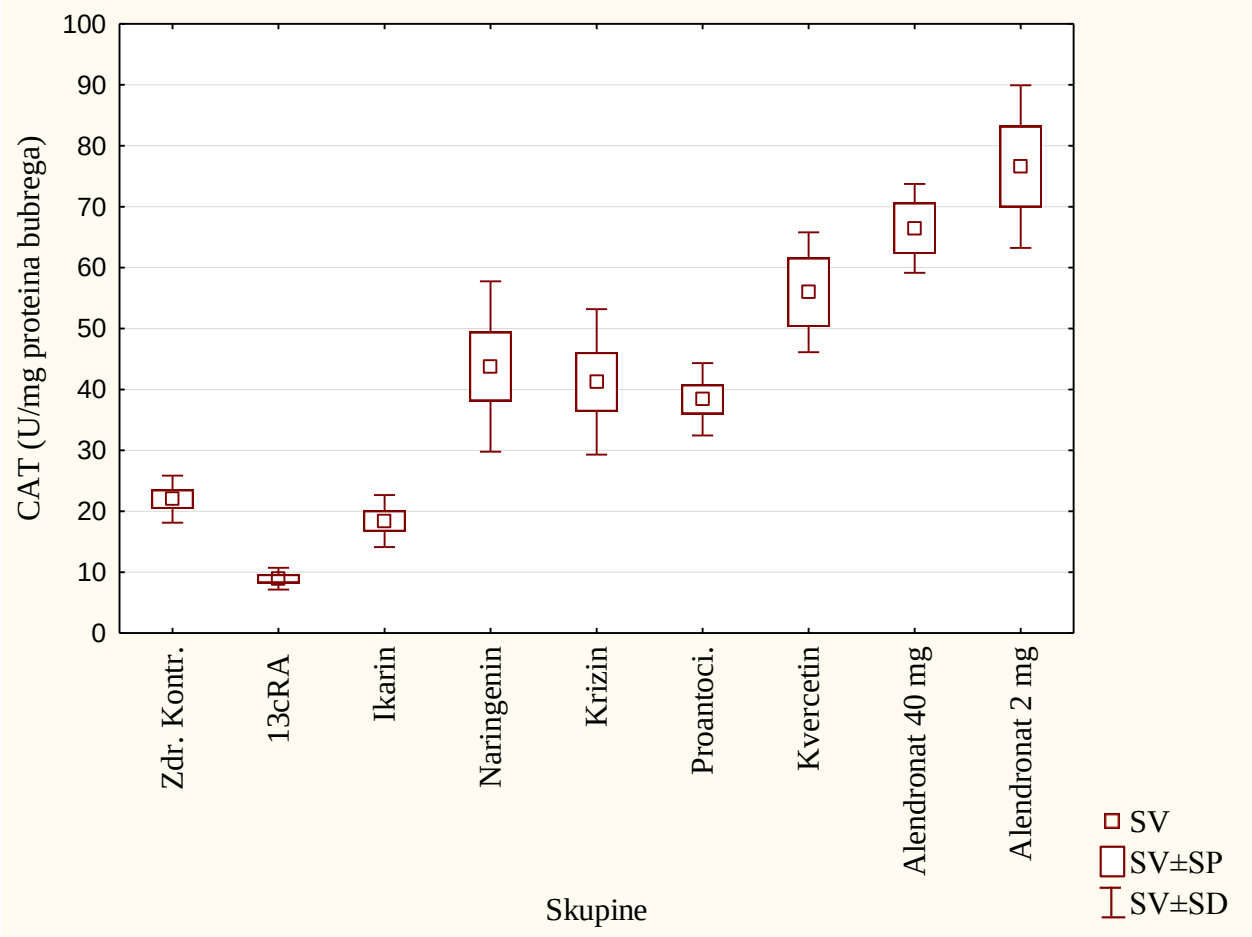


Slika 59. Učinak flavonoida ili alendronata na razinu enzimske aktivnosti katalaze (CAT) jajnika u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

Zdr.Kontr. *vs* Ikarin ($P < 0,05$); Zdr.Kontr. *vs* Krizin ($P < 0,001$);

Zdr.Kontr. *vs* Proantoci. ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Krizin ($P < 0,01$)

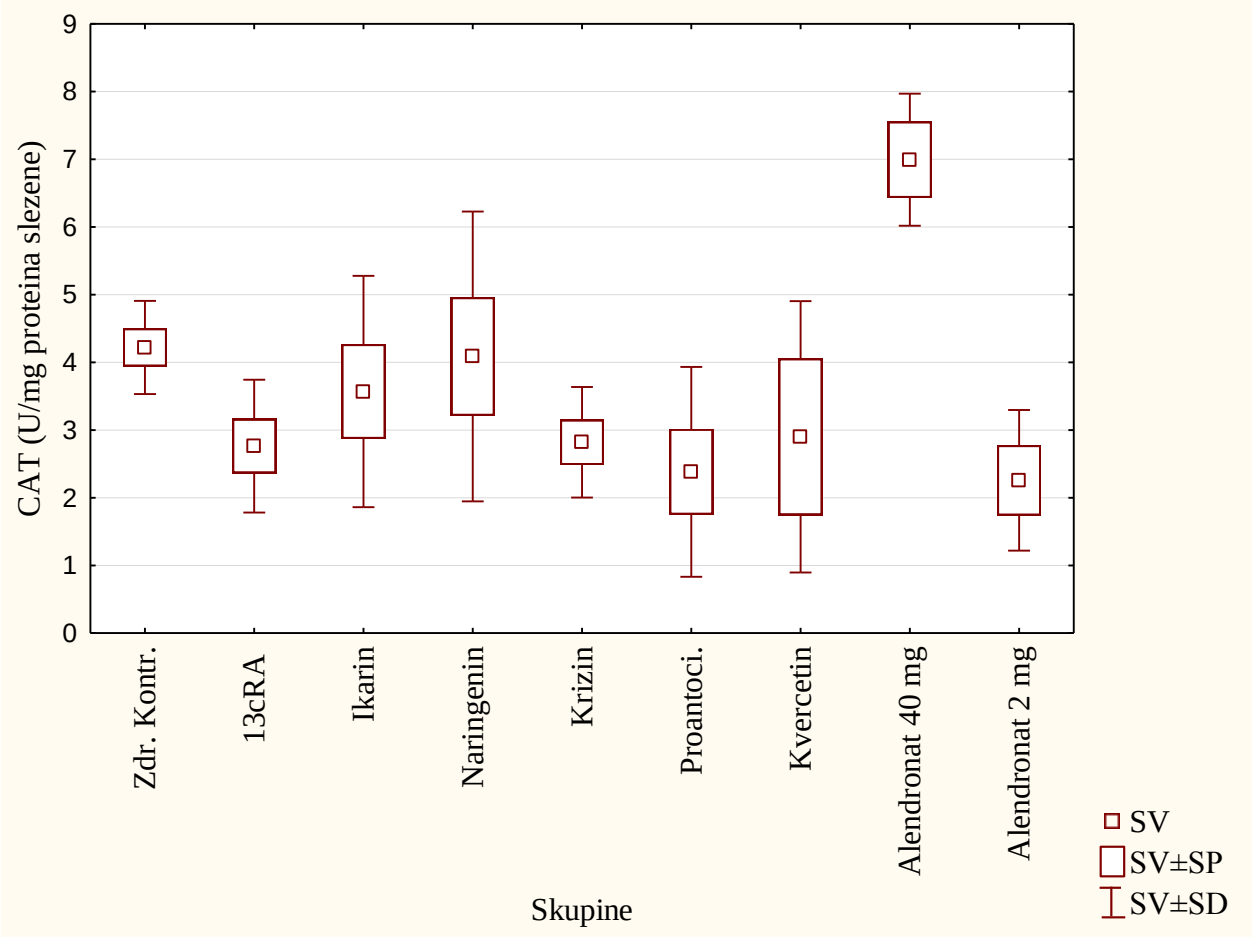
Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; SV - srednja vrijednost; SP - standardna pogreška; SD - standardna devijacija



Slika 60. Učinak flavonoida ili alendronata na razinu enzimske aktivnosti katalaze (CAT) bubrega u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

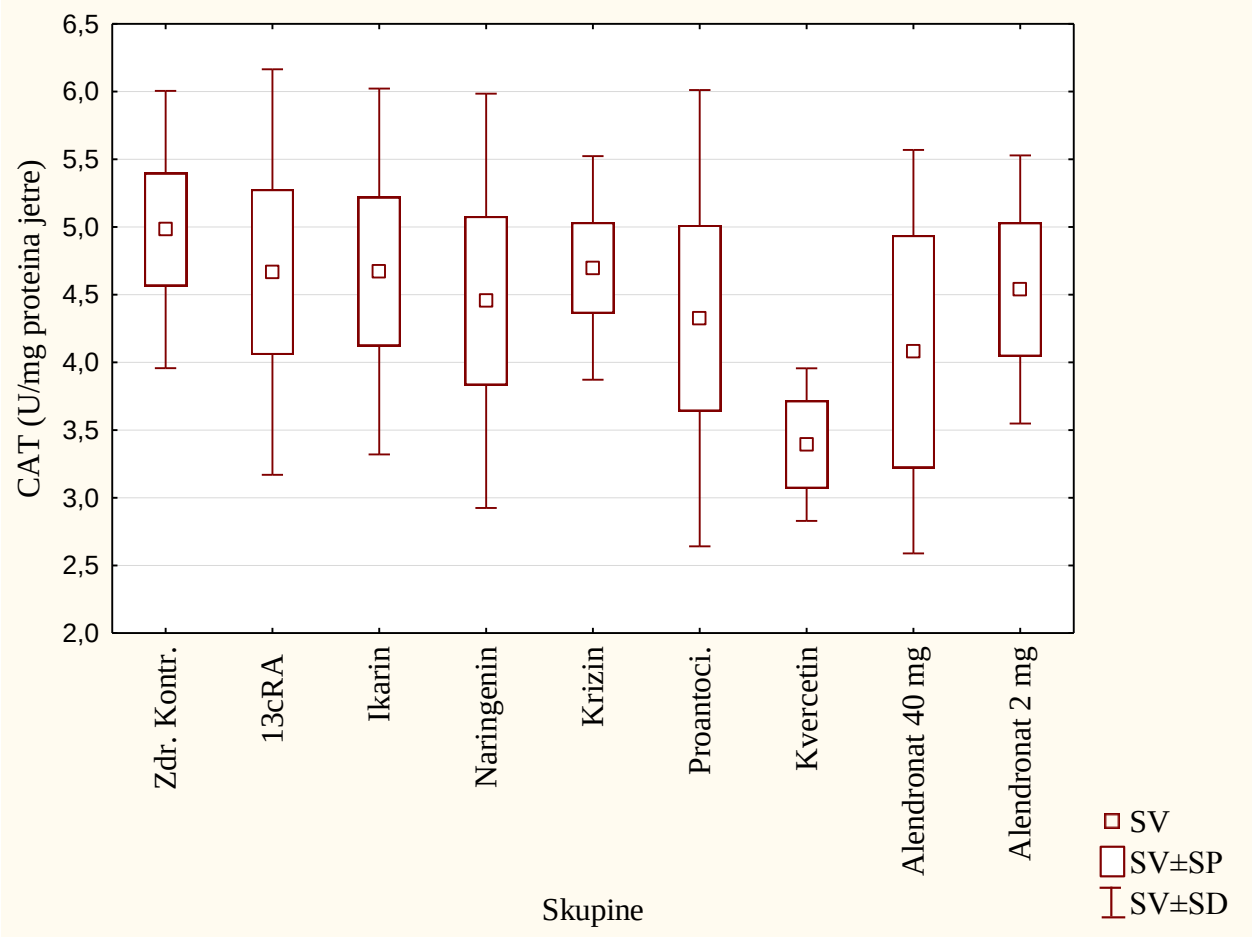
Zdr.Kontr. *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Naringenin ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Kvercetin ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,01$); 13cRA *vs* Alendronat 2 mg kg^{-1} ($P < 0,001$); Ikarin *vs* Alendronat 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); Ikarin *vs* Alendronat 2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

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



Slika 61. Učinak flavonoida ili alendronata na razinu enzimske aktivnosti katalaze (CAT) slezene u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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



Slika 62. Učinak flavonoida ili alendronata na razinu enzimske aktivnosti katalaze (CAT) jetre u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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

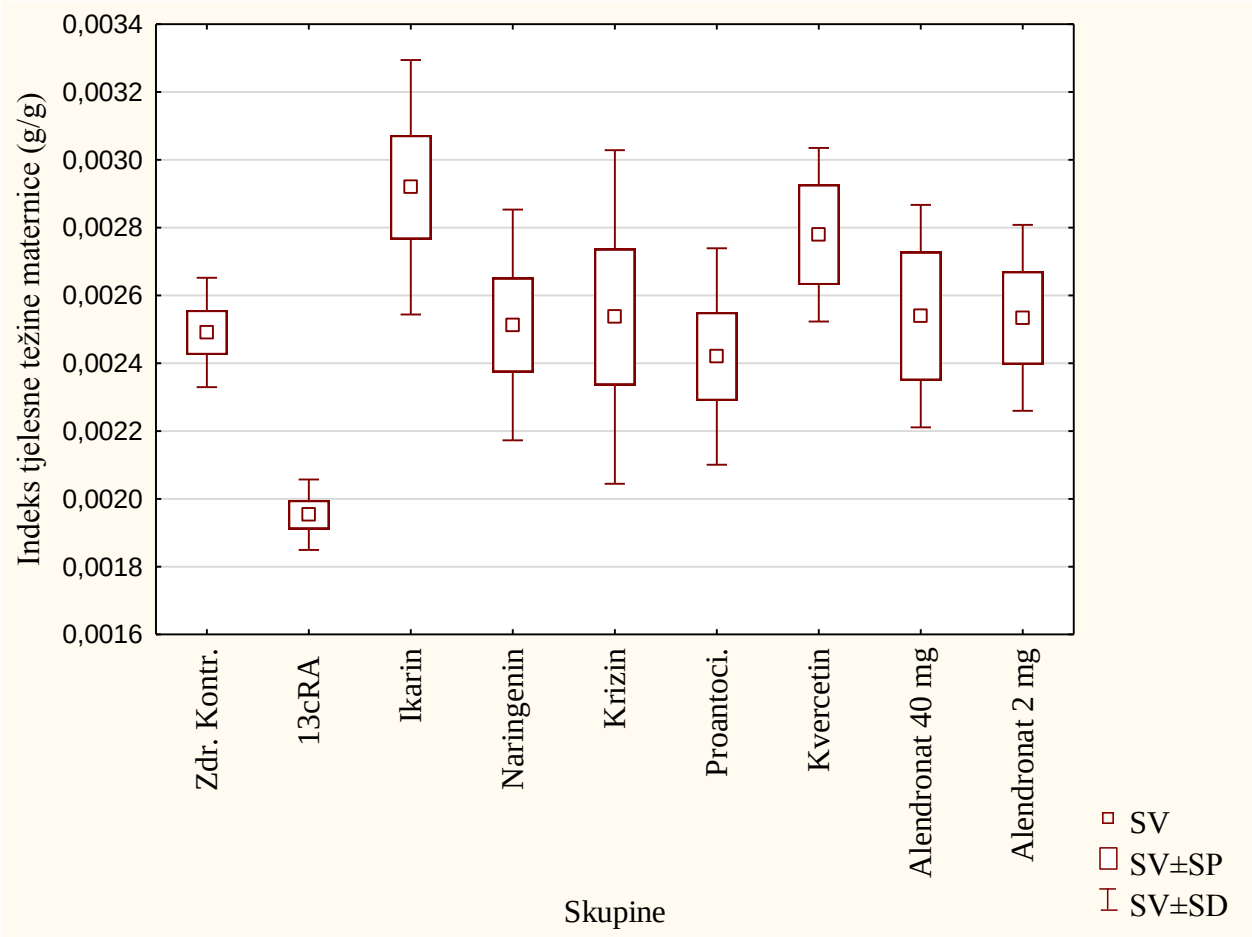
4.4. FITOESTROGENSKI UČINAK FLAVONOIDA

Fitoestrogeni predstavljaju heterogenu grupu biljnih spojeva, strukture slične 17-β-estradiolu. Nazivaju se molekulama nalik estrogenu ili nesteroidnin estrogenima. Trenutno ih je poznato preko 100, a podijeljeni su po svojoj strukturi u izoflavone, lignane, kumestane i stilbene. Estrogen ima značajnu ulogu u patogenezi osteoporoze. Nedostatak estrogena stimulira T-limfocite da otpuštaju upalne citokine TNF-α, IL-1, IL-6 (promoviraju osteoklastičnu aktivnost), IL- 7 (apoptoza osteoblasta). Ova strukturalna sličnost omogućava im vezanje za estrogenske receptore, te posljedično izazivanje različitih estrogenskih i protuestrogenskih učinaka. Smatra se da bi fitoestrogeni mogli prevenirati gubitak koštane mase povezane sa menopauzom, ali i oksidacijskim stresom te kroz brojne biološke učinke pozitivno utjecati na homeostatske proces i zdravlje kosti.

Procjenu fitoestrogenskog učinka flavonoida pratili smo mjerenjem težine maternice kao indeksi težine maternice u odnosu na tjelesnu težinu i kao relativne težinu maternice.

4.4.1. Indeks tjelesne težine maternice

Rezultati su prikazani na Slici 63. Rezultati indeksa tjelesne težine maternice (Slika 63) ukazuju da svi flavonoidi imaju značajan fitoestrogenski učinak; statistički značajan porast težine maternice pokazuje ikarin ($P < 0,001$) i kvercetina ($P < 0,05$) u odnosu na 13cRA. Indeks tjelesne težine maternice nakon obrade flavonoidima (fitoestrogenska aktivnosti) izkazan kao % (Tablica 21) kao razlika u odnosu na model osteoporoze (13cRA) navedena je kako slijedi: estrogenska aktivnost ikarina je veća za 49,44%, kvercetina za 42,27%, krizin za 29,85%, naringenin za 28,64 i proantocijanidini za 23,88%. Obrada alendronatom u dozi od 40 i 2 mg kg^{-1} je veća za 29,98% i 29,71%. Zdrave životinje imaju % težine maternice veći za 27,51% u odnosu na model osteoporoze (13cRA).



Slika 63. Učinak flavonoida ili alendronata na indeks tjelesne težine maternice u RMO štakora. izazvanom retinoičnom kiselinom. Indeks masa maternice je izračunata prema formuli: Indeks masa maternice (g/TT g) = ukupna masa maternice / završna tjelesna masa. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

13cRA *vs* Ikarin ($P < 0,001$); 13cRA *vs* Kvercetin ($P < 0,05$)

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

Tablica 21. Pokazatelji estrogenske aktivnosti flavonoida ili alendronata na indeks tjelesne težine maternice u RMO štakora.

Skupine[a]	Pokazatelji estrogenske aktivnosti mjerenjem indeksa tjelesne težine maternice (X ± SD)			
	Ind. mase maternice (g g^{-1})	**% povećanja / RMO**	**Minimalna vrijednost**	**Maksimalna vrijednost**
Zdr. Kontr.	0,0024±0,0001	27,51	0,0022	0,0026
13cRA	0,0019±0,0001	-	0,0018	0,0020
Ikarin	0,0029±0,0003***	49,44	0,0023	0,0034
Naringenin	0,0025±0,0003	28,64	0,0020	0,0029
Krizin	0,0025±0,0004	29,85	0,0020	0,0033
Proantoc.	0,0024±0,0003	23,88	0,0021	0,0028
Kvercetin	0,0027±0,0002*	42,27	0,0025	0,0030
Alendronat 40	0,0025±0,0003	29,98	0,0022	0,0029
Alendronat 2	0,0025±0,0002	29,71	0,0021	0,0027

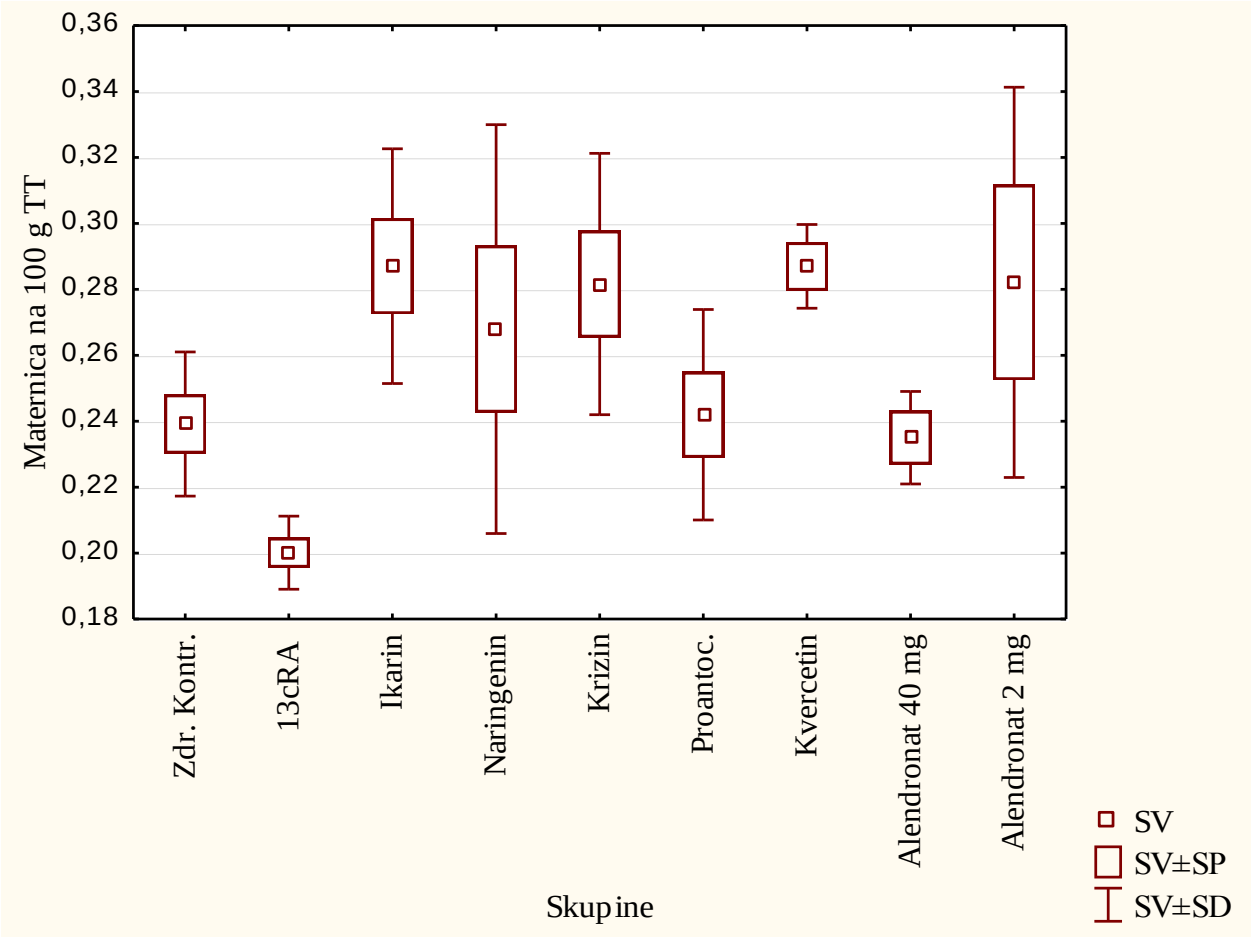
[a]Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Indeks masa maternice je izračunata prema formuli: Indeks masa maternice (g/TT g) = ukupna masa maternice / završna tjelesna masa. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SD.

* Statistički značajno različito u odnosu na 13cRA (*P<0,05; *** P<0,001).

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

4.4.2. Relativna težina maternice

Slika 64 i Tablica 22 pokazuju fitoestrogensku aktivnost flavonoida. S obzirom da su životinje obrađene s alendronatom u dozi od 40 mg kg^{-1} gubile na težini iskazali smo % razlike estrogenske aktivnosti kroz relativnu težinu maternice (Slika 64). Postotak estrogenske aktivnosti u odnosu na 13cRA naveden je kako slijedi: naringenin povećava relativnu težinu maternice za 74%, ikarin za 55,61%, krizin 52,73%, kvercetin 39,22%, proantocijanidini za 39,22% (Tablica 22). Relativna težina maternice u obradi s alendronatom u dozi od 40 i 2 mg kg^{-1} je veća za 15,65% i 65,33%. Zdrave životinje imaju % težine maternice veći za 21,71% u odnosu na model osteoporoze (13cRA). Statistički značajnu razliku relativne težine maternice u odnosu na model osteoporoze (13cRA) pokazuje: ikarin ($P < 0,01$), krizin ($P < 0,059$ i kvercetin ($P < 0,05$).



Slika 64. Učinak flavonoida ili alendronata na relativnu težinu maternice u RMO štakora. Relativna masa maternice je izračunata prema formuli: Relativna masa maternice (g/100 g) = ukupna masa maternice x 100 / završna tjelesna masa. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

13cRA *vs* Ikarin ($P < 0,01$); 13cRA *vs* Krizin ($P < 0,05$); 13cRA *vs* Kvercetin ($P < 0,05$)

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

Tablica 22. Pokazatelji estrogenske aktivnosti flavonoida ili alendronata na relativnu težinu maternice u RMO štakora.

Skupine[a]	Pokazatelji estrogenske aktivnosti mjerenjem relativne težine maternice (X ± SD)			
	Rel. težina maternice (g g^{-1})	**% povećanja / RMO**	**Minimalna vrijednost**	**Maksimalna vrijednost**
Zdr. Kontr.	0,239±0,029	19,49	0,205	0,263
13cRA	0,200±0,011	-	0,182	0,216
Ikarin	0,287±0,035**	43,42	0,237	0,336
Naringenin	0,267±0,062	33,88	0,205	0,376
Krizin	0,281±0,039*	40,71	0,225	0,331
Proantoc.	0,241±0,031	20,91	0,213	0,283
Kvercetin	0,286±0,012*	43,39	0,278	0,301
Alendronat 40	0,235±0,018	17,43	0,223	0,250
Alendronat 2	0,282±0,059	40,96	0,213	0,358

[a]Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Relativna masa maternice (g/100 g) = ukupna masa maternice x 100 / završna tjelesna masa.Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SD.

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

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

4.5. GENOTOKSIČNI UČINAK FLAVONOIDA

Slobodni reaktivni radikali posljedično nastali djelovanjem 13cRA sposobni su prouzročiti kemijske modifikacije i oštećenja na proteinima, lipidima, ugljikohidratima i nukleotidima. Modifikacije DNA oksidacijom česta su pojava kod sisavaca, ključna značajka za pojavnost brojnih bolesti, primjerice, raka, dijabetesa, starenja, osteoporoze i mnogih drugih bolesti. Oštećenja DNA jest najznačajnija ROS-prouzročena stanična modifikacija, budući da se DNA ne sintetizira *de novo*, već se kopira vodeći nastanku induciranih mutacija te genetske nestabilnosti. Oštećenje molekule DNA stanice najčešće aktivira programiranu staničnu smrt ili apoptozu. Tako visioka razina ROS-a, popraćena upalom vodi pojačanom propadanju osteoblasta te gubitku i lomljivosti kosti. Glavni slobodni radikal odgovoran za oštećenja DNA je hidroksilni radikal (•OH), koji reagira sa svim komponentama DNA molekule, purinskim i pirimidinskim bazama, te sa deoksiriboznom okosnicom. Na bazama može doći do dodavanja ili oduzimanja vodika što dovodi do stvaranja slobodnih radikala. Daljnje reakcije baza i šećernih radikala stvaraju različite modifikacije, mjesta bez baza, puknuća DNA te križne veze DNA i proteina.

Protuoksidativni i protuuplani učinak flavonoida zasigurno pomaže u održavanju cjelovitosti DNA kao i funkcionalne sposobnosti organizma kroz mehanizme kako slijedi: a) sposobnosti sakupljanja reaktivnih kisikovih radikala i reaktivnih dušikovih radikala, b) inhibiciju oksidativnih enzima, c) keliranju iona prijelaznih metala (Cu^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+} i Mg^{2+}), d) aktiviranju i zaštiti unutarstaničnih enzima. Osim protuoksidativnog učinka, flavonoidi u nazočnosti prijelaznih kovina mogu imati prooksidativni učinak. Protuoksidativne/prooksidativne učinake pratili smo mjerenjem razine oštećenja DNA u limfocitima periferne krvi primjenom Komet-testa i Mikronukleus testa.

4.5.1. Rezultati mikronukleus testa

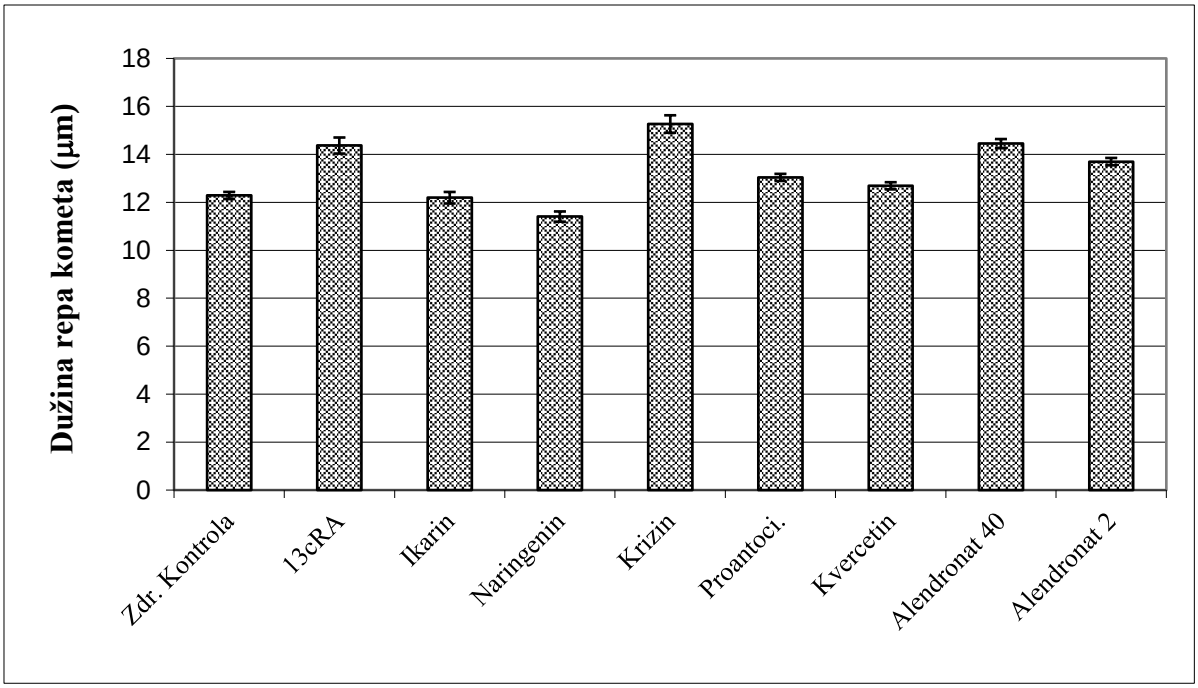
Mikronukleusi su samostalne kromatinske strukture, odvojene od jezgre a nastaju kondenzacijom acentričnih kromosomskih ulomaka ili čitavih kromosoma zaostalih u anafazi tijekom diobe. Mikronukleus jest kvantitativni pokazatelj postojanja strukturnih i/ili numeričkih aberacija kromosoma u stanici nastalim pod utjecajem različitih genotoksičnih tvari u uvjetima *in vitro* i/ili *in vivo*.

Analizom podataka dobivenih iz sasušenih razmaza periferne krvi (mikronukleus test *in vivo*) RMO štakora nakon obrade s flavonoidima i alendronatom nije uočena statistički značajna razlika u broju mikronukleusa među analiziranim skupinama štakora. Broj mikronukleusa u analiziranim retikulocitima (pregledano 2000 retikulocita po svakom pojedinačnom uzorku) je bio zanemarujuće mali, tako da rezultati nisu prikazani.

4.5.2. Rezultati komet testa

Rezultati pokazatelja komet testa (dužina repa, intezitet repa i moment repa) prikazani su Slikama 65, 66, i 67. Razine statističke značajnosti prikazane su u Tablicama 23, 24, i 25. Rabili smo standardni alkalni komet test; njegova izvedba u alkalnim uvjetima omogućuje specifično otkrivanje jednolančanih lomova i mjesta osjetljivih na lužine (apurinska i apirimidinska mjesta nastala kao posljedica oštećenja molekule DNA), praćenje popravka stanične DNA te otkrivanje stanica u apoptozi i nekrotičnih stanica. 13cRA, alendronat u dozi od 2 i 40 mg kg^{-1} te krizin pokazuju najveću dužinu repa (udaljenost najkraćih odlomljeni ulomaka DNA) u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$), dok naringenin pokazuje najmanju dužinu repa; razinu značajnosti ($P < 0,05$) u odnosu na kontrolu (Slika 65, Tablica 23). Najmanju dužinu repa DNA leukocita pokazala je obrada štakora s ikarininom i naringenin ($P < 0,001$), te kvercetin ($P < 0,01$) u odnosu na 13cRA.

Intezitet repa (postotak DNA koja je migrirala u rep) je najveći nakon obrade naringeninom ($P < 0,001$) dok intezitet repa nakon obrade ikarinom bio veći u odnosu na kontrolu za ($P < 0,01$). Obrada ikarinom i naringeninom je pokazala najveću razinu inteziteta repa u odnosu na 13cRA ($P < 0,001$). Alendronat u visokoj dozi je pokazao statistički značajno ($P < 0,05$) manju razinu % DNA u repu u odnosu na 13cRA (Slika 66, Tablica 24). Repni moment se obično definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu. Obrada štakora naringeninom pokazuje najveći repni moment u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu i skupinu RMO ($P < 0,001$; ($P < 0,001$) te ikarin ($P < 0,05$) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (Slika 67, Tablica 25). Statističke značajnosti između pojedinih eksperimentalnih skupina prikazani su u Tablicama 23 - 25), gdje je vidljivo da obrada naringeninom i alendronatom je polučila najveće statističke promjene.



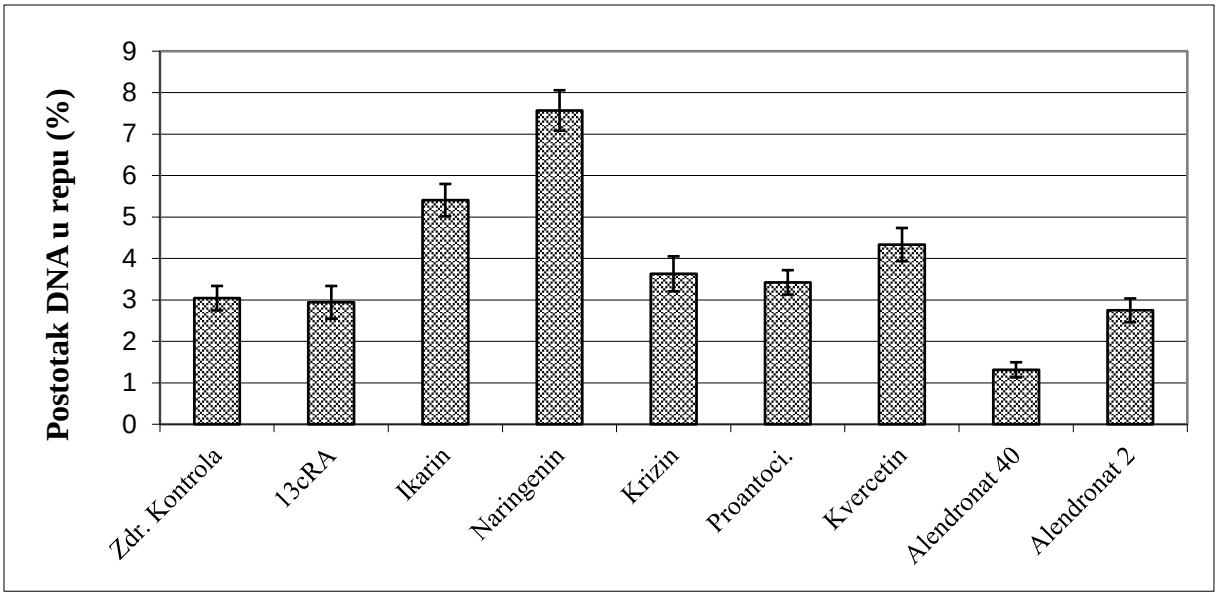
Slika 65. Učinak flavonoida ili alendronata na dužinu repa kometa leukocita periferne krvi u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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

Tablica 23. Statistički pokazatelji rezultata dužinu repa kometa leukocita periferne krvi u RMO štakora

Skupine	**Zdr. Kontr.**	**13cRA**	**Ikarin**	**Naringenin**	**Krizin**	**Proantoci.**	**Kvercetin**	**Alendronat 40**	**Alendronat 2**
Zdr. Kontr.									
13cRA	$P < 0,001$								
Ikarin	NZ	$P < 0,001$							
Naringenin	$P < 0,05$	$P < 0,001$	NZ						
Krizin	$P < 0,001$	NZ	$P < 0,001$	$P < 0,001$					
Proantoc.	NZ	NZ	$P < 0,05$	$P < 0,001$	$P < 0,001$				
Kvercetin	NZ	$P < 0,01$	NZ	$P < 0,001$	$P < 0,001$	NZ			
Alendronat 40	$P < 0,001$	NZ	$P < 0,001$	$P < 0,001$	NZ	$P < 0,01$	$P < 0,001$		
Alendronat 2	$P < 0,001$	NZ	$P < 0,001$	$P < 0,001$	NZ	NZ	NZ	NZ	

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; NZ – nije značajno



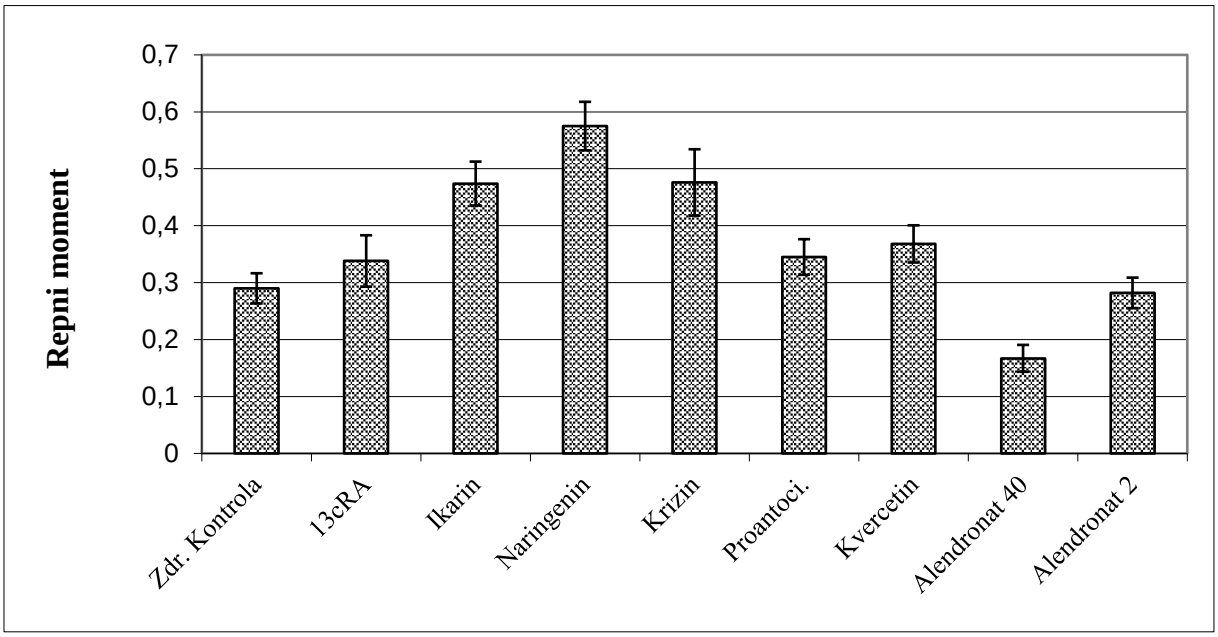
Slika 66. Učinak flavonoida ili alendronata na % DNA u repu leukocita periferne krvi u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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

Tablica 24. Statistički pokazatelji rezultata % DNA u repu leukocita periferne krvi u RMO štakora

Skupine	**Zdr. Kontr.**	**13cRA**	**Ikarin**	**Naringenin**	**Krizin**	**Proantoci.**	**Kvercetin**	**Alendronat 40**	**Alendronat 2**
Zdr. Kontr.									
13cRA	NZ								
Ikarin	$P < 0{,}01$	$P < 0{,}001$							
Naringenin	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	NZ						
Krizin	NZ	NZ	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$					
Proantoc.	NZ	NZ	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	NZ				
Kvercetin	NZ	NZ	NZ	$P < 0{,}001$	NZ	NZ			
Alendronat 40	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}05$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$		
Alendronat 2	NZ	NZ	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	NZ	NZ	NZ	$P < 0{,}01$	

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; NZ – nije značajno



Slika 67. Učinak flavonoida ili alendronata na repni moment leukocita periferne krvi u RMO štakora. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s flavonoidima (100 mg kg^{-1}) ili alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) jednom dnevno tijekom 14 dana. Broj životinja po skupini (n= 6). Rezultati su prikazani kao SV ± SP.

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

Tablica 25. Statistički pokazatelji rezultata repnog momenta leukocita periferne krvi u RMO štakora

Skupine	**Zdr. Kontr.**	**13cRA**	**Ikarin**	**Naringenin**	**Krizin**	**Proantoci.**	**Kvercetin**	**Alendronat 40**	**Alendronat 2**
Zdr. Kontr.									
13cRA	NZ								
Ikarin	$P < 0{,}05$	NZ							
Naringenin	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	NZ						
Krizin	NZ	NZ	NZ	NZ					
Proantoc.	NZ	NZ	NZ	$P < 0{,}001$	NZ				
Kvercetin	NZ	NZ	NZ	$P < 0{,}01$	NZ	NZ			
Alendronat 40	NZ	NZ	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}001$	$P < 0{,}05$	$P < 0{,}01$		
Alendronat 2	NZ	NZ	$P < 0{,}05$	$P < 0{,}001$	NZ	NZ	NZ	NZ	

Kratice: Zdr. Kontr. - zdrava kontrola; 13cRA - (RMO, retinoični model osteoporoze); Proantoci. - proantocijanidin; NZ – nije značajno

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju istraženo je pet flavonoida (krizin, proantocijanidin, naringenin, ikarin i kvercetin) na osteoporotičnom modelu štakora izazvanom 13cRA (RMO), u svrhu procjene njihove učinkovitosti na narušenu homeostazu koštanog tkiva i gubitak koštane mase prouzročen lijekovima uključujući 13cRA. Također su istražene razlike u osteoprotektivnoj učinkovitosti, te učincima na ostale organske sustave kao i na cjelokupni organizam RMO štakora između navedenih flavonoida i danas široko primjenjivanog proturesorptivnog lijeka u liječenju sekundarne osteoporoze alendronata, a u svrhu provjere ključnih mehanizama djelotvornosti flavonoida kao funkcionalne hrane i da li flavonoidi mogu predstavljati jednu potencijalnu mogućnost u liječenju osteoporoze u budućoj kliničkoj praksi, koja bi bila cijenom dostupnija i sa manje nuspojava od trenutnih lijekova poput alendronata. Protuoksidativna, protuupalna, fitoestrogenska i regenerativna djelotvornost svakog od pojedinačnih flavonoida kao i alendronata praćena je preko enzima oksidativnog stresa u jajnicima, bubrezima, jetri i slezeni RMO štakora, u kojima su određivane razine lipidne peroksidacije, koncentracije ukupnog glutationa (GSH), razine enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i enzimske aktivnosti katalaze; biokemijskih biljega koštanog preokreta osteokalcina i beta crossLapsa (β-CTx); hematoloških i biokemijski parametara i određivanja protuupalnih citokina; praćenja promjena koštane mase određivanjem BMC-a, BMD-a i fizikalnih mjerenja kosti; histopatoloških oštećenja kosti. Utvrđen je utjecaj navedenih flavonoida i alendronata na promjene tjelesne težine u RMO štakora kao i na promjene težina svakog pojedinog unutarnjeg organa kao pokazatelja moguće toksičnosti istraživanih pripravaka na razini cjelokupnog organizma. Jednako tako utvrđen je fitoestrogenski učinak svakog od pojedinih flavonoida praćenjem i uspoređivanjem promjena u težinama maternica u RMO štakora obrađivanih sa svakim pojedinačnim flavonoidom i alendronatom. Također je utvrđeno postojanje genotoksičnih oštećenja RMO štakora obrađenih flavonoidima i alendronatom određivanjem procjene stupnja oštećenja DNA komet-testom i mikronukleus testom.

5.1. Model osteoporoze u štakora izazvan retinoičnom kiselinom (RMO)

RMO model koristi se u zadnjem desetljeću u procijeni djelovanja različitih tvari na koštani metabolizam, te je potisnuo korištenje kompliciranijeg ovariektomijskog modela osteoporoze u štakora, ranije najčešće korištenog modela osteoporoze nastalog manjkom estrogena (Liao i

sur. 2003; Liu (a) i sur. 2015; Liu (b) i sur. 2015; Henning i sur. 2015; Yang i sur. 2016; Nowak i sur. 2016; Zhao i sur. 2016). Negativne strane ovariektomijskog modela su operativni zahvat kirurškog odstranjenja jajnika koji treba učiniti radi postizanja smanjenja razine estrogena. To smanjenje postupno dovodi do gubitka koštane mase koje je karakterizirano povećanom koštanom razgradnjom. Međutim ubrzo dolazi do ravnoteže između razgradnje i izgradnje, što uz razlike u koštanom gubitku ovisno o mjestu mjerenja koštane mase čini ovaj model nepovoljnim u odnosu na RMO (Mosekilde 1995; Lelovas i sur. 2008).

U brojnim istraživanjima zabilježeno je kako unos velikih doza vitamina A kroz duži period dovodi do spontanih prijeloma dijafiza dugih kostiju kod štakora (Lind i sur. 2006), što je kasnije i radiološki dokazano uz pomoć x zraka (Rohde i sur. 2003). Jednako tako uočeno je kako veliki unos vitamin A prehranom dovodi do smanjenja BMD-a i povećanja rizika za nastanak prijeloma kosti (Feskanich i sur. 2002; Promislow i sur. 2002; Michaelsson i sur. 2003; De Jonge i sur. 2015; Chen i sur. 2015; Joo i sur. 2015). Dokazano je kako intragastrična primjena visokih doza 13cRA u kratkom vremenskom razdoblju od 1 - 3 tjedna uspješno inducira osteoporozi slične promjene kod štakora (Fahmy i sur. 2009). Iz razloga jednostavnosti primjene i učinka, te sličnosti u patofiziološkom odgovoru koštanog sustava u ljudi i štakora u sposobnosti indukcije koštanog gubitka u kratkom vremenskom razdoblju u ovom istraživanju korišten je ovaj model osteoporoze u štakora kao prihvatljiv predklinički model, koji je idealan zaproučavanje protuoksidativnih, protuupalnih, fitoestrogenskih i regenerativnih značajki flavonoida.

Učinak primjene visokih doza 13cRA u indukciji osteoporoze prikazan je preko do sada predloženih mehanizama djelovanja retinoida putem aktivacije ROS-a što je objektivizirano biljezima protuoksidativnog sustava i promjenama u hematološkim i biokemijskim parametrima koji govore u prilog upale, zatim putem djelovanja 13cRA na sniženje estrogena i pojave upalnih citokina koji djeluju na aktivnost koštanih i imunosnih stanica, te putem djelovanja 13cRA na aktivnost vitamin D receptora. Jednako tako dokazan je negativan učinak 13cRA na koštani sustav mjerenjima koštane mase, fizikalnim mjerenjima i histološkom analizombedrenih kostiju, te mjerenjima biokemijskih biljega koštanog preokreta.

U dosadašnjim istraživanjima opisani su mehanizmi preko kojih vitamin A (retinol) i njegovi metaboliti retinaldehid i retinoična kiselina (13cRA) djeluju na diferencijaciju i proliferaciju stanica mnogih tkiva, pa tako i koštanih stanica u kojima su pronađeni retinoični receptori i stanični retinol-vežući proteini (CRBP) (Kindmark i sur. 1993; Saneshige i sur. 1995; Balmer i

sur. 2002). Međutim svi mehanizmi djelovanja retinoične kiseline u izazivanju osteoporoze nisu u potpunosti jasni.

Smatra se kako 13cRA uzrokuje OS i stvaranje ROS-a koji potiskuju osteoblastičnu aktivnost a povećavaju aktivnost osteoklasta, što ako prevlada prirodne protuoksidativne mehanizme može dovesti do opsežnog gubitka koštane mase (Hough i sur. 1988; Binkley i sur. 2000; Johansson i sur. 2002; Michaelsson i sur. 2003; Rohde i sur. 2003). Jedna od osnovnih karakteristika OS je lipidna peroksidacija čiji je krajnji proizvod MDA koji je mjera osteoklastične aktivnosti i proizvodnje slobodnih radikala, a njegove povišene vrijednosti ukazuju na stanje povećanog oskidativnog stresa (Fahmy i sur. 2009).

U ovom istraživanju zapaženo je statistički značajno povećanje vrijednost MDA kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) jedino u bubregu (Slika 48), međutim vidljive su povećane vrijednosti MDA i u drugim organima (jajnik, slezena i jetra) kod RMO skupina u odnosu na zdravu kontrolnu, međutim bez pokazane statističke značajnosti (Slike 47, 49, 50).

Kako je organizam pod stalnim djelovanjem slobodnih radikala, opstanak života ovisi o protuoksidacijskom staničnom sustavu koji zamjenjuje i uklanja produkte oksidacijskog stresa i tako sprječava njihovo povećano stvaranje. Glavninu tog protuoksidacijskog sustava čine protuoksidativni enzimi superoksid dismutaze (SOD) i katalaze (CAT), te glutation (GSH) organski spoj koji ima protuoksidativno djelovanje kao kofaktor enzimu peroksidazi, donirajući elektron potreban za razgradnju H_2O_2, a koji ujedno čini i prvu liniju protuoksidativnog sustava (Kohen i sur. 2002). Prema istraživanjima koja su proveli Fahmy i Gimeno pokazane su snižene razine GSH u jetri i koštanome tkivu kao indikator da koncentracije retinola više od fizioloških u štakora induciraju oksidativni stres (Gimeno i sur. 2004; Fahmy i sur. 2009). Povišeni jetreni i koštani biljezi navedenih protuoksidativnih sustava pokazani su u brojnim drugim životinjskim modelima koji ukazuju kako je oksidativni stres glavni čimbenik koji stoji iza gubitka koštane mase kakvog vidimo u osteoporozi (Bascu i sur. 2001; de Boer i sur. 2002; Tyner i sur. 2002; Muthusami i sur. 2005).

U ovom istraživanju zabilježeno je statistički značajno smanjenje koncentracije glutationa (GSH) u jajnicima obrađenih životinja (Slika 51) kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,01$). Također su vidljive snižene vrijednosti GSH u bubregu, slezeni i jetri (Slike 52, 53 i 54) kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu međutim rezultati nisu pokazali statističku značajnost.

Utvrđeno je djelovanje 13cRA na smanjenje razine estrogena, što dovodi do pojave upalnih citokina koji potiču osteoklastičnu aktivnost, a osteoblaste uvode u apopotozu. Nedostatak estrogena stimulira T-limfocite da otpuštaju upalne citokine TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-17 (promoviraju osteoklastičnu aktivnost), IL-7 (apoptoza osteoblasta) (Khosla i sur. 2011; Miyamoto 2015; Zeng i sur. 2015; Lai i sur. 2015; Fan i sur. 2015; Pietschmann i sur. 2016). Ovi učinci pro-upalnih citokina proučavani su na ovarijektomiziranim miševima najčešće rabljenom modelu osteoporoze. Miševi s nedostatkom T-stanica pokazali su otpornost na gubitak koštane mase koji je trebao uzrokovati umjetno izazvan manjak estrogena (Zupan i sur. 2012). Također treba spomenuti ulogu RANTES citokina koji pripadaju familiji kemokina i prisutni su vrlo rano u upali gdje djeluju kemotaktički na T limfocite, eozinofile i bazofile i imaju glavnu ulogu u regrutiranju leukocita na mjesto upale (Lechner i sur. 2015).

Iz rezultata mjerenja razine upalnih citokina u serumu (Slika 46) vidljiv je izražen porast razine upalnih citokina kod RMO skupine, među kojima je najizraženiji porast RANTES kemokina. Također se zabilježen izraženiji porasti TNF-α, i IL-1β, u RMO skupine što potvrđuje postojanje upale koja posreduje u gubitku koštane mase RMO štakora.

Istraživanja pokazuju da 13cRA smanjuje aktivnost vitamin D receptora što smanjuje apsorpciju kalcija u crijevima, djeluje na izlučivanje kalcija bubrezima i na lučenje paratireoidnog hormona (Xu i sur. 2005; Sohair i sur. 2009). Mehanizam kojim se ovaj antagoniozirajući učinak postiže nije u potpunosti razjašnjen, a prepostavka je da ide putem RXR receptora s obzirom da oba koriste RXR proteine da bi funkcionirali kao partneri u heterodimernoj formaciji potrebnoj za transkripcijsku aktivaciju. Tako povišene razine retinoida mogu zauzeti veliki dio RXR dostupnih proteina, te posljedično spriječiti djelovanje vitamina D. Također je zapaženo djelovanje retinoida kao modulatora signalizacije vitamin D, tiroidnih i steroidnih hormona (Rohde i sur. 2003).

Iz rezultata mjerenja koncentracije 25-OH Vitamina D (Slika 39) i koncentracije ukupnog kalcija i anorganskog fosfata u krvi (Slike 40 i 41) nije vidljivo statistički značajne razlike u koncentracijama između zdrave kontrolne skupine i RMO skupine, međutim zapažena je viša koncentracija 25-OH Vitamina D kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (Slika 39) koja prema rezultatima ne pokazuje statističke značajnosti, ali ipak ukazuje na antagonističko djelovanje 13cRA.

Analizom rezultata hematoloških parametara u ovom istraživanju nije zabilježena statistički značajna razlika u vrijednostima između RMO skupine i zdrave kontrolne skupine (Tablice 15 i 16, Slika 42). Iz pokazanih rezultata možemo zaključiti da 13cRA iako u velikim dozama u ovako kratkom vremenskom periodu nema značajnog utjecaja na eritrocitnu lozu, broj leukocita, broj trombocita i na diferencijalnu krvnu sliku.

Analizom rezultata biokemijskih parametara enzimske aktivnosti aspartat - aminotransferaze (AST), alanin - aminotransferaze (ALT) i gama - glutamiltransferaze (GGT) (Tablica 17, Slika 43) nije zabilježeno statistički značajne razlike u enzimskoj aktivnosti kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, međutim ipak je vidljivo povećanje vrijednosti AST-a i GGT-a kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolu, iako bez statistički značajnog rezultata upućuje na blaže oštećenje jetrenog parenhima. Indukcija jetrenih izoenzima nastaje kao posljedica hepatotoksičnog učinka 13cRA, povećane propusnosti membrane jetrenih stanica što vodi do posljedičnog povećanog otpuštanja jetrenih enzima u cirkulaciju (Fahmy i sur. 2009). U drugim radovima pokazana je toksičnost vitamina A koja nastaje kad se premaši jetreni kapacitet pohrane viška retinola (Nollevaux i sur. 2006). U istraživanjima provedenim s nižim dozama 13cRA u kraćem vremenskom periodu (7,5 mg kg^{-1} i 15 mg kg^{-1}) kroz sedam dana u štakora nije dovelo do porasta aktivnosti jetrenih enzima, što upućuje da oštećenje ovisi o dozi i dužini primjene (Cisneros i sur. 2005; Hotchkiss i sur. 2006). Također u ovom istraživanju iz rezultata mjerenja koncentracije ukupnog bilirubina (Tablica 18) nije zapažena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu. Može se zaključiti kako je 80 mg kg^{-1} ipak prihvatljiva doza u vremenskom periodu od 14 dana *ig* primjene, jer u štakora ne izaziva značajno povećanje jetrenih enzima niti dovodi do poremećaja u metabolizmu bilirubina (Tablica 17 i 18, Slika 43) i ako postoji blagi pad u broju eritrocita, hemoglobina i hematokrita u svih skupina životinja obrađenih s 13cRA te posljedično povećanje bilirubina.

Analizom rezultata biokemijskih parametara enzimske aktivnosti amilaze (AMS) (Tablica 17) i enzimske aktivnosti laktat - dehidrogenaze (LDH) (Tablica 17, Slika 45) nisu zapažene statistički značajne razlike u aktivnosti enzima kod RMO štakora u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, što upućuje da doza od 80 mg kg^{-1} kroz 14 dana *ig* primjene u štakora ne dovodi do štetnog utjecaja na gušteraču. Analizom rezultata enzimske aktivnosti alkalne fosfataze (ALP) (Tablica 17, Slika 44) nije vidljiv statistički značajan porast aktivnosti ALP između RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, iako je zabilježena povećana vrijednost kod RMO skupine što je objašnjeno povećanjem koštane pregradnje, a o čemu je bilo riječi kod drugih autora (Liao i sur. 2003; Fahmy i sur. 2009).

Prema dostupnoj literaturi nema dovoljno podataka o učinku 13cRA na vrijednosti renalnih parametara. Rezultati mjerenja koncentracija kreatinina i ureje (Tablica 18) nisu pokazali statistički značajne promjene kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu što upućuje na to da retinoična kiselina u dozi od 80 mg kg^{-1} kroz 14 dana *ig* primjene u štakora nema štetan učinak na renalni sustav. Prema nekim autorima retinoidi što uključuje i 13cRA imaju koristan učinak na renalni sustav (Schaier i sur. 2001).

Rezultati mjerenja koncentracija glukoze (Tablica 18) ne pokazuju statistički značajne promjene koje bi ukazale na značajan utjecaj 13cRA na metabolizam glukoze u primijenjenoj dozi. Međutim prema nekim istraživanjima primjena 13cRA (15 mg kg^{-1}) na štakorima dovela je samo u muških štakora do smanjenja razine glukoze u krvi (13 - 19% u odnosu na kontrolnu grupu istog spola) (Cisneros i sur. 2005).

U procijeni koštane mase pa tako i u dijagnozi osteoporoze danas se koriste metode mjerenja gustoće minerala u kostima (BMD) i količine minerala u kostima (BMC), međutim prema mnogim autorima u procijeni koštane snage i moguće koštane lomljivosti treba uzeti u obzir fizikalna mjerenja bedrenih kostiju, te mjerenja biokemijskih biljega koštanog preokreta koji govore u prilog promjena na razini cjelokupnog koštanog sustava (Ferretti i sur. 1996; Stone i sur. 2003; Seeman i sur. 2003; Beouxsein i Karasik 2006). Definitivna potvrda koštane strukture dobiva se histološkim analizama kosti. U ovom istraživanju koristili smo bedrene kosti koje su korištene i u drugim istraživanjima koštanoga sustava jer kako u ljudskom tako i u organizmu štakora bedrene kosti su najduže te imaju značajnu ulogu u mehaničkoj potpori.

Prema provedenim istraživanjima učinaka retinoida na koštani sustav, histomorfometrijskim analizama koštanoga tkiva pokazano je povećanje subperiostalne osteoklastične koštane resorpcije, dok je resorpcija kosti suprimirana u spužvastoj (spongioznoj) kosti (Kneissel i sur. 2005). Histomorfometrija ima dijagnostičku vrijednost kao metoda kojom se određuje kvaliteta kosti tj. njena unutarnja struktura za razliku od primjerice DXA, kojom se dobiva količina kosti koja nije jedina odrednica mehaničke čvrstoće i jakosti kosti.

Iz histološke analize u ovom istraživanju u usporedbi s kontrolnom skupinom, vidljivo je da korteks dijafize femura štakora obrađenog s retinoičnom kiselinom karakterizira stanjivanje praćeno značajnom poroznošću uzrokovanom formiranjem brojnih intrakortikalnih šupljina različitih veličina (Slika 36e, f), kao i mjestimično erodirana endostalna površina kosti (unutarnja površina kosti) (Slika 36g). Šupljine su s kortikalne strane djelomično omeđene

osteoidom, dok su na luminalnoj površini mjestimično uočeni osteoklasti (Slika 36f), koji su također nađeni i u udubljenjima erodirane endostalne površine kosti (Slika 36g).
U animalnom modelu pokazano je da primjena retinoida u velikoj dozi dovodi do povećane periostalne razgradnje u odnosu na periostalnu dogradnju ili odlaganje minerala, što u konačnici vodi smanjenjem promjera kosti i gubitkom minerala (Teelmann i sur. 1989; Hotchkiss i sur. 2006). Aktivnost koštanih stanica u ovom istraživanju prikazana je mjerenjem biokemijskih biljega koštane pregradnje koji su enzimi ili bjelančevine koji nastaju tijekom izgradnje ili razgradnje koštanog tkiva a mjere se u serumu ili urinu. Određivani su u serumu biljeg koštane izgradnje – osteokalcin i biljeg koštane razgradnje Beta CrossLaps (β-CTx). Analizom podataka nije utvrđena statistička značajnost u vrijednostima osteokalcina kod zdrave kontrolne skupine u odnosu na RMO skupinu, iako se zapaža snižena razina osteokalcina kod RMO skupine (Slika 37), što govori u prilog smanjenje koštane izgradnje kod RMO štakora. Analizom podataka vrijednosti β-CTx-a utvrđen je statistički značajan porast između RMO skupine i zdrave kontrolne skupine ($P < 0,01$) što govori u prilog povećane osteoklastične aktivnosti i koštane razgradnje kod RMO štakora (Slika 38).

Postoje istraživanja koja govore o fizikalnim karakteristikama kosti kao glavnim odrednicama koštane snage. U njima je pokazano kako primjena velikih doza 13cRA nije dovela do promjena koštane mase tj do promjena BMD-a, ali su biomehaničkim testovima i promjenama fizikalnih karakteristika kosti u smislu smanjenja volumena i promjera kosti dokazani negativni učinci retinola na koštani sustav. Tako BMD kao zasebno mjerenje prema tim autorima nije najprecizniji pokazatelj u otkrivanju negativnih utjecaja velikih doza vitamina A na koštani sustav (Johansson i sur. 2002; Ammannu i sur. 2003; Lind i sur. 2006).

U ovom istraživanju radi točnosti prikaza rezultata prikazani su indeksi težina bedrenih kostiju (g/TT svake pojedinačne životinje) i relativne težine kosti (g/100g TT).

Rezultati mjerenja lijevih bedrenih kosti (Slika 30) i desnih bedrenih kosti (Slika 31) pokazuju statistički značajan porast relativnih težina kosti između zdrave kontrolne skupine i RMO skupine ($P < 0,05$) ($P < 0,001$). Jednako tako rezultati mjerenja indeksa težina lijevih bedrenih kostiju (Slika 28) i desnih bedrenih kostiju (Slika 29) podudaraju se s rezultatima relativnih težina sa istom statističkom značajnošću ($P < 0,05$) ($P < 0,001$).

Rezultati geometrijskih koštanih parametara analizirani su na desnim bedrenim kostima Mjereni su duljina kosti (veliki trohanter - kondil), antero - posteriorna dužina (AP) i medio-lateralna dužina (ML) proksimalnog dijela kosti, srednjeg dijela kosti (dijafize) i distalnog

dijela kosti (Slike 32 do 35), a rezultati su radi točnosti prikaza preračunati na 100 g tjelesne težine. Analizom podataka dobivenih mjerenjem duljina desnih bedrenih kosti (Slika 32) nisu utvrđene statistički značajne razlike između RMO skupine i zdrave kontrolne skupine u duljini kosti, iako zdrava skupina na grafu pokazuje nešto veću duljinu u odnosu na RMO skupinu.

Analizama ML i AP promjera na sva tri koštana segmenta nije vidljiva statistički značajna promjena kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, izuzev porasta ML dužine dijafiznog segmenta kosti (Slika 34) između zdrave kontrolne skupine u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$). Iako u ovim geometrijskim mjerenjima ne nalazimo statističkih značajnosti ipak se u većini mjerenja prate povišeni parametri kod zdrave kontrolne skupine u odnosu na RMO (Slike 33, 34, 35).

Analizom rezultata mjerenja BMC-a i BMD-a u ovom istraživanju zapažen je statistički značajan porast BMC-a u proksimalnom i distalnom dijelu kosti (Slika 26) između zdrave kontrolne skupine i RMO skupine ($P < 0,05$) i statistički značajan porast BMD-a u proksimalnom dijelu kosti (Slika 27) između zdrave kontrolne skupine i RMO skupine ($P < 0,05$).

Iz navedenih rezultata može se zaključiti kako obrada štakora s 13cRA u dozi od 80 mg kg^{-1} *ig* primjene u vremenskom razdoblju od 14 dana dovodi do statistički značajne promjene koštane mase u smislu smanjenja BMC-a i BMD-a u proksimalnim i distalnim koštanim segmentima kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, dok nisu zapažene statistički značajne promjene fizikalnih obilježja kosti, iako su promjene fizikalnih obilježja kosti išle u smjeru smanjenja svih parametara kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolu. Slabije prikazan statistički značajan utjecaj na fizikalna obilježja kosti može se objasniti kratkim periodom primjene retinoične kiseline. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju mogu se usporediti s drugim radovima u kojima su korištene različite niže i više doze 13cRA kod štakora u dužem vremenskom periodu. Prema tim istraživanjima tek velike doze 13cRA (30 mg kg^{-1}/dan) u dužem vremenskom periodu (15 - 20 tjedana) dovode do smanjenja BMD-a, promjera kosti (engl. *bone diametar*), debljine kosti (engl. *cortical thickness*), kao i do spontanih prijeloma (Hotchkiss i sur. 2006).

Obzirom na navedeno retinoični model osteoporoze (RMO) u štakora koji je korišten u ovom istraživanju pokazuje se kao idealan predklinički model za proučavanje spojeva koji djeluju na komponente oksidativnog stresa kao značajnog patogena u sekundarnoj osteoporozi, a doze

13cRA od 80 mg kg^{-1}su dovoljne da u kratkom vremenskom razdoblju dovedu do nastanka osteoporotičnih promjena bez uočenih sponatano nastalih prijeloma.

5.2. Učinci flavonoida na osteoporotske promjene u RMO štakora i njihova usporedba s alendronatom

Osnovni cilj ovoga istraživanja jest istražiti protuoksidativna, protuupalna, fitoestrogenska i regenerativna svojstva, te moguću toksičnost svakog od pojedinačnih flavonoida na koštani sustav i cjelokupni organizam RMO štakora i usporediti sa alendronatom koji je danas prihvaćeni i široko primijenjen lijek u liječenju osteoporoze.

5.2.1. Učinak flavonoida i alendronata na vrijednosti TT i težine organa u RMO štakora

Alendronat spada u skupinu bisfosfonata, snažan je nehormonski inhibitor resorpcije kosti osobito na mjestima pojačane pregradnje i trenutno predstavlja prvi lijek izbora u liječenju osteoporoze. Uz njegove povoljne učinke na koštani metabolizam i široku kliničku primjenu,postoje brojne poteškoće vezane uz način primjene lijeka i neželjene učinke.

Kod oralne primjene lijeka zapaženi su neželjeni učinci vezani uz gastrointestinalni sustav, bol u abdomenu, mučnina, povraćanje, proljevi, upala jednjaka, suženje jednjaka, gastrični ulkus. Podatci ukazuju kako se neželjeni učinci mogu prepisati lokalno iritirajućem djelovanju alendronata koji uzrokuje upalu kroz infiltraciju neutrofila i oksidativna oštećenja u tkivima.

Intravenska primjena bisfosfonata može izazvati čitav niz simptoma nalik gripi, kao što su subfebrilna temperatura (37,8 °C), leukocitoza, iscrpljenost, mialgija. Nadalje, brza intravenska primjena može djelovati nefrotoksično i izazvati akutnu nekrozu tubula. Ostale moguće neželjene pojave su hipokalcijemija, konjuktivitis, uveitis, skleritis, astma, eritem, flebitis te poremećaji središnjeg živčanog sustava (glavobolja, omaglica, parestezija, poremećaj okusa), a zabilježena je povećana pojavnost tumora dojke u žena u postmenopauzi kao i atipični lomovi kosti nakon dugotrajnog unosa (Sambrook i sur. 2006; Chiang i sur. 2012; Gatti i sur. 2015; Fadda i sur. 2015; Iglesias i sur. 2015; Rennert i sur. 2016; Gokkus i sur. 2016).

Kao ozbiljna i iznimno teško lječiva komplikacija pri primjeni proturesorptivnih lijekova javlja se osteonekroza čeljusti tzv. bisfosfonatima inducirana osteonekoza čeljusti (BRONJ; engl.

Bisphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw(Ficcara 2005;Agencija za lijekove i medicinske proizvode 2012).

Do sada objavljena istraživanja o flavonoidima kao potencijalnoj alternativi alendronatu iznose dokaze o njihovom pozitivnom učinku na razne organske sustave. Najveći dio zaštitne uloge flavonoida u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja ("hvatanja") elektrona slobodnog radikala, inhibiciji enzima koji su uključeni u nastanak reaktivnih radikala kisika i dušika i aktiviranju protuoksidacijskih enzima (Kazazić 2004). U dosadašnjim istraživanjima najjaču zaštitnu ulogu kao protuoksidans pokazao je kvercetin (Ban i sur. 1989; Mirzoeva 1997; Cotelle 2001; Heim i sur. 2002; Prior 2003).

Istraživanja su pokazala da prehrana bogata flavonoidima smanjuju ukupni kolesterol, LDL-lipoproteine i trigliceride u plazmi što pokazuje pozitivan učinak u zaštiti od ateroskleroze kao izravne posljedice hiperkolesterolemije i dislipidemije (Honore i sur. 1997; DiCarlo i sur. 1999; Middleton i sur. 2000). Brojna istraživanja pokazuju korisne imunomodulatorne učinke flavonoida koje koristimo u prehrani povezane s protutumorskim djelovanjem i utjecajem na autoimune bolesti (Schwartz i sur.1982; Berteli i sur. 1999; Rose i sur. 2000; Oršolić i sur. 2003; Oak i sur. 2005; Zhang i sur. 2005; Oršolić i sur. 2007; Bergman Jungestrom i sur. 2007; Zhao i sur. 2007; Liu i sur. 2010). Opisana su protualergijska svojstva flavonoida (Reuben 1998; Di Carlo i sur. 1999). Epidemiološka istraživanja te animalna i klinička istraživanja *in vitro* i *in vivo* podupiru mišljenje da flavonoidi kao fitoestrogeni pored ostalih učinaka mogu prevenirati gubitak koštane mase povezane s menopauzom (Coxam 2008), te da učinak prehrane s visokim udjelom fitoestrogena smanjuje pojavnost o estrogenu ovisnih malignih tumora (dojka, crijevo, prostata) (Keinan-Bokeri sur. 2004).

Kako je navedeno brojni su pozitivni učinci flavonoida i alendronata. U ovom istraživanju vaganjem životinja tijekom pokusa, te praćenjem promjena mase TT životinja procijenjena je toksičnost istraživanih pripravaka (retinoične kiseline, alendronata, krizina, proantocijanidina, naringenina, ikarina i kvercetina) na razini cjelokupnog organizma. Gubitak na težini je pokazatelj toksičnosti. Nadalje mjerene su težine svakog pojedinog organa, a rezultati su korišteni za procjenu toksičnosti istraživanih pripravaka, te utvrđivanje fitoestrogenskog učinka na težinu maternice.

Rezultati pokazuju da nema statistički značajne ($P > 0,05$) promjene u TT između zdrave kontrolne skupine i RMO skupine tijekom pokusa, kao ni između RMO skupina obrađenih s flavonoidima, osim statistički značajnog povećanja TT ($P < 0,05$) u životinja obrađenih

ikarinom u odnosu na obradu životinja alendronatom u dozi od 40 mg kg^{-1}. Ipak mjerenjem postotka TT tijekom pokusa vidljiv je prirast težina RMO štakora obrađivanih flavonoidima u dozi od 100 mg kg^{-1} (ikarin 6,73% - 15,86%; naringenin 8,89% - 11,07%; krizin 6,87% - 13,29%; proantocijanidin 7,52% - 11,40%; kvercetin 6,02% - 8,95%), dok je kod RMO štakora obrađivanih sa alendronatom u dozi od 40 mg kg^{-1} zabilježen pad TT od 2,50% - 0,55%. Kod skupine obrađene s alendronatom u dozi od 2 mg kg^{-1} vidljiv prirast težine od 9,78% - 13,15% (Slika 25). Iz navedenih rezultata može se zaključiti da flavonoidi nemaju toksičan učinak na cjelokupni organizam koji bi se odrazio padom TT, dok alendronat u višoj dozi pokazuje toksičan učinak koji je prikazan padom TT.

Iz rezultata mjerenja težina organa nisu vidljive statistički značajne promjene indeksa težina (Tablica 19) i relativne težine (Tablica 20) slezene i bubrega kod ispitivanih skupina. Međutim, vidljivo je statistički značajno povećanje indeksa težina jetre i relativne težine jetre kod skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 2 mg kg^{-1} u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$) (Tablice 19 i 20).

Iz navedenih rezultata može se zaključiti kako ispitivani uzorci nemaju statistički značajnog utjecaja na težine slezena i bubrega što znači da nema niti potencijalno izraženog toksičnoga učinka na navedene organe. Povećanje jetre ukazuje na jetreno oštećenje. Povećanje težine jetre kod skupina obrađivanih proantocijanidinom i niskom dozom alendronata u ovom slučaju nije povezano s jetrenim oštećenjem, jer biokemijske analize nisu pokazale statistički značajnih razlika u jetrenoj enzimskoj aktivnosti u krvi RMO štakora nakon obrade s flavonoidima i alendronatom (Tablica 17), a koja bi upućivala na jetreno oštećenje. U dosadašnjoj literaturi nisu navedeni slični rezultati da bi se usporedili sa ovim istraživanjem. Ovo povećanje težine jetre kod skupina obrađenih proantocijanidinom i alendronatom 2 mg kg^{-1} u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom može se povezati s prirastom tjelesnih težina pa tako i organa životinja, koji su veći kod navedenih skupina u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom.

U prethodnim poglavljima prikazana je poveznica između retinoične kiseline, OS i osteoporoze. Smatra se kako 13cRA uzrokuje OS i stvaranje ROS-a koji potiskuju osteoblastičnu aktivnost a povećavaju aktivnost osteoklasta, što ako prevlada prirodne protuoksidativne mehanizme može dovesti do opsežnog gubitka koštane mase. Povećanje razine OS je jedan od uzroka smanjene estrogenske aktivnosti u organizmu. Smanjena estrogenska aktivnost dovodi do pojave upalnih citokina koji potiču osteoklastičnu aktivnost, a osteoblaste uvode u apopotozu što dovodi do gubitka koštane mase. Iz navedenoga možemo zaključiti da retinoična kiselina

smanjuje razinu estrogena u krvi (Muthusami i sur, 2005), ima negativan utjecaj na koštani sustav i vodi smanjenju mase maternice, točnije vodi atrofiji maternice.

Fitoestrogeni su spojevi slični estogenu i istražuju se kao moguća alternativa u liječenju i prevenciji mnogih bolesti koje nastaju kao posljedica estrogenskog manjka. Pored ostalih učinaka, dokazano je da fitoestrogeni mogu prevenirati gubitak koštane mase povezane sa menopauzom (Coxam 2008), međutim još ne postoje jasne terapijske smjernice o njihovoj primjeni u preventivne ili kurativne svrhe kod osteoporoze.

Iz rezultata ovoga istraživanja vidljivo je statistički značajno povećanje relativnih težina maternica kod skupina obrađenih ikarinom i krizinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) ($P < 0,05$) (Slika 64, Tablica 22) i statistički značajno povećanje indeksa težina maternice između skupine obrađene ikarinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,001$) (Slika 63, Tablica 21).

Danas je poznato mnogo fitoestrogenskih molekula koje prema njihovoj kemijskoj strukturi (broju fenolnih prstenova i supstitienata) spadaju u izoflavonoide ili izoflavone.

Ikarin je flavonoid koji spada u skupinu flavonola, a krizin u skupnu flavona. Iako ne spadaju u fitoestrogene ikarin i krizin prema dobivenim rezultatima statistički značajno povećavaju masu maternice kod RMO štakora. Tako možemo zaključiti da ovi flavonoidi potiču estrogensku aktivnost ili djeluju na receptor estrogena, tj. pokazuju fitoestrogensku aktivnost.

Iako nema statistički značajnog povećanja težine maternica kod drugih skupina, ipak se zapaža povećanje težina maternica kod RMO štakora u svim skupinama nakon obrade flavonoidima i alendronatom, među kojima skupina obrađena ikarinom znatno iskače u odnosu na druge skupine (Slika 63). Ovaj podatak o pozitivnom fitoesrtogenskom djelovanju potvrđuju i druga dosadašnja istraživanja. Dokazano je da ikarin može oponašati učinak estrogena suprimirajući osteoklastogenezu putem modulacije ekspresije OPG/RANKL u osteoblastičnim stanicama. Također je opisano kako ikarin aktivira ERα fosforilaciju u staničnoj kulturi osteoblasta, te putem ligand-neovisne aktivacije dolazi do brze aktivicije ER u osteoblastičnim stanicama (Mok i sur. 2010).

Iz navedenih rezultata može se zaključiti da svaki od pojedinih flavonoida korištenih u ovom istraživanju kao i alendronat posjeduju fitoestrogenski učinak koji se prati porastom težine maternice kod RMO štakora, uz statistički značajan učinak ikarina i krizina.

5.2.2. Učinci krizina u RMO štakora i usporedba s alendronatom

Krizin je prirodni flavonoid koji spada u skupnu flavona (Slika 12). Dosadašnja istraživanja ne govore mnogo o učincima krizina na koštani sustav, a molekularni mehanizmi djelovanja krizina nisu u potpunosti istraženi i jasni. *In vitro* istraživanja pokazuju kako krizin može uzrokovati apoptozu stanica ljudskog karcinoma (Pichichero i sur. 2011; Khan i sur. 2011).U *in vivo* istraživanjima pokazan je imunosupresivni učinak krizina i zaštitni učinak prema jetrenim stanicama (Li i sur. 2011; Khan i sur. 2011; Lv i sur. 2011). Također se opisuju vazodilatacijski učinci na krvne žile (Villar i sur. 2004) i sedirajući učinak krizina (Zanolii sur. 2000). O preventivnim učincima flavonoida, pa tako i krizina u nastanku osteoporotičnih promjena u RMO štakora govori istraživanje iz 2013. g. koje pokazuje jasan preventivni učinak u svim mjerenim koštanim parametrima uz značajno smanjenje koštanih biljega koji ukazujuna smanjenje koštane pregradnje (Oršolić i sur. 2013).

Prema rezultatima ovoga istraživanja krizin nije pokazao pad u TT RMO štakora, te prema tom parametru ne pokazuje toksičnost na razini cjelokupnog organizma (Slika 25), jednako tako ne pokazuje štetni učinak ako gledamo parametre težina organa (slezena , bubreg , jetra), a na težinu maternice pokazuje statistički značajan porast težine što upućuje na fitoestrogensko djelovanje krizina (Slike 63 i 64, Tablice 21 i 22).

U usporedbi s alendronatom u dozi od 40 mg kg^{-1} kod kojeg je zabilježen pad TT od 2,50% - 0,55%, skupina obrađena krizinom pokazuje bolje rezultate, odnosno alendronat u dozi od 40 mg kg^{-1} pokazuje toksičnost na cjelokupni organizam koja se odražava u padu TT životinja, dok je kod skupine obrađene s alendronatom u dozi od 2 mg kg^{-1} vidljiv prirast težine od 9,78% - 13,15% koji je sličan prirastu skupine obrađene krizinom (Slika 25). Alendronat u obje ispitivane doze ne pokazuje statistički značajnu razliku u težini organa u odnosu na krizin (Tablice 19 i 20).

Rezultati mjerenja koštane mase kod skupine obrađene krizinom ne pokazuju statistički značajne promjene BMC-a i BMD-a mjerenih u oba femura u odnosu na skupine obrađene ostalim flavonoidima i alendronatom, te u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. Međutim iako nema statističkih promjena, rezultati upućuju na povećanje BMC-a i BMD-a kod skupine obrađene krizinom u odnosu na RMO skupinu (Slike 26 i 27), što govori u prilog povećanja koštane mase u životinja kod kojih je osteoporoza uzrokovana retinoičnom kiselinom.

Zapaženo je povećanje BMC-a kod skupina obrađenih alendronatom u obje ispitivane doze u odnosu na RMO skupinu i to sa vidljivom statističkom značajnosti skupine obrađene

alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) (Slika 26). Slični rezultati su vidljivi kod mjerenja BMD-a, gdje nema statističkih promjena između alendronata u obje ispitivane doze i skupine obrađene krizinom, iako skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) pokazuju statistički značajan porast BMD-a u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) (Slika 27).

Iz podataka jasno se vidi da je mineralna gustoća kostiju u osteoporozi izrazito smanjena u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, o čemu govore dosadašnja istraživanja o utjecaju retinoične kiseline na koštani sustav (Fahmy i Soliman 2009). Rezultati ovoga istraživanja jasno ukazuju da primjena krizina, ali i alendronata može značajno pomoći u sprječavanju gubitka mineralne gustoće kostiju uslijed osteoporoze.

Prema rezultatima indeksa težina i relativnih težina bedrenih kostiju kao i geometrijskih mjerenja koštanih parametara zapaženo je povećanje težina i geometrijskih parametara femura kod skupine obrađene krizinom u odnosu na RMO skupinu (Slike 28 do 35). Ovi rezultati ne pokazuju statističke značajnosti ali upućuju na pozitivno djelovanje krizina na koštani sustav u RMO štakora. Niti ovdje alendronat u obje ispitivane doze ne pokazuje statistički značajne razlike u rezultatima u odnosu na skupinu obrađenu krizinom, međutim vidljiv je statistički značajan porast indeksa težine kosti i relativne težine kosti kod skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu u lijevom femuru ($P < 0,05$) i desnom femuru ($P < 0,01$) (Slika 28, 29, 30, 31). Isto tako zapaža se statistički značajan porast svih geometrijskih parametara femura kod skupina obrađenih alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) (Slike 32 do 35).

Rezultati biokemijskih biljega koštane izgradnje pokazuju statistički značajan porast vrijednosti osteokalcina u serumu kod skupine obrađene krizinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) (Slika 37), dok nema statistički značajnog porasta biljega koštane razgradnje (β-CTx-a) kod skupine obrađene krizinom u odnosu na RMO skupinu (Slika 38). Ovi rezultati upućuju na pozitivno djelovanje krizina na koštanu izgradnju kod RMO štakora. U usporedbi s alendronatom u obje doze nije vidljiva statistički značajna razlika u rezultatima biokemijskih biljega koštanoga preokreta u odnosu na skupine obrađene krizinom i RMO skupinu (Slike 37 i 38).

Skupine obrađene krizinom ne pokazuju statistički značajan utjecaj na hematološke (Tablice 15 i 16, Slika 42) i biokemijske (Tablice 17 i 18, Slike 43, 44 i 45) parametre kod RMO štakora. Također nije zabilježena statistički značajna razlika u rezultatima između alendronata u obje doze i skupine obrađene krizinom ili RMO skupine. Međutim postoji statistički značajno

smanjenje broja eritrocita i hematokrita kod skupine obrađene alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) (Tablica 15) i statistički značajan porast broja leukocita kod skupine obrađene alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) ($P < 0,05$) (Tablica 15). Ovi rezultati upućuju na negativan utjecaj alendronata na crvenu krvnu sliku i povećanje broja leukocita što ukazuje na proces upale.

Analizom biokemijskih parametara nema statistički značajnih razlika između alendronata u obje doze i krizina (Tablice 17 i 18, Slike 43, 44 i 45), međutim praćenjem vrijednosti aktivnosti enzima aspartat - aminotransferaze (AST), alanin - aminotransferaze (ALT), gama - glutamiltransferaze (GGT), alkalne fosfataze (ALP), laktat - dehidrogenaze (LDH) i amilaze (AMS) zapažaju se niže vrijednosti kod skupina obrađivanih s krizinom i alendronatom u odnosu na RMO skupinu. Jednako tako alendronat u obje ispitivane doze u odnosu na krizin kod ovih biokemijskih parametara pokazuje uvijek više vrijednosti. Također su zapažene više vrijednosti glukoze u krvi kod skupina obrađivanih alendronatom u obje ispitivane doze. Zanimljiv je podatak sniženih vrijednosti ureje i kreatinina kod skupina obrađenih alendronatom u obje ispitivane doze i krizinom u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (Tablica 18). Iz prikazanih hematoloških i biokemijskih rezultata krizin se pokazao povoljnijim od alendronata u obje ispitivane doze.

Rezultati koncentracija minerala kalcija i fosfora kod skupine obrađene krizinom i skupina obrađenih alendronatom u obje doze pokazuju slične vrijednosti, međutim u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu i RMO skupinu vrijednosti su više, ali bez statističke značajnosti što može upućivati na mehanizam povećane koštane resorpcije, međutim podatci mjerenja koštane mase ukazuju na povoljan učinak krizina i alendronata (Slika 40 i 41).

Ranije u tekstu bilo je riječi o povezanosti 13RcA, OS i ROS-a sa nepovoljnim utjecajem na koštani sustav u smislu gubitka koštane mase, odnosno sa razvojem osteoporoze. U ovom istraživanju ispitano je protuoksidativno djelovanje krizina i alendronata mjerenjem enzima oksidativnog stresa u uzorcima tkiva jajnika, bubrega, slezene i jetre.

RMO skupina pokazuje povišene vrijednosti MDA u svim organima u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu što se i očekuje, a vrijednosti MDA u svim organima su veće kod obje ispitivane doze alendronata u odnosu na skupinu obrađenu krizinom.

Analizom podataka zapažena je statistički značajno povišena koncentracija malondialdehida (MDA) u jajniku (Slika 47) kod skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu

kontrolnu skupinu ($P < 0,001$); u jetri (Slika 50) kod skupine obrađene alendronatom (40 i 2 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$; $P < 0,01$).

Analizom podataka koncentracije glutationa (GSH) RMO skupina pokazuje niže vrijednosti u svim organima u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, što je odraz povećanog OS uzrokovanog s 13RcA. Vrijednosti GSH su više u svim organima osim bubrega kod skupine obrađene krizinom u odnosu na skupine obrađene alendronatom u obje ispitivane doze, a sve tri skupine pokazuju više vrijednosti GSH u odnosu na RMO skupinu.

Statistički značajni rezultati vrijednosti GSH u organima kretali su se kao značajno snižena vrijednost GSH u tkivu jajnika kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,01$) i skupine obrađene krizinom ($P < 0,01$) (Slika 51); statistički značajno snižena vrijednost GSH u tkivu bubrega kod RMO skupine u odnosu na skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) ($P < 0,01$) i alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,01$) (Slika 52).

Rezultati razina SOD u svim organima pokazuju povišene vrijednosti kod skupine obrađene krizinom u odnosu na skupine obrađene alendronatom u obje ispitivane doze. Nisu zapažene statistički značajne razlike u razini SOD-a kod ove tri skupine u ispitanim organima (Slika 55, 56, 57 i 58).

Rezultati razine katalaze (CAT) u analiziranim organima pokazuju statistički značajno povećane vrijednosti CAT aktivnosti u tkivu jajnika kod skupine obrađene krizinom u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,001$); skupine obrađene krizinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) (Slika 59). Podatci ne pokazuju statistički značajne razlike u razini CAT između krizina i alendronata u obje ispitivane doze u svim analiziranim organima. Međutim krizin povećava razinu CAT u svim organima u odnosu na RMO skupinu (Slika 59, 60, 61 i 62).

Iz navedenih podataka može se zaključiti kako flavonoid krizin ali i alendronat u obje ispitivane doze imaju brojne pozitivne učinke na koštano tkivo koje pokazuje znakove osteoporoze što je vidljivo iz rezultata mjerenja koštane mase obje bedrene kosti. Jednako tako krizin i alendronat u obje doze pozitivno utječu na indeks težina i relativnih težina bedrenih kostiju kao i geometrijske mjere koštanih parametara. Krizin pokazuje statistički značajno povećanje osteokalcina kod RMO štakora, dok alendronat u obje ispitivane doze ne pokazuje povećanje biljega koštane izgradnje. Alendronat pokazuje negativan utjecaj na crvenu krvnu sliku i uzrokuje povećanje broja leukocita u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, dok krizin nema statistički značajnog utjecaja na hematološke parametre. Iako nema statistički značajnih razlika

između alendronata u obje doze i krizina u biokemijskim parametrima, vrijednosti enzimskih aktivnosti (AST, ALT, GGT, ALP, LDH, amilaze) izmjerene su uvijek više kod alendronata u obje ispitivane doze u odnosu na krizin, također su zapažene više vrijednosti glukoze u krvi kod skupina obrađivanih alendronatom. Ovi rezultati upućuju na povoljniji utjecaj krizina na hematološke i biokemijske parametre u odnosu na alendronat u obje ispitivane doze. Rezultati su pokazali pozitivan utjecaj krizina na protuoksidativni sustav tijela i to tako da doprinosi povećanju sinteze koncentracije glutationa, spoja koji kontrolira redoks stanje u stanicama, smanjuje oksidativni stres preko kontrole lipidne peroksidacije i povećanja koncentracije SOD-a i katalaze. U svim navedenim parametrima pokazuje se kao bolji protuoksidans od alendronata koji čak pokazuje statistički značajno povećanje lipidne peroksidacije tkivu jajnika i jetre u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu. Ako gledamo toksičnost na cjelokupni organizam mjerenjem TT životinja, krizin u usporedbi s alendronatom u dozi od 40 mg kg^{-1} koji pokazuje pad TT od 2,50% - 0,55%, pokazuje bolje rezultate. Navedeni pozitivni učinci krizina na metabolizam kosti i cjelokupni organizam RMO štakora ukazuju da krizin može biti učinkovit u liječenju stečene osteoporoze, a njegova laka dostupnost, ekonomska isplativost, nedostatak toksičnosti, fitoestrogensko djelovanje kao i povoljnije protuoksidativno i regenerativno djelovanje pokazuju prednost u odnosu na alendronat koji je danas prihvaćen lijek u stečenoj osteoporozi.

5.2.3. Učinci proantocijanidina u RMO štakora i usporedba s alendronatom

Proantocijanidini spadaju u flavanolnu podskupinu flavonoida. Vrlo je malo istraživanja koja govore o učinku ovih flavonoida na koštani sustav. Istraživanja pokazuju protuoksidativne, protuupalne i hipolipidemične učinake ovih spojeva, koji se proučavaju u smjeru njihove zaštitne uloge vezane uz srce i krvožilni sustav (Rein i sur. 2000; Vitseva i sur. 2005; DalBo i sur. 2008; Bladé i sur. 2010). *In vitro* istraživanja na koštanom tkivu pokazuju da proantocijanidini djeluju na sazrijevanje osteoklasta i njihovu fiziologiju što ovisi o njihovoj dozi. Doze od 100 μg mL^{-1} bile su toksične za osteoklaste, dok su doze od 50 μg mL^{-1} uzrokovale 95% inhibiciju RANKL. S druge strane proantocijanidi su doveli do smanjenog otpuštanje peptida kolagena iz čega se posredno može zaključiti da smanjuju koštanu razgradnju (Tanabe i sur. 2011). Prema *in vivo* istraživanju (Yahara i sur. 2005) koje se bavilo učinkom proantocijanida na koštani sustav štakora ovisno o unosu kalcija hranom zapaženo je da ovi spojevi imaju koristan učinak u stvaranju kosti kao i u povećanju koštane snage kod stanja koštane slabosti (engl. *bone debility*) povezanih s niskim unosom kalcija (Yahara i sur.

2005). Istraživanje (Oršolić i sur. 2013) pokazuje značajan preventivni učinak proantocijanidina na koštano tkivo na osteoporotskom modelu štakora.

U ovom istraživanju uspoređeno je djelovanje proantocijanidina sa alendronatom u dozama 2 i 40 mg kg^{-1} na koštani sustav kao i cjelokupni organizam RMO štakora.

Prema rezultatima ovoga istraživanja nakon prouzrokovanja osteoporoze s 13cRA, obrada životinja s proantocijanidinom u dozi od 100 mg kg^{-1}dovela je do prirasta težine od 18. – 30. dana za 7,52% - 11,40%. što prema tome ne ukazuje na toksičnost ovog spoja na razini cjelokupnog organizma, dok je kod skupine obrađene alendronatom u dozi od 40 mg kg^{-1} zabilježen je pad TT od 2,50% - 0,55% (Slika 25). Nisu zabilježene statistički značajne promjene u težini organa između skupina obrađenih proantocijanidinom i alendronatom u obje ispitivane doze kod RMO štakora. Vidljivo je statistički značajno povećanje indeksa težina jetre kod skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 2 mg kg^{-1} u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$) međutim nema statističke razlike u težinama organa ovih skupina u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (Tablice 19 i 20). Proantocijanidini ne pokazuju statistički značajan utjecaj na težinu maternice u odnosu na druge ispitivane spojeve, što upućuje na slabije fitoestrogensko djelovanje, ali u odnosu na RMO skupinu pokazuju povećanje od 20,91 – 23,88% (Slike 63 i 64, Tablice 21 i 22).

Analizom podataka mjerenja koštane mase utvrđeno je statistički značajno smanjenje BMC-a i BMD-a proksimalnog i distalnog dijela femura (Slike 26 i 27) kod RMO skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) što je u sukladu s prijašnjim istraživanjima utjecaja retinoične kiseline na koštani sustav (Wei *i sur*, 2007). Statistički značajno povećanje BMC-a i BMD-a vidljivo je kod skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$); skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$ i $P < 0,01$) i na skupinu obrađenu alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,001$) i skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,001$). Rezultati ukazuju na pozitivan trend proantocijanidina kao i alendronata u obje ispitivane doze na koštanu masu u RMO štakora, jednako tako proantocijanidin pokazuje statistički značajno bolje rezultate na koštanu masu RMO štakora u odnosu na alendronat 2 mg kg^{-1}. Ovaj pozitivan učinak proantocijanidina na koštani sustav potvrđuju vrijednosti koštanog kalcija i fosfora koje pokazuju isti trend kao i rezultati BMC-a i BMD-a (Slike 40 i 41).

Rezultati mjerenja težina femura (Slike 28, 29, 30 i 31) pokazuju statistički značajan porast težina kosti samo skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu, dok proantocijanidin pokazuje porast težina femura u odnosu na RMO skupinu ali bez statističke značajnosti.

Prema rezultatima geometrijskih mjerenja koštanih parametara zapaženo je statistički značajno povećanje geometrijskih parametara femura kod skupine obrađene proanocijanidinom u donosu na skupinu obrađenu krizinom ($P < 0,01$) i kod skupine obrađene alendronatom 2 mg kg^{-1} u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$). Rezultati između alendronata i proantocijanidina ne pokazuju statističke značajnosti u geometrijskim parametrima femura.

Iz navedenoga može se zaključiti da alendronat ipak pokazuje bolji utjecaj na težinu kosti i geometrijske parametre femura u odnosu na proantocijanidin, iako oba spoja pokazuju pozitivan trend u navedenim parametrima kod RMO štakora (Slike 32, 33, 34 i 35), što je u sukladu s rezultatima Oršolić i sur. (2013).

Rezultati biokemijskih biljega koštane izgradnje pokazuju statistički značajan porast vrijednosti osteokalcina u serumu kod skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) (Slika 37), dok nema statistički značajnog porasta biljega koštane razgradnje (β-CTx-a) kod skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na RMO skupinu (Slika 38). Ovi rezultati upućuju na pozitivno djelovanje proantocijanidina na koštanu izgradnju kod RMO štakora. U usporedbi s alendronatom u obje doze nije vidljivo statistički značajnih razlika u rezultatima biokemijskih biljega koštanoga preokreta u odnosu na skupine obrađene proantocinajidinom i RMO skupinu (Slike 37 i 38), ali proatocijanidin pokazuje više vrijednosti koštane izgradnje od alendronata u ispitivanim dozama kod RMO štakora.

Hematološka analiza pokazala je statistički značajno povišene vrijednosti leukocita za sve skupine u odnosu na zdravu kontrolu (Tablica 15). Proantocijanidin ne pokazuje statistički značajnog utjecaja na ostale hematološke parametre, međutim zapaženo je statistički značajno smanjenje broja eritrocita i hematokrita kod skupine obrađene alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) (Tablica 15). Ovi rezultati upućuju na negativan utjecaj alendronata na crvenu krvnu sliku, a proantocijanidin pokazuje stimulativno djelovanje na imunološki sustav, što je u sukladu s dosadašnjim istraživanjima (Huang *i sur*. 2013).

Biokemijski pokazatelji u serumu su pokazali niže vrijednosti alkalne fosfataze (ALP) i laktat dehidrogenaze (LDH) kod skupine obrađene alendronatom u odnosu na RMO skupinu (Tablica 17, Slike 44 i 45), dok je LDH vrijednost bila niža kod skupine obrađene proantocijanidinom

(Slika 45) što ukazuje na protuupalni učinak navedenih pripravaka i smanjenje koštane razgradnje kod RMO štakora.

Analizom podataka lipidne peroksidacije u ispitivanim organima proantocijanidin i alendronat 2 (mg kg^{-1}) pokazuju statistički značajno više vrijednosti MDA u jajnicimau odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) ($P < 0,001$) (Slika 47). Analizom koncentracije MDA u jetri (Slika 50) zapažena je statistički viša vrijednost kod skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$); skupine obrađene alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,01$). Povećana koncentracija MDA u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu odraz je povećanog OS uzrokovanog 13cRA. Zapažene su statistički značajno veće vrijednosti MDA u slezeni (Slika 49) kod skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,01$) i skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na skupinu obrađenu kvercetinom ($P < 0,05$), te u jetri između skupine obrađene alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu kvercetinom ($P < 0,05$) što ukazuje na slabiji protuoksidativni utjecaj proantocijanidina na lipidnu peroksidaciju u ispitivanim organima u odnosu na naringenin, kvercetin i alendronat (2 mg kg^{-1}), a u jetri u odnosu na kvercetin. Međutim rezultati mjerenja OS u tkivima ispitivanih organa ne pokazuju statistički značajno smanjenje MDA kod životinja obrađenih proantocijanidinom u odnosu na RMO skupinu. Također nema statistički značajne razlike u rezultatima između proantocijanidina i alendronata, iako alendronat pokazuje značajno povišenu koncentraciju MDA u jajniku (Slika 47) kod skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,001$); u jetri (Slika 50) kod skupine obrađene alendronatom(40 i 2 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$; $P < 0,01$), što ukazuje na nepovoljniji utjecaj alendronata na lipidnu peroksidaciju u odnosu na proantocijanidin.

Analizom podataka koncentracije glutationa (GSH) RMO skupina pokazuje niže vrijednosti u svim organima u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, što je odraz povećanog OS. U odnosu na ostale flavonoide i alendronat proantocijanidini ne pokazuju bitne razlike u koncentraciji GSH u ispitivanim organima kod RMO štakora (Slike 47, 48, 49 i 50).

Proantocijanidin ne pokazuje statistički značajan porast SOD-a u ispitivanim organima RMO štakora u odnosu na ostale flavonoide i alendronat u obje ispitivane doze. Naprotiv zapažene su statistički značajno više vrijednosti u tkivu slezene kod skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupinu obrađenu proantocijanidinom i u tkivu jetre kod skupina obrađenih ikarinom i naringeninom u odnosu na skupinu obrađenu proantocijanidinom ($P < 0,05$) što ide u prilog boljim protuoksdativnim svojstvima ikarina i naringenina u odnosu na proantocijanidin.

Nadalje, zapažene su povećane vrijednosti SOD-a kod zdrave kontrolne skupine u odnosu na druge skupine što je odraz djelovanja 13cRA i povećanog OS.

Analizama vrijednosti enzimske aktivnosti katalaze (CAT) jajnika, bubrega, slezene i jetre nisu zapažene statistički značajne razlike između skupine obrađene proantocinanidinom u odnosu na zdravu kontrolu, RMO skupinu ili skupine obrađene alendronatom u obje ispitivane doze (Slike 59, 60, 61 i 62). Alendronat niti u ovom slučaju nije pokazao bolja protuoksidativna svojstva od proantocijanidina i ako je CAT aktivnost viša u bubregu ipak to može biti posljedica pojačanog oksidacijskog stresa u bubregu gdje je vrijednost MDA bila neznatno niža od 13cRA (11,49±3,09 *vs* 9,84±239) dok je vrijednost proantocijanidina bila 4,63±0,78. Iz podataka vidljivo je statistički značajno povećanje vrijednosti CAT u tkivu bubrega (Slika 60) između skupina obrađenih alendronatom 2 mg kg^{-1}u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$); skupina obrađenih alendronatom (40 mg kg^{-1}) i alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$).

Iz svih navedenih rezultata može se zaključiti da primjene proantocijanidina kao i alendronata u obje ispitivane doze kod RMO štakora imaju pozitivan utjecaj na koštani sustav zahvaćen osteoporozom. Ova činjenica se vidi kroz povećanje koštane mase, težine kosti i geometrijskih parametra femura koji pokazuju pozitivan trend u RMO štakora obrađenih proantocijanidinom i alendronatom. Proantocijanidin pokazuje statistički značajno bolje rezultate u povećanju koštane mase od alendronata što potvrđuju i rezultati biljega koštanog preokreta; proatocijanidin povećava vrijednosti osteokalcina (biljega koštane izgradnje) kod RMO štakora. Alendronat ipak pokazuje bolji utjecaj na težinu kosti i geometrijske parametre femura u odnosu na proantocijanidin. Analizama hematoloških i biokemijskih parametara alendronat pokazuje negativan utjecaj na crvenu krvnu sliku, a proantocijanidin pokazuje stimulativno djelovanje na imunološki sustav, dok oba spoja imaju učinak na smanjenje koštane razgradnje kod RMO štakora. Proantocijanidini pokazuju bolja protuoksidativna svojstva od alendronata. Nadalje treba istaknuti da alendronat u dozi od 40 mg kg^{-1}pokazuje potencijalno toksičan učinak na cjelokupni organizam koji se odražava preko smanjenja TT ispitivanih životinja. Proantocijanidin u ovom istraživanju ne pokazuje znakove toksičnosti na cjelokupni organizam, već pozitivna svojstva na koštano tkivo zahvaćeno osteoporozom. Također treba istaći da osteoporotični štakori obrađeni s kvercetinom (Slika 36j), proantocijanidinom (Slika 36k) kao i krizinom (Slika 36l) pokazuju značajno poboljšanje strukture kortikalne kosti dijafize femura koja pokazuje debljinu sličnu onoj u kontrolnoj skupini, iako je još uvijek prisutno par manjih intrakortikalnih šupljina, dok endostalna površina pokazuje tek sporadičnu vrlo malu

erodinaronost. U skupini štakora obrađenih s alendronatom debljina kortikalne kosti se povećala, broj i veličina intrakortikalnih šupljina je značajno smanjena ali na unutarnjoj površini korteksa i dalje su nazočne nepravilnosti na pojedinim mjestima što ukazuju na potrebu dulje obrade štakora alendronatom. Razlog navedenim značajkama može biti slaba bioiskoristivost alendronata na što ukazuju i podaci osteogene aktivnosti alendronata pri niskim dozama.

5.2.4. Učinci naringenina u RMO štakora i usporedba s alendronatom

Naringenin se ubraja u skupinu flavanona. U dosadašnjim istraživanjima pokazano je fitoestrogensko i protuoksidativno djelovanje naringenina. Fitoestrogenski učinak postiže preko signalnih puteva vezanih uz ERβ (Totta i sur. 2004; Virgili i sur. 2004). Protuoksidativno djelovanje naringenina prikazano je preko povećanja razine SOD i CAT aktivnosti, staničnih protuoksidanasa, te smanjenjem razine proizvoda lipidne peroksidacije (Mi-Kyung i sur. 2002). Naringenin smanjuje plazmatske i jetrene koncentracije kolesterola (Lee i sur. 1999), potiče jetru na sagorijevanje viška masti umjesto pohrane, sprječavajući pretilost miševa (Huff i sur. 2009). Ovi pozitivni učinci naringenina mogli bi koristiti u borbi protiv karcinoma (dojka, crijevo, maternica) te pomoći u sprječavanju nastanka bolesti srca i krvožilnog sustava (Gamet-Payrastre i sur. 1999; Keinan-Boker i sur. 2004; Harmon i sur. 2004; Milner 2006; Moon i sur. 2006; Galluzzo 2008). Dostupna literatura govori o učincima naringenina na koštani sustav. La i sur. (2009) u istraživanju i*n vitro* ukazuju da naringenin značajno inhibira osteoklastogenezu kroz smanjenu sekreciju IL-1, IL-23 i monocitnog proteina -1 (engl. *monocyte chemoattractant protein*-1) uz značajno smanjenje otpuštanja peptida α1 lanca kolagena tipa I. U *in vivo* istraživanju (Wei i sur. 2007), naringenin primjenjen u tri različite doze (20 mg kg^{-1}, 40 mg kg^{-1}, 100 mg kg^{-1}) u trajanju od 14 dana nakon izazivanja RMO pokazuje statistički značajno povećanja BMD, ukupnog sadržaja Ca i P u kostima, težine i promjera kosti kao i pada vrijednosti ALP čak i u najmanjoj primjenjenoj dozi (20 mg kg^{-1}). U drugom *in vivo* istraživanju ispitan je preventivni učinak naringenina u štakora kroz istovremenu primjenu 13cRA i naringenin u dozi 100 mg kg^{-1} (Oršolić i sur. 2013); naringenin je doveo do statistički značajnog povećanja Ca ($P < 0{,}025$) i P ($P < 0{,}025$) u kostima, duljine ($P < 0{,}018$) i promjera kosti ($P < 0{,}036$) kao i pada vrijednosti ALP ($P < 0{,}001$). Vrijedenosti BMD-a iako su bile značajno više u odnosu na RMO, ipak su bile manje u odnosu na kontrolnu skupinu. Vrijednost osteokalcina je statistički značajno porasla ($P < 0{,}021$) u odnosu na RMO i na kontrolnu skupinu neobrađenih

životinja što su autori protumačili i kao anabolički učinak naringenina. Značajan pad vrijednosti ALP u naringeninskoj skupini su objasnili kao hepatoprotektivno djelovanje naringenina.

U ovom istraživanju najprije smo pokazali učinke ispitivanih spojeva na TT životinja i organa u svrhu ispitivanja tokičnosti na razini cijelokupnog organizma, te postojanju fitoestrogenskog učinka obzirom na težine maternica. Kod RMO štakora obrađenih s alendronatom u dozi od 40 mg kg^{-1} zabilježen je pad TT od 2,50% - 0,55%, dok je kod skupine obrađene s alendronatom u dozi od 2 mg kg^{-1} vidljiv prirast težine od 9,78% - 13,15%. U zdravoj kontrolnoj skupini kao i u RMO skupini u drugom djelu istraživanja vidljiv je daljnji prirast težine od 5,88% - 9,10%, odnosno 7,54% - 11,28%. Skupina obrađena naringeninom pokazuje prirast TT od 8,89% - 11,07% kod RMO štakora što ukazuje kako naringenin nema toksičnosti na razini cjelokupnog organizma ako se gleda parametar TT. Analiza težine organa (jetre, slezene i bubrega) ne pokazuje značajne promjene u težini ispitivanih organa u odnosu na RMO skupinu i zdravu kontrolnu skupinu. Vidljivo je statistički značajno povećanje težine jetre kod skupina obrađenih proantocijanidinom i alendronatom 2 mg kg^{-1} u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$) ($P < 0,05$) (Tablice 19 i 20), što nije odraz hepatotoksičnosti ovih spojeva obzirom na biokemijske parametere pokazane u ovom istraživanju koji ne pokazuju povećanje aktivnosti jetrenih enzima kod RMO štakora obrađenih proantocijanidinom i alendronatom u dozi od 2 mg kg^{-1}.

Podatci ne pokazuju statistički značajno povećanje težine maternice kod RMO štakora obrađenih naringeninom, međutim iz Slike 64 se može uočiti povećanje relativne težine maternica kod naringeninske skupine za 33,88% u odnosu na RMO i za 14,39% više u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (Slika 64, Tablica 22), što govori u prilog fitoestrogenskog učinka naringenina koji je dokazan i u prijašnjim istraživanjima.

Ako gledamo regenerativan učinak naringenina na koštani sustav RMO štakora, iz rezultata se zapažaju povećane vrijednosti i BMC-a i BMD-a kod skupine obrađene naringeninom u odnosu na RMO skupinu, iako bez statističke značajnosti (Slike 26 i 27). Podatci se podudaraju s histološkom analizom bedrene kosti gdje je vidljivo nešto manje intrakortikalnih šupljina u osteoporotičnih štakora obrađenih s naringeninom (Slika 36h) u odnosu na RMO štakore. Međutim alendronat u dozi od 40 mg kg^{-1} pokazuje statistički značajan porast u BMC-u i BMD-u proksimalnog i distalnog dijela femura (Slike 26 i 27) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$), isto tako skupina obrađena alendronatom(40 mg kg^{-1}) pokazuje statistički značajne veće vrijednosti BMC-a i BMD-a u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,001$).

Ako gledamo rezultate težina femura, vidljiv je statistički značajan porast indeksa težine lijeve bedrene kosti (Slika 28) kod skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) i statistički značajan porast indeksa težine desne bedrene kosti (Slika 29) kod skupine obrađene naringeninom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$).

Geometrijska mjerenja kosti pokazuju statistički značajan porast duljine kosti (Slika 32) skupine obrađene naringeninom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$). Također je utvrđen statistički značajan porast AP dužine kosti između skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,05$) (Slika 33) i skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) (Slika 34).

Ovi rezultati potvrđuju pozitivan utjecaj ispitivanih spojeva na koštani sustav RMO štakora, ipak alendronat pokazuje statistički bolje rezultate od naringenina. Nema statistički značajnih rezultata između naringenina i alendronata u obje ispitivane doze ako gledamo biljege koštanog preokreta, iako se zapaža statistički značajno povećanje biljega koštane razgradnje β-CTx-a kod skupine obrađene naringeninom i zdrave kontrolne skupine ($P < 0,05$) (Slika 38). To je očekivani odraz djelovanja 13cRA na zdravog štakora. Naringenin iako manje od ostalih flavonoida i alendronata u obje doze pokazuje veću razinu osteokalcina u odnosu na RMO skupinu, što znači da potiče koštanu izgradnju na osteoporotičnoj kosti (Slika 37).

Hematološki parametri ne pokazuju statistički značajne razlike kod RMO štakora nakon obrade s flavonoidima i alendronatom, osim ranije spomenutog negativnog utjecaja alendronata na crvenu krvnu sliku (Tablica 15). Analize biokemijskih parametara potvrđuju rezultate gore navedenih istraživanja. Vidljivo je statistički značajno smanjenje aktivnosti AST i ALP kod skupine obrađene naringeninom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) ($P < 0,05$) (Tablica 17, Slike 43 i 44) što potvrđuje hepatoprotektivno djelovanje naringenina. Nadalje vidljiv je statistički značajan porast aktivnosti LDH između skupine obrađene alendronatom 2 mg kg^{-1} u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$) i između RMO skupine u odnosu na skupine obrađene naringeninom ($P < 0,001$) (Tablica 17, Slika 45) što pokazuje protuupalno djelovanje naringenina. Zabilježeno je statistički značajno smanjenje koncentracije kreatinina kod skupine obrađene naringeninom u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu, što govori u prilog pozitivnog utjecaja naringenina na bubrežnu funkciju (Tablica 18).

Ranije je spomenuto protuoksidativno djelovanje naringenina preko povećanja razine aktivnosti SOD-e i CAT-e, te smanjenja razine proizvoda lipidne peroksidacije (Mi-Kyung i sur. 2002).

U ovom istraživanju zapažena je povišena koncentracija MDA u jajniku (Slika 47) kod skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,001$) i skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$); u bubregu (Slika 48) kod skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$); u slezeni (Slika 49) kod skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$); u jetri skupine obrađene alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ($P < 0,01$) ($P < 0,05$).

Ovi rezultati govore o pozitivnom protuoksidativnom učinku naringenina na lipidnu peroksidaciju u odnosu na alendronat u obje ispitivane doze u ispitivanim organima.

Analiza razine glutationa pokazuju statistički značajno više vrijednosti GSH u bubregu (Slika 52) kod skupina obrađenih naringeninom ($P < 0,01$), alendronatom (40 mg kg^{-1}) ($P < 0,01$) i alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,01$) u odnosu na RMO skupinu što govori o protuoksidativnom učinku ovih spojeva.

Naringenin i u ovom istraživanju uzrokuje statistički značajno povećanje razina SOD-a kod uzoraka jetre (Slika 58) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) i skupinu obrađenu proantocijanidinom ($P < 0,05$). Statistički značajno povećane razine CAT-a zabilježene su u tkivu bubrega (Slika 60) kod skupine obrađene naringeninom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) i skupina obrađenih alendronatom (2 i 40 mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,001$) ($P < 0,01$). Analizirajući Slike 55 do 62 mogu se uočiti ili približno jednake vrijednosti SOD i CAT aktivnosti ili povišene vrijednosti u drugim organima u odnosu na RMO skupinu, a koje ne pokazuju statističke značajnosti, ali ukazuju na protuoksidativnu aktivnost naringenina koja je izraženija u odnosu na alendronat u obje ispitivane doze uz statistički značajno izraženije djelovanje u odnosu na proantocijanidin u tkivu jetre.

Iz svih navedenih rezultata može se zaključiti da primjene naringenina kao i alendronata u obje ispitivane doze pokazuju regenerativno djelovanje na koštani sustav kod RMO štakora, iako alendronat u obje ispitivane doze pokazuje bolje rezultate u mjerenjima koštane mase, težinama kosti i geometrijskim parametrima. Naringenin iako manje od ostalih flavonoida i alendronata u obje doze pokazuje veću razinu osteokalcina u odnosu na RMO skupinu, što znači da potiče koštanu izgradnju kod RMO štakora. Naringenin u ispitivanoj dozi nema značajnog utjecaja na hematološke parametre, dok alendronat u većoj dozi pokazuje negativan utjecaj na crvenu

krvnu sliku. Biokemijski parametri potvrđuju hepatoprotektivno i protuupalno djelovanje naringenina i pozitivno djelovanje na bubrežnu funkciju. Što se tiče protuoksidativnog djelovanja naringenina, rezultati pokazuju bolji protuoksidativni odgovor naringenina na razinu lipidne peroksidacije od alendronata u obje ispitivane doze, oba spoja povećavaju razinu GSH-a, SOD-a i CAT-a iako naringenin pokazuje bolje rezultate od alendronata u obe ispitivane doze. Obzirom da naringenin ne pokazuje toksične učinke na cjelokupni organizam kao i na pojedine organe, te uz njegovo fitoestrogensko djelovanje i lakšu dostupnost mogao bi biti adekvatna zamjena za alendronat u liječenju osteoporoze.

5.2.5. Učinci ikarina u RMO štakora i usporedba s alendronatom

Ikarin je flavonoid iz skupine flavonola (Slika 16), do sada najproučavaniji flavonoid koji pokazuje protuupalna, protubakterijska, protuvirusna i protukancerogena svojstava od kojih su neka pokazana u kliničkim istraživanjima (Sze i sur. 2010; Ma i sur. 2011). Ikarin ima dokazan značajan učinak na koštani sustav. *In vitro* istraživanja pokazuju sposobnost ikarina da stimulira osteoblastičnu proliferaciju i diferencijaciju povećanjem proizvodnje koštanog morfogenetskog proteina (BMP; engl. *bone morphogenetic protein*) 2 i 4, β-katenina i ciklina D1 (Zhang i sur. 2010, Yin i sur. 2007). Također ikarin u određenim koncentracijama djeluje i na funkciju osteoklasta inhibirajući koštanu razgradnju kao i smanjenje broja resorpcijskih lakuna (Ma i sur. 2011). Hsieh i sur. (2011) pokazali su da ikarin povećava ekspresiju OPG dok je ekpresija RANKL smanjena. U tom *in vitro* istraživanju pokazani su molekularni mehanizmi inhibicije ikarina na osteolizu induciranu lipopolisaharidima (LPS; engl. *lipopolysaccharide*). Inhibicija osteolize uključuje supresiju regulacije hipoksijom inducibilnog faktora 1α (HIF-1α; engl. *induced hypoxia inducible factor1α*) i PGE2 sinteze preko MAPKs/NF-κB puta odnosno supresiju osteoklasta (Hsieh i sur. 2011). Sve ovo ukazuje da ikarin *in vitro* inhibira resorpcijsku aktivnost osteoklasta (Chen i sur. 2007). Dosadašnja *in vivo* istraživanja ikarina rađena su uglavnom na ovarijektomijskom modelu osteoporze (OMO). Ova istraživanja pokazuju kako ikarin može poboljšati BMD i koštanu snagu te prevenirati smanjenje serumskog Ca, P i 17β-estradiola nastalih ovarijektomijom (Nian i sur. 2009). Istraživanje provedeno u OMO i u staničnoj kulturi osteoblasta (UMR 106) pokazuje da ikarin spriječava ovarijektomijom izazvan gubitak koštane mase i Ca, te da oponaša djelovanje 17β-estradiola stimulirajući staničnu proliferaciju i mRNA ekspresiju OPG/RANKL putem ER. Autori ovog istraživanja nadalje zaključuju da ikarin aktivira ERα fosforilaciju u staničnoj kulturi osteoblasta (UMR 106) te

putem ligand-neovisne aktivacije dolazi do brze aktivicije ER u osteoblastičnim stanicama (Mok i sur. 2010).

Većina drugih istraživanja *in vivo* i *in vitro* ukazuju da ikarin oponaša učinak 17β-estradiola te je hipoteza većine da mehanizam djelovanja ikarina ide putem ER čime se potvrđuje njegova pripadnost i fitoestrogenskoj skupini.

Istraživanje u kojem je proučavan preventivni učinak ikarina na osteoporozu, pokazuje značajan porast vrijednosti Ca i P u bedrenim kostima, pad vrijednosti OC i ALP. U svim ostalim koštanim parametrima iako je došlo do povećanja medijana vrijednosti BMD-a, pada vrijednosti CTX-a i povećanja vrijednosti duljine i promjera kostiju promjene nisu bile statistički značajne. Temeljem navedenog ikarin može biti učinkovit u prevenciji i odgoditi nastank osteoporotskih promjena (Oršolić i sur. 2013).

U ovom sitraživanju uspoređeno je terapijsko djelovanje ikarina sa ostalim flavonoidima i alendronatom na koštani sustav kao i cjelokupni organizam RMO štakora.

Prema rezultatima ovoga istraživanja ikarin nije pokazao pad u TT RMO štakora, već naprotiv prirast težine od 6,73% - 15,86% koji je ujedno i najveći prirast u odnosu na ostale ispitivane flavonoide i alendronat. Prema tom parametru ikarin ne pokazuje toksičnost na razini cjelokupnog organizma (Slika 25), jednako tako ne pokazuje štetni učinak ako gledamo parametre težina organa (slezena, bubreg, jetra) (Tablice 19 i 20). Rezultati mjerenja težina maternice pokazuju statistički značajan porast indeksa težina maternice između skupine obrađene ikarinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,001$) (Slika 63, Tablica 21) i statistički značajno povećanje relativne težine maternice kod skupina obrađenih ikarinom i krizinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) ($P < 0,05$) (Slika 64, Tablica 22). Fitoestrogensko djelovanje ikarina u odnosu na RMO model je veće za 43,42%.

Rezultati mjerenja koštanih parametara pokazuju statistički značajan porast u BMC-u proksimalnog i distalnog dijela bedrene kosti (Slika 26) između skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu naskupinu obrađenu ikarinom (prox. - $P < 0,01$; dist. - $P < 0,05$), skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$). Slične rezultate pokazuju mjerenja BMD-a u proksimalnom i distalnom dijelu bedrene kosti (Slika 27). Vidljiv je statistički značajan porast BMD-a između skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) i RMO skupine u oba dijela kosti (prox. - $P < 0,01$; dist.- $P < 0,001$), skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) i skupine obrađene ikarinom u distalnom dijelu kosti ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom 2

(mg kg^{-1}) u oba koštana dijela ($P < 0,001$). Iz ovoga je vidljivo kako alendronat u višoj dozi ima najbolji učinak na koštanu masu RMO štakora sa statističkom značajnošću. Na Slikama 26 i 27 ikarin pokazuje porast BMC-a i BMD-a kod RMO štakora iako bez statističke značajnosti, međutim ipak manje u odnosu na ostale ispitivane flavnoide i alendronat u obje ispitivane doze. Ovi rezultati slični su rezultatima preventivnog istraživanja provedenog 2013 godine (Oršolić i sur. 2013).

Ako gledamo rezultate fizikalnih i geometrijskih značajki kosti u ovom istraživanju na RMO štakorima zapaža se statistički značajno povećanje indeksa težine i relativne težine lijeve bedrene kosti (Slika 28 i 30) kod skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) ($P < 0,05$), povećanje indeksa težine i relativne težine desne bedrene kosti (Slike 29 i 31) između skupine obrađene ikarinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) ($P < 0,01$). Ikarin iako bez statističke značajnosti pokazuje najbolje djelovanje na težinu kosti u odnosu na ostale ispitivane flavonoide i alendronat u manjoj ispitivanoj dozi, dok alendronat u dozi od 40 mg kg^{-1} pokazuje najveći dobitak na težini bedrene kosti u odnosu na sve ispitivane spojeve (Slike 28, 29, 30 i 31), što potvrđuje da visoke doze dovode do pojačane mineralizacije i čvrstoće kostiju.

Iz rezultata geometrijskih koštanih parametara vidljiv je statistički značajan porast duljine bedrene kosti (Slika 32) između skupine obrađene ikarinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,001$) i skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$).

Nadalje utvrđen je statistički značajan porast ML dužine proksimalnog dijela bedrene kosti (Slika 33) između skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupinu obrađenu naringeninom ($P < 0,05$) i skupinu obrađenu krizinom ($P < 0,001$); AP dužine dijafize bedrene kosti (Slika 34) između između skupine obrađene ikarinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) i skupinu obrađenu krizinom ($P < 0,01$); skupine obrađene alendronatom 2 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$); ML dužine distalnog dijela kosti (Slika 35) između skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupinu obrađenu krizinom ($P < 0,05$) i AP dužine distalnog dijela kosti(Slika 35) između skupine obrađene ikarinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) i skupine obrađene naringeninom ($P < 0,05$) i Krizinom ($P < 0,01$).

Iz rezultata je vidljivo kako ikarin statistički značajno povećava geometrijske parametre u odnosu na ostale ispitivane flavonoide i alendronat (Slike 32, 33, 34 i 35).

Iz rezultata mjerenja biokemijskih biljega koštanog preokreta ikarin statistički značajno povećava razinu osteokalcina u odnosu na sve ispitivane flavonoide i alendronat u obje ispitivane doze (Slika 37), dok u odnosu na druge ispitivane spojeve smanjuje razinu β-CTx-a (Slika 38).

Ikarin nema statistički značajnog utjecaja na hematološke parametre (Tablica 15), dok se iz analiza biokemijskih parametata može zapaziti niža razina ALP u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu i RMO skupinu iako bez statistički značajnog rezultata (Tablica 17, Slika 44), a što je u sukladu s dosadašnjim istraživanjima. Ikarin također prema biokemijskim pokazateljima ne pokazuje toksičan učinak na unutarnje organe RMO štakora.

Iz rezultata protuoksidativnog djelovanja ikarina nije vidljiv statistički značajan utjecaj ikarina na smanjenje lipidne peroksidacije u organima, iako su vidljive niže vrijednosti MDA u jetri i bubregu u odnosu na RMO skupinu i alendronat u obje ispitivane doze (Slike 47, 48, 49, 50).

Razine GSH pokazuju statistički značajno višu razinu u tkivu slezene (Slika 53) kod skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupine obrađene kvercetinom ($P < 0,01$) i alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,05$). Statistički značajno viša koncentracija GSH zapažena je analizom podataka dobivenih iz jetrenih uzoraka (Slika 54) kod skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,05$). Alendronat uglavnom pokazuje niže vrijednosti GSH u obje ispitivane doze u odnosu na ikarin.

Rezultati razine SOD-a pokazuju statistički značajan porast enzimske aktivnosti u tkivu jajnika (Slika 55) kod skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupine obrađene kvercetinom ($P < 0,05$), alendronatom 40 mg kg^{-1} ($P < 0,05$) i alendronatom 2 mg kg^{-1} ($P < 0,05$); u tkivu slezene (Tablica 57) između skupina obrađenih ikarinom i proantocijanidinom ($P < 0,05$); u tkivi jetre (Slika 58) kod skupina obrađenih ikarinom ($P < 0,05$) i naringeninom ($P < 0,01$) u odnosu na RMO skupinu i kod skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupinu obrađenu proantocijanidinom ($P < 0,05$).

Analizom enzimske aktivnosti CAT-a utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti u tkivu jajnika (Slika 59) između skupine obrađene ikarinom ($P < 0,05$), krizinom ($P < 0,001$) i proantocijanidinom ($P < 0,05$) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu; u tkivu bubrega (Slika 60) skupina obrađenih alendronatom (40 mg kg^{-1}) i alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) ($P < 0,001$), skupina obrađenih alendronatom (40 mg kg^{-1}) i alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu ikarinom ($P < 0,05$) ($P < 0,01$).

Zaključno ikarin je flavonoid koji ne pokazuje toksičan učinak na cjelokupni organizam kao ni na organe RMO štakora prateći promjene težina organa i biokemijske parametre, također ikarinnema utjecaja na promjene hematoloških parametara. Ako gledamo regenerativno djelovanje ikarina na koštani sustav RMO štakora, ikarin pokazuje jako fitoestrogensko djelovanje u odnosu na ostale ispitivane spojeve, potiče koštanu izgradnju i suprimira aktivnost osteoklasta. Ovaj pozitivan utjecaj na koštanu izgradnju vidi se iz rezultata fizikalnih i geometrijskih mjerenja u kojima je ikarin polučio najbolji učinak izuzev alendronata u dozi od 40 mg kg^{-1}koji pokazuje najveći dobitak na težini bedrene kosti u odnosu na sve ispitivane spojeve. Ikarin pokazuje porast BMC-a i BMD-a kod RMO štakora iako bez statističke značajnosti, međutim ipak manji u odnosu na ostale ispitivane flavnoide i alendronat u obje ispitivane doze. Međutim gledajući ostale parametre ikarin ima značajno pozitivan utjecaj na koštani sustav kod RMO štakora, a također pokazuje protuoksidativno djelovanje uglavnom bolje u odnosu na alendronat u obje ispitivane doze i ostale ispitivane flavonoide, što se vidi iz rezultata povišene razine GSH, SOD-a i CAT-a.

5.2.6. Učinci kvercetina u RMO štakora i usporedba s alendronatom

Kvercetin pripada flavonolskoj skupini flavonoida te je jedan od najzastupljenijih i do sada najistraživanijih flavonoida kojem su dokazana protuoksidativna, protuupalna, protukoagulativna, protubakterijska, protuaterogena i protuproliferativna svojstva. Kvercetin se smatra najjačim protuoksidansom od svih flavonoida, međutim može postati i prooksidans ovisno o koncentraciji i o izvoru slobodnih radikala u stanici (Lee i sur. 2003). Brojna su *in vitro i in vivo* istraživanja koja pokazuju učinak kvercetina na koštane stanice i koštano tkivo.

Pokazano je kako kvercetin stimulira osteoblastičnu aktivnost u kulturi ljudskih osteoblasta u kojem veliku ulogu igra stimulacija estrogenskih receptora (Prouillet i sur. 2004), također je pokazana uloga kvercetina u smenjenju osteoklastogeneze putem inhibira aktivaciju RANKL i aktivatora proteina 1 (AP-1), koji su značajni čimbenici uključeni u osteoklastičnu diferencijaciju (Wattel i sur. 2004). *In vitro* istraživanja pokazaju da kvercetin može djelovati kao VDR aktivator, te je nadalje potvrđeno povećanje ekspresije mRNA TRPV6 ciljnog DVR gena (u Caco-2 stanicama) (Inoue i sur. 2010). U *in vivo* istraživanjima kvercetina koja su vezana uz osteoporozu uglavnom je korišten OMO u štakora. Tsuji i sur. (2009) pokazali su preventivni učinak kvercetina na nastanak osteoporotičnih promjena u OMO nakon četri tjedna primjene. BMD mjeren kvalitativnom kompjuteriziranom tomografijom (pQCT) bio je veći u

grupi životinja obrađenih kvercetinom. Histomorfometrija je pokazala da se koštani volumen u potpunosti obnovio u skupini životinja obrađenih kverectinom ali nije došlo da smanjenja osteoklastične površine kao i broja osteoklasta ukoliko se poredi sa ovarijektomiranim životinjama. Autori ovog istraživanja smatraju da kverectin sprječava koštani gubitak bez učinka na uterus, i da ne djeluje kao izrazito jaki inhibitor osteoklastogeneze ili SERM *in vivo* (Tsuji i sur. 2009). Drugo *in vivo* istraživanje pokazalo je da rutin (glikolizirani metabolit kvercetina) u ovarijektomiranih štakora ima učinak u liječenju osteoporoze odnosno smanjuje gubitka trabekularne kosti usporavanjem koštane razgradnje i povećanjem osteoblastične aktivnosti (Horcajada-Molteni i sur. 2000). Oršolić i sur. (2013) istražili su preventivni učinak kvercetina u sprječavanju osteoporoze prouzročene s 13cRA u štakora te pokazali pozitivni učinak kvercetina; statistički značajno smanjenje koštanih biljega OCi CTX-a kao i ALP ipovećanja BMD-a, razine kalcija i fosfora u kostima.

U ovom istraživanju prikazali smo da kvercetin ne uzrokuje smanjenje TT u RMO štakora (Slika 25), već dovodi do porasta TT od 6,02% - 8,95% nakon obrade RMO štakora kvercetinom, što isključuje toksičnost kvercetina na razini cjelokupnog organizma.

Mjerenjem težina organa nakon obrade kvercetinom nisu zapažene statistički značajne promjena što upućuje da nema toksičnog učinka kvercetina na organe RMO štakora (Tablice 19 i 20). Iz rezultata mjerenja težina maternica (Slike 63 i 64) kvercetin uz ikarin pokazuje najsnažniji fitioestrogenski učinak (43,39% veći u odnosu na RMO), što se vidi kroz povećanje relativne težine maternice RMO štakora nakon obrade flavonoidima.

Iz rezultata mjerenja koštane mase utvrđen je statistički značajan porast BMC-a i BMD-a proksimalnog i distalnog dijela bedrene kosti (Slike 26 i 27) između skupine obrađene alendronatom(40 mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) (prox. - $P < 0,01$; dist.- $P < 0,001$), skupine obrađene kvercetinom u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,05$) ($P < 0,01$) i skupine obrađene alendronatom (40 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom (2 mg kg^{-1}) ($P < 0,001$) ($P < 0,001$). Rezultati pokazuju značajno povećanje koštane mase kod RMO štakora obrađenih kvercetinom u odnosu na druge ispitane flavonoide osim proantocijanidina i alendronata u većoj dozi koji pokazju nešto bolje rezultate.

Rezultati težina bedrenih kostiju pokazuju statistički značajan porast indeksa težina lijevih bedrenih kostiju (Slika 28) kod skupine obrađene kvercetinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) i skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) i indeksa težina desnih bedrenih kostiju (Slika 29) skupine obrađene alendronatom 40 (mg kg^{-1})

u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$). Rezultati mjerenja relativnih težina kostiju (Slike 30 i 31) pokazuju statističke značajnosti kod istih skupina kao i kod indeksa težina što govori u prilog povećanja koštane težine kod životinja obrađenih kvercetinom koje je značajno u odnosu na druge flavonoide i alendronat u manjoj ispitivanoj dozi, ali varira u odnosu na alendronat u dozi od 40 mg kg^{-1} koji kod nekih skupina pokazuje nešto bolje rezultate (Slike 29 i 31).

Mjerenjem geometrijskih značajki vidljivo je kako kvercetin povećava duljine i promjere kostiju u odnosu na RMO ali bez statističke značajnosti. Rezultati mjerenja pokazuju ili slične ili nešto niže rezultate u odnosu na ostale flavonoide i alendronat u ispitivanim dozama (Slike 32, 33, 34 i 35).

Kvercetin ne pokazuje statistički značajno povećanje osteokalcina u serumu, kao niti statistički značajno smanjenje β-CTx-a u RMO štakora, iako su zabilježena viša mjerenja osteokalcina u odnosu na RMO skupinu i skupine obrađene s alendronatom u obje ispitivane doze (Slika 37) i niža mjerenja β-CTx-a u odnosu na RMO i alendronat 2 mg kg^{-1} (Slika 38).

Rezultati mjerenja hematoloških parametara ne pokazuju statistički značajnih hematoloških promjena u RMO štakora nakon obrade kvercetinom. Iz rezultata mjerenja biokemijskih parametara zapaža se statistički značajno smanjenje razine ALP u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) (Tablica 17, Slika 44).

Protuoksidativna svojstva kvercetina pokazana su kroz mjerenja razine lipidne peroksidacije, koncentracije MDA, SOD i CAT aktivnosti u ispitanim organima (jajnici, jetra, slezena i bubrezi) u RMO štakora nakon obrade flavonoidima i alendronatom.

Iz rezultata mjerenja razine lipidne peroksidacije zapažena je statistički značajno povišena vrijednost MDA u tkivu slezene (Slika 49) između skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na skupinu obrađenu kvercetinom ($P < 0,05$) i u tkivu jetre (Slika 50) između skupine obrađene alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na skupinu obrađenu kvercetinom ($P < 0,05$). Kvercetin snizuje razinu lipidne peroksidacije u svim ispitanim organima u odnosu na većinu ispitanih flavonoida i alendronata u obje ispitane doze (Slike 47, 48, 49, 50).

Analizom podataka koncentracije glutationa (GSH) vidljivo je statistički značajno povećanje razine glutationa u jajnicima (Slika 51) u odnosu na RMO skupinu, zatim zabilježena je statistički značajno veća vrijednost GSH kod skupine obrađene ikarinom u odnosu na skupinu obrađene kvercetinom ($P < 0,01$) u tkivu slezene (Slika 53). Kvercetin u većini organa povećava

razinu GSH u odnosu na RMO skupinu i alendronat u obje ispitivane doze, osim u bubregu gdje alendronat pokazuje više vrijednosti (Slike 51, 52, 53 i 54).

Rezultati mjerenja SOD aktivnosti u ispitivanim organima ne pokazuju statističku značajnost kod kvercetina (Slike 55, 56, 57 i 58) dok je kod mjerenja razine CAT-a zapažen statistički značajan porast enzimske aktivnosti katalaze (CAT) kod skupine obrađene kvercetinom u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,05$) i skupina obrađenih alendronatom (40 mg kg^{-1}) i alendronatom (2 mg kg^{-1}) u odnosu na RMO skupinu ($P < 0,01$) ($P < 0,001$) u tkivu bubrega (Slika 60). Iako mjerenja u ostalim organima ne pokazuju statističke značajnosti u rezultatima, vidljivo je (Slike 59, 60, 61 i 62) da kvercetin povisuje razinu CAT aktivnosti u RMO štakora približno isto ili više u odnosu na druge ispitane flavonoide i alendronat u obje ispitane doze.

Zaključno, kvercetin ne pokazuje štetan učinak na cjelokupni organizam kao i na pojedine organe, što je pokazano porastom TT RMO štakora nakon obrade kvercetinom i rezultatima koji nisu pokazali statistički značajan učinak na težinu organa kao i na hematološke i biokemijske parametre koji bi upućivali na štetnost kvercetina. Iz mjerenja težina maternica može se zaključiti da kvercetin uz ikarin pokazuje najsnažniji fitioestrogenski učinak, što se vidi kroz povećanje relativnih težina maternica RMO štakora nakon obrade flavonoidima.

Pozitivno djelovanje kvercetina na koštano tkivo RMO štakora pokazano je rezultatima mjerenja koštane mase (BMC-a i BMD-a) iz kojih je vidljivo značajno povečanje koštane mase kod RMO štakora obrađenih kvercetinom u odnosu na druge ispitane flavonoide osim proantocijanidina i alendronata u većoj dozi koji pokazju nešto bolje rezultate. Također kvercetin uzrokuje povećanje koštane težine i geometrijskih značajki kosti RMO štakora, što je izraženije vidljivo u odnosu na druge flavonide i alendronat u manjoj ispitivanoj dozi ako gledamo težine kosti, a geometrijski parametri pokazuju ili slične ili nešto niže rezultate u odnosu na ostale flavonoide i alendronat u ispitivanim dozama. Kvercetin isto tako ne pokazuje statistički značajno povećanje osteokalcina u serumu, kao niti statistički značajno smanjenje β-CTx-a u RMO štakora, iako su zabilježena viša mjerenja osteokalcina u odnosu na RMO skupinu i skupine obrađene s alendronatom u obje ispitivane doze kao i niža mjerenja β-CTx-a u odnosu na RMO i alendronat 2 mg kg^{-1}. U biokemijskim parametrima također kod kvercetina vidimo statistički značajno smanjenje ALP u odnosu na RMO skupinu, što je pokazatelj smanjenja koštane razgradnje nakon obrade RMO štakora kvercetinom.

Protuoksidativna svojstva kvrecetina pokazana su kroz smanjenje razine lipidne peroksidacije u ispitivanim organima, iako mjerene razine MDA nisu pokazale statitičke značajnosti; kvercetin bitno snizuje razinu MDA u svim ispitanim organima u odnosu na većinu ispitanih flavonoida i alendronata u obje ispitane doze. Isto tako kvercetin u većini organa povećava razinu GSH u odnosu na RMO skupinu i alendronat u obje ispitivane doze, osim u bubregu gdje alendronat pokazuje više vrijednosti. Ovi rezultati također ne pokazuju ststističke značajnosti, ali se odnosi jasno mogu vidjeti iz prikazanih Slika (51, 52, 53 i 54). Rezultati mjerenja SOD aktivnosti u ispitivanim organima ne pokazuju statističke značajnosti kod kvercetina iako niske razine SOD aktivnosti u tkivu jetre i jajnika možemo objasniti činjenicom da je kvercetin kao jaki protuoksidans doveo do smanjena lipidne peroksidacije u jajniku i jetri, te tako smanjio potrebu za sintezom protuoksidativnih enzima ili prilagodbu stanica na mikrookoliš bogat visokom razinom protuoksidansa. Njegova pozitivna protuoksidativna aktivnost je zasigurno uz pojačanu sintezu osteoblasta i supresiju osteoklasta doprinijela i značajnom poboljšanju strukture kortikalne kosti dijafize femura. Dobiveni rezultati histološke analize pokazuju debljinu strukture kortikalne kosti sličnu onoj u kontrolnoj skupini uz par manjih intrakortikalnih šupljina.

5.3. Procjena stupnja oštećenja DNA u RMO štakora nakon obrade flavonoidima i alendronatom

Literarurni podatci sve više ukazuju na korisnost primjene prirodnih sastavnica u sprječavanju nastanka bolesti te liječenja bolesti, a posebice u prevenciji i liječenju osteoporoze. Stoga flavonoidi posljednjih godina privlače veliku pozornost znanstvenika zbog svojih mnogobrojnih ljekovitih svojstava koja se ponajviše temelje na njihovim dokazanim protuoksidativnim, proturadikalskim i protuupalnim svojstvima (Middleton 2000; Cotelle 2001; Oršolić i Bašić 2007; Benavente-Garcíai Castillo 2008; Oršolić i Bašić 2008a, 2008b). Razvidno je da hranu danas potrošači ne cijene samo po njenom okusu i hranidbenoj vrijednosti nego i po njenoj sposobnosti da pridonese očuvanju zdravlja, posebice njenim ljekovitim osobitostima. Funkcionalna hrana preko svojih bioloških aktivnih sastavnica je važan čimbenik u održavanju zdravlja ljudi; njena važnost se posebice očituje u održavanju ravnoteže količine slobodnih radikala u organizmu. Već dugi niz godina poznato je da propolis i biljna hrana bogata flavonoidima mogu se uporabiti u nadvladavanju problema povezanih s kroničnim i degenerativnim bolestima posljedično nastalim povećanim oksidacijskim stresom uključujući osteoporozu. Oksidativni stres (OS) karakteriziran je stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva

(engl. *Reactive oxygen species*, ROS) za koje je utvrđeno da uzrokuju oštećenja brojnih biomolekula, posebice, narušavaju strukturu biomembrana, prouzrokuju oštećenje nukleinskih kiselina, inhibiciju enzima, razgradnju bjelančevina i lipidnu peroksidaciju, vodeći prirodnom procesu starenja kao i nastanku kroničnih degenerativnih bolesti uključujući karcinom, autoimune poremećaje, katarakt, reumatoidni artritis, osteoporozu, bolesti krvožilnog sustava i srca, i neurodegenerativne bolesti.

Oštećenje DNA jest najznačajnija ROS-prouzročena stanična modifikacija, budući da se DNA ne sintetizira *de novo*, već se kopira vodeći nastanku induciranih mutacija te genetske nestabilnosti. Oštećenje molekule DNA stanice najčešće aktivira programiranu staničnu smrt ili apoptozu. Tako visioka razina ROS-a, popraćena upalom vodi pojačanom propadanju osteoblasta te gubitku i lomljivosti kosti. Glavni slobodni radikal odgovoran za oštećenja DNA je hidroksilni radikal (•OH), koji reagira sa svim komponentama DNA molekule, purinskim i pirimidinskim bazama, te sa deoksiriboznom okosnicom. Na bazama može doći do dodavanja ili oduzimanja vodika što dovodi do stvaranja slobodnih radikala. Daljnje reakcije baza i šećernih radikala stvaraju različite modifikacije, mjesta bez baza, puknuća DNA te križne veze DNA i proteina.

Dosadašnji rezultati jasno ukazuju da jedan od mehanizama visokih doza 13cRA jest oksidacijski stres kao uzok osteoporoze koji je usko povezani s nedostatkom estrogenske aktivnosti povezane s osteoporozom (Fahmy i Soliman 2009; Oršolić i sur. 2014). Utvrđena je jasna poveznica između OS i osteoporoze. ROS smanjuju diferencijaciju osteoblasta i povećavaju osteoklastičnu aktivnost. Starenje i oksdacijski stres uzrokuje gubitak koštane mase zbog smanjenog formiranja osteoblasta kostiju i povećana osteoklastičke resorpciju kosti.Tako nedostatan protuoksidativni sustav tj. loša neutralizacija ROS-a doprinosi patogenezi osteoporoze, a protuoksidansi mogu smanjiti resorpciju kosti.

Obzirom da je jedan od ciljeva bio ukazati na neškodljivost primjene flavonoida kao protuoksidansa u terapiji osteoporoze uporabili smo mikronukleus i komet test za procjenu genotoksičnosti.

Mikronukleusi su male kromatinske strukture koje svojom strukturom nalikuju jezgri ali su samostalno smještene unutar interfazne citoplazme (Bombail i sur. 2001; Fenech i sur. 2003; Baatout i Derradji 2004). Nastaju uslijed lomova kromosoma i kondenzacije acentričnih kromosomskih ulomaka ili kromosoma zaostalih u anafazi (Grisolia i Starling 2001). Prisutnost mikronukleusa pokazatelj je postojanja aberacija u prethodnoj diobi stanice (Nath i sur. 1990), te se stoga učestalost mikronukleusa može koristiti kao kvantitativna mjera strukturnih i

numeričkih aberacija kromosoma izazvanih u stanicama u uvjetima *in vitro* i *in vivo* pod utjecajem različitih genotoksičnih agensa (Fenech 1993a, 1993b; Nusse i sur. 1996; Fenech i sur. 2003; Baatout i Derradji 2004). Rezultati mikronukleus testa koji je između ostaloga i pokazatelj dvostrukih lomova (kidanja i gubljenja kromosomskog materijala ili zaostajanja i gubljenja cijelog kromosoma u anafazi tijekom diobe stanice) pokazuju da se broj mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi štakora nije promjenio u svim obrađenim skupinama. Temeljem dobivenih rezultata i nedostatka promjene u broju mikeonukleusa smatramo da oštećenja DNA leukocita su više vezane za jednostruke lomove nego dvostruke kao i veliku mogućnost popravka. Za takav tip oštećenja pogodan je komet test.

Komet test (mikrogel elektroforeza) vrlo je djelotvorna tehnika pomoću koje je moguće mjeriti veličinu i tip oštećenja DNA na razini pojedinačne stanice. Metoda je jednostavna i općeprihvaćena, jer je za test potrebno kratko vrijeme izvođenja i mali broj stanica. Tehnika se može raditi u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (Cotelle i Férard 1999), osjetljiva je i korisna tehnika za procjenu genotoksičnog učinka nekog spoja, praćenje popravka stanične DNA te otkrivanje stanica u apoptozi i nekrotičnih stanica (Tice i sur. 2000; Wada i sur. 2003; Collins 2004). Za dobivanje pouzdanih rezultata dovoljno je analizirati 50 stanica. S obzirom da se pomoću ove tehnike procjenjuju oštećenja pojedinačnih stanica, komet test se može izvesti na različitim stanicama i tkivima ljudskog, životinjskog ili biljnog podrijetla te stanicama u kulturi (Tice i sur. 2000).

U našem istraživanju uzeli smo leukocite krvi, kao lako dostupan materijal, za provjeru genotoksičnog učinka 13cRA, alendronata te istraživanih flavonoida i primjernili alkalni komet test. Poznato je da pH vrijednost pufera za lizu ima važnu ulogu u izvedbi komet testa: pod neutralnim uvjetima u repu kometa prevladavaju dvolančani lomovi u DNA, dok pod lužnatim uvjetima (pH>13) najveći doprinos količini DNA u repu kometa daju jednolančani lomovi DNA i mjesta osjetljiva na lužine (Tice i sur. 1990; McKelvey i sur. 1998), a to su apurinska i apirimidinska mjesta, koja mogu nastati u DNA pod utjecajem različitih tvari koje izazivaju uklanjanje baza, primjerice alkilirajućih kemijskih spojeva (Fortini i sur. 1996). Tijekom elektroforeze u lužnatim uvjetima, mjesta osjetljiva na lužine pretvaraju se u lomove i na taj način mogu biti otkrivena komet testom (Olive 1999). Oštećenje DNA procjenjuje se na osnovi udjela DNA u "repu" kometa i udjela DNA u "glavi" kometa. Osnovni pokazatelji koji definiraju komet su dužina repa, postotak DNA u repu (intezitet repa) i repni moment.

Naši rezultati ukazuju da 13cRA, alendronat u dozi od 2 i 40 mg kg^{-1} te krizin pokazuju najveću dužinu repa (udaljenost najkraćih odlomljeni ulomaka DNA) u odnosu na kontrolu ($P < 0,001$),

dok naringenin pokazuje najmanju dužinu repa u odnosu na kontrolu ($P < 0,05$) i u odnosu na 13cRA ($P < 0,001$) (Slika 65, Tablica 23).

Intezitet repa (postotak DNA koja je migrirala u rep) je najveći nakon obrade naringeninom ($P < 0,001$) dok intezitet repa nakon obrade ikarinom bio veći u odnosu na kontrolu za ($P < 0,01$). Obrada ikarinom i naringeninom je pokazala najveću razinu inteziteta repa u odnosu na 13cRA ($P < 0,001$). Navedeni podaci ukazuje da je moguće da dolazi do nastanka manjeg broja jednostrukih, brzo popravljivi lomova. Točnije, krvne stanice i krvotvorni organi su najosjetljiviji na brojne genotoksične spojeve, ali i s najvećom sposobnošću popravka za razliku od bubrega gdje oštećenja ostaju trajna; točnije smanjuje se njihova funkcionalna sposobnost. Oštećene stanice periferne krvi proždiru (fagocitiraju) makrofagi slezene i jetre (Kupfferove stanice) izlučujući brojne čimbenike koji potiču brzu proliferaciju totipotentnih matičnih stanica u koštanoj srži; stimuliraju proces hematopoeze. Posebice u procesu hematopoeze su važni čimbenici rasta kratkog i srednjeg dometa, primjerice, interleukini (posebice, IL-1, IL-3, IL-7), interferoni, čimbenici stimulacije kolonija, eritropoetin i dr. Hematopoietski sustav se brzo obnavlja i održava klonskom proliferacijom tri funkcionalno različita tipa stanica: matičnih stanica, progenitora i zrelih krvnih stanica. Matične stanice imaju veliku sposobnost samoobnavljanja, a diferenciraju se u različite progenitorske stanice. Progenitorske stanice nemaju sposobnost samoobnavljanja, a njihovom diferencijacijom nastaju svi tipovi zrelih krvnih stanica (eritrociti, granulociti, monociti, megakariociti i limfociti).Svakako treba spomenuti da manja razina reaktivnih radikala može biti pozitivna za stanicu; takvi radikali služe kao signalne molekule i potiču proliferaciju stanica (Giles 2006).

Alendronat u visokoj dozi je pokazao statistički značajno ($P < 0,05$) manju razinu % DNA u repu u odnosu na 13cRA (Slika 66, Tablica 24) kao i 13cRA. Ovi podatci ukazuju da alendronat i 13cRA pojačane mehanizme upalnog učinka prouzrokuju apoptozu ili nekrozu leukocitnih stanica. Točnije, stanice koje ulaze u programiranu smrt ili apoptozu imaju izrazito fragmentiranu DNA; kometi se jasno razlikuju od ostalih stanica jer imaju vrlo male glave i glavninu DNA raspršenu u dugim repovima (Olive 1999; Fairbairn i sur. 1995). Čini se da oksidacijski stres kao i novačenje upalnih stanica i njihovo brzo propadanje kroz mehanizam apoptoze i/ili nekroze bi mogao biti razlog pojačanoj fragmentaciji DNA. Povećani broj neutrofila i monocita/makrofaga ključnih stanica u procesu upale dodatno može pospješiti upalni proces oslobađanjem različitih hidrolitičkih enzima, reaktivnih posrednika kisika i dušika te mnogi drugih citotoksičnih tvari. Moguće je da makrofagi preko mehanizma ovisnog o kisiku koji se poglavito temelji na aktivnosti oksidaza ovisnih o NADPH povećavaju razinu

oksidacijskog stresa stvaraju negativn mikrookoliš. Makrofagi u ovom procesu molekulski kisik pretvaraju u aktivni ionski, iz kojeg potom nastaje vodikov peroksid. U nazočnosti mijeloperoksidaze, koja čini čak 5% suhe težine netrofila, vodikov peroksid reagira s kloridnim ionima stvarajući hipoklornu kiselinu (HOCl), snažno oksidirajuće sredstvo koje gotovo trenutno oksidira amine, tiole, nukleinske kiseline, proteine i druge biološki aktivne molekule ciljnih stanica stvarajući i organske kloramine (R-NCl) koji su slabiji oksidirajuće tvari, ali su dugotrajnijeg djelovanja. Kako pritom znatno poraste potrošnja kisika u fagocitu, ta se pojava naziva "oksidacijski, respiracijski ili metabolički prasak". Ovi učinci mogu biti pozitivni u djelovanju na mikroorganizme i tumorske stanica ali njihova stalna nazočnost može oštetiti i zdravo tkivo. Takav negativan mikrookoliš zasigurno je razlog i pojačanog oštećenja bubrega, probavnog sustava, larinksa, nekroze čeljusti i drugih oštećenja uključujući razvoj tumora koja prouzrokuje alendronat (Perazzella i Markowitz 2008; Conwell i Chang 2012; Chiang i sur. 2012).

Ovom mehanizmu zasigurno pridonosi i smanjena razina glutationa. Stanice bubrega, kao i stanice krvi imaju znatno manju razinu glutationa i njemu pridruženih enzima u odnosu na jetru gdje razina glutationa i njemu pridruženi enzima može spriječiti posljedice nastanka reaktivnih radikala te spriječiti oštećenja DNA. Primjerice, limfociti imaju 10x nižu razinu glutationa od makrofaga a oni čine 65-70% ukupnih leukocitnih stanica krvi u miša (Oršolić i sur. 2008). Glutation i pridruženi mu enzimi važni su u hvatanju toksičnih i kisikovih radikala, regulaciji antiapoptotičkih gena, posebice familiji bcl2 i p53 te regulaciji koncentracije Ca^{2+}; navedeni mehanizmi su ključni u sprječavanju procesa apoptoze.

Repni moment se obično definira kao umnožak dužine repa i % DNA u repu. Obrada štakora naringeninom pokazuje najveći repni moment u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu i skupinu RMO ($P < 0,001$; ($P < 0,001$) te ikarin ($P < 0,05$) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (Slika 67, Tablica 25). Prema dobivenim rezultatima, čini se da naringenin ima slabiju protuoksidativnu sposobnost od drugih primjenjenih flavonoida na što ukazuju i naši predhodni rezultati određivanja protuoksidativne aktivnosti flavonoida metodom β-karoten linoleatne analize, određivanje redukcijske moći, određivanje antiradikalne aktivnosti s DPPH slobodnim radikalom, te određivanje aktivnosti keliranju željeza. Navedeni rezultati pokazuju da je redukcijska moć kvercetina i krizina značajno viša u odnosu na redukcijsku moć naringenina ali mnogo je niža od redukcijske moći askorbinske kiseline. Uporabom β-karoten linoleatne analize utvrđena je odlična protuoksidativna sposobnost kvercetina dok krizin i naringenin nisu bili učinkoviti. Rezultati ukazuju na potencijalno veliku ulogu kvercetina u zaštiti staničnih

lipida od peroksidacije, obzirom da se ta analiza zasniva na lipidnoj peroksidaciji što odgovara našim rezultatima u ovom istraživanju vezano za razina lipidne peroksidacije u tkivima jetre bubrega i jajnika. Literaturni podaci ukazuju da kvercetin po svojoj strukturi ima sve značajke kao najbolji protuoksidans (Cotelle 2001).

Nadalje treba istaći da sposobnost keliranja prijelaznih metala kod flavonoida teoretski je jedna od bitnih protuoksidativnih djelovanja tih spojeva. Naime ioni metala, osobito željeza (Fe^{2+}) mogu biti uključeni u stvaranje slobodnih radikala kroz Fentnovu reakciju (Halliwell 2007) pa bi uklanjanje tih metalnih iona pogodovalo smanjenju stvaranja slobodnih radikala. Određivanjem sposobnosti keliranja dvovalentnih iona željeza ustanovljena je slaba sposobnost keliranja kod naringenina dok su kvercetin, a posebice krizin pokazali vrlo dobru sposobnost keliranja željeza, iako je ona statistički niža (P <0 ,05) nego sposobnost keliranja željeza etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA). Izrazitija aktivnost u keliranju željeza utvrđena kod krizina i kvercetina vjerojatno je zaslužna za dio protektivnog učinka ovih flavonoida u osteoporozi prouzročenoj s 13cRA, posebice u tkivima jetre zbog velike koncentracije iona željeza u stanicama jetre te jasno ukazuje na razlike između primjenjenih flavonoida u nazočnosti oksidativnog stresa.

Naši rezultati daju jasnu poveznicu između oksidacijskog stresa, protuoksidativne i protuupalne sposobnosti flavonoida te mogućeg genotoksičnog učinka. Tako dio prooksidativnog učinka jasno je vidljiv dijelom u slezeni zbog povećanog propadanja eritrocita i pojačanog oslobađanja Fe^2 te nastanka mogućnosti nastanka Fentonove reakcije. Također, rezultati ukazuju na različit učinak flavonoida u pojedinim tkivima, čini se da doza, mikrokoliš, metaboličke promjene i bioiskoristivost flavonoida zasigurno igraju važnu ulogu i da ih treba dalje istražiti poglavito radi sigurne primjene u terapijih pojedinih bolesti uključujući osteoporozu.

Temeljem ovih navoda razvidno je da svaki od flavonoida može kroz različite protuoksidativne mehanizme biti učinkovit u sprječavanju primarne ili stečene osteoporoze posljedično nastale pojačanim oksidacijskim stresom. Protuoksidativno djelovanje flavonoida temelji se na njihovoj sposobnosti supresije nastanka reaktivnih radikala kisika i dušika inhibicijom enzima ili keliranja elemenata u tragovima (Cu, Fe) koji su uključeni u njihovo nastajanje; sposobnosti sakupljanja slobodnih radikala kisika i dušika, te aktivaciji i zaštiti protuoksidativne obrane organizma (Cheng i Breen 2000; Middleton i sur. 2000; Russo i sur.

2000; Nijveldt i sur. 2001; Galati i sur. 2002; Prior 2003; Galati i O´Brien 2004; Manach i sur. 2004; Halliwell i sur. 2005; Jagetia i sur. 2005; Sobočanec i sur. 2006, Oršolić i sur. 2016).

Pokazano je da flavonoidi vežu i inhibiraju različite enzime: hidrolaze, transferaze, hidroksilaze, oksidoreduktaze i kinaze (Heim i sur. 2002; Prior 2003; Galati i O´Brien 2004 Brown i sur. 2007). Mnogi od ovih enzimskih sustava su redoks-aktivni, a neke od bioloških aktivnosti mogu biti ovisne o redoks-aktivnosti flavonoida (Middleton i sur. 2000). Učinak nekih flavonoida u redoks-ciklusu i proizvodnji toksičnih kisikovih radikala doprinosi njihovom citotoksičnom učinku koji je utvrđen na stanicama ljudskih tumora u uvjetima *in vivo* i *in vitro* (Middleton i sur. 2000; Oršolić i Bašić 2008; Oršolić 2010; Oršolić i sur. 2016).

Uzevši u obzir osjetljivost primijenjenih metoda, osobito komet testa, moguće je da bismo primjenom njegove drukčije modifikacije mogli izmjeriti još višu razinu genotoksičnosti i otkriti specifične tipove DNKA lezija. Za bolju procjenu oksidativnih oštećenja zasigurno bi trebalo primjeniti enzimski modificirani protokol (Fpg-modificirani komet test) koji jasno ukazuje na stupanj oksidativnog oštećenja DNA. Fpg-modificirani komet test temelji se na primjeni enzima formamidopirimidin glikozilaze (Fpg) koji otkriva oksidativne učinke na molekuli DNA; osim jednostrukih i dvostrukih lomova Fpg-modificirani komet test može otkriti oksidativna oštećenja purina, uključujući 8-okso-7,8-dihidroguanina; 4,6-diamino-5-formamidopirimidina i 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidina te drugih purina otvorenog prstena. Fpg-test uključen je u prvi korak popravka baza ekscizijom u uklanjanju specifično promijenjenih baza iz DNA stvaranjem apurinskih ili apirimidinskih mjesta (AP-mjesta) koje naknadno cijepaju aktivne AP liaze stvaranjem rupa u DNA, što može biti otkriveno komet testom. Tako, učestalost Fpg-osjetljivih mjesta jest pokazatelj oksidativnog oštećenja DNA što bi bio bolji pokazatelj protuoksidativne i regenerativne sposobnosti flavonoida.

Sažimajući sve dobivene podatke možemo istaći neke zaključne pripomene:

a) Oksidacijski stres jest dio mehanizma prouzročene osteoporoze s 13cRA.

b) Homeostaza kosti uglavnom je regulirana kroz funkciju osteoklasta i osteoblasta; pretjerana aktivacija osteoklasta i smanjena formiranje osteoblasta vode osteoporozi.

c) Flavonoidi povećanju mineralne gustoće kostiju, pospješenju regeneracije kosti kroz pojačanu aktivnost osteoblasta i mineralizaciju kosti, potiču sintezu biljega koštane izgradnje smanjuju vrijednosti biljega koštane razgradnje; djelotvorno suprimiraju

aktivnost osteoklasta, utječu na fizikalne i geometrijske značajke kosti, smanjuju razinu oksidacijskog stresa i imaju estrogensku aktivnost

d) Učinci ikarina, proantocijanidina i kvercetina su u razini osteogenog učinka alendronata

e) Povećana protuoksidativna i estrogenska aktivnost te manja razina oštećenja i upale zasigurno daju prednost flavonoidima pred alendronatom

f) Flavonoidi i prehrana bogata flavonoidima može imati preventivnu i terapijsku ulogu u spričavanju smanjenja koštane mase sa starenjem kao i u i patofiziološkim poremećajima.

g) Različite biološki aktivne sastavnice hrane bogate flavonoidima posjeduju jedinstveni anabolički učinak na koštane masu zbog stimulacije osteoblasta, oblikovanja i supresije osteoklasta, spriječavaju resorpciju kosti i vode povećanju kostane mase.

h) Dobiveni rezultati, daju nadu da flavonodi mogu svojim protuoksidativnim, protuupalnim i fitoestrogenskim značajkama biti učinkoviti u spriječavanju razvoja stečene osteoporoze najčešće prouzročene OS i upalom nastalom neželjenim učincima lijekova poput 13cRA

i) Osim stečene osteoporoze flavonoidi bi mogli biti dobra preventiva u spriječavanju ili usporavanju primarne osteoporoze nastale kumulativnim gubitkom kosti kao posljedice OS i starenja i hormonskih promjena.

j) Dobiveni rezultati omogućavaju bolje razumijevanje uloge flavonoida u osteoporozi prouzročenoj oksidativnom stresu ali i otvaraju nova pitanja i postavljaju nove ciljeve za buduća istraživanja.

6. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata možemo izvesti zaključke kako slijedi:

1. Retinoična kiselina injicirana u dozi od 80 mg kg^{-1} tijekom 14 dana uspješno prouzrokuje osteoporotske promjene u štakora. Navode temeljimo na:
   - sniženoj razini mineralne gustoće kostiju,
   - narušenoj histološkoj građi kostiju i pojačanoj aktivnosti osteoklasta,
   - smanjenoj razini biljega koštane izgradnje – osteokalcina, povećanoj razini biljega koštane razgradnje - C-terminalnog fragmenta tipa I kolagena (β-CTx)
   - smanjenom indeksu težine bedrenih kostiju,
   - smanjenoj relativnoj težini kosti,
   - sniženim vrijednostima geometrijskih odrednica (duljina kosti, veliki trohanter - kondil, antero-posteriorna dužina (AP) i medio-lateralna dužina (ML) proksimalnog dijela kosti, srednjeg dijela kosti (dijafize) i distalnog dijela kosti)
   - povećanoj razini vitamin D u serumu zbog nemogućnosti njegovog vezanja za VDR receptor
   - smanjenoj razini estrogena
   - povećanoj razini oksidacijskog stresa

2. Obrada štakora s 13cRA potiče svaranje upalnog okoliša djelujući na stanice koštanog i imunosnog sustava:
   - povećava udio limfocita, proizvodnju proupalnih citokina TNF-α, IL-1β i kemokina RANTES;
   - povećana migracija leukocita i proupalnih citokina i kemokina potiče diferencijaciju osteoklasta i koštanu razgradnju
   - poveća oštećenje tkiva i organa na što ukazuju biokemijski pokazatelji AST, ALP i LDH

3. Jedan od mehanizama prouzrokovanja osteoporotski promjena s 13cRA jest pojačana proizvodnja oksidacijskog stresa;
   - 13cRA povećava razinu MDA u bubregu, jetri i jajniku
   - 13cRA smanjuje razinu GSH te aktivnost enzima SOD i CAT

4. 13cRA, prouzrokuje značajna oštećenja DNA limfocita; dužinu repa značajno je veća u odnosu na kontrolu.

5. Flavonoidi su učinkoviti u liječenju osteoporoze. Osteogena učinkovitost flavonoida temelji se na:
    - povećanju mineralne gustoće kostiju; najveći učinak polučio je kvercetin i proantocijanidini
    - značajnom pospješenju regeneracije kosti kroz pojačanu aktivnost osteoblasta
    - svi flavonoidi potiču sintezu osteokalcina - biljega koštane izgradnje, posebice ikarin
    - ikarin, proantocijanidini i kvercetin smanjuju vrijednosti biljega koštane razgradnje; djelotvorno suprimiraju aktivnost osteoklasta
    - fizikalne i geometrijske značajke su znatno poboljšane; ikarin je polučio najbolji učinak dok je krizin pokazao najslabiji učinak
    - vrijednosti fizikalnih i geometrijski značajki kosti dosežu vrijednosti kontrole
    - smanjuju razinu oksidacijskog stresa
    - imaju estrogensku aktivnost

6. Flavonoidi uspješno kontroliraju upalni odgovor:
    - poboljšavajući homeostazu mikrookoliša, smanjuju razinu oštećenja strukture kosti i gubitak koštane mase, te pospješuju aktivaciju osteoblasta i mineralizaciju kosti.
    - snižavaju razinu biokemijskih pokazatelja AST, ALP i LDH

7. Kontrola upale flavonoidima može biti važan terapeutski cilj u liječenju osteoporoze

8. Flavonoidi su učinkoviti kao fitoestrogeni; ikarin i kvercetin imaju najsnažniji fitoestrogenski učinak

9. Krizin stvara najveći broj ulomaka DNA, dok naringenin pokazuje najveći % DNA u repu i moment repa ukazujući na prisutnost ulomaka DNA velike molekulske mase

10. Bifosfonat alendronat pokazuje značajan osteogeni učinak u terapiji osteoporeze

- visoke doze alendronate povećava značajno mineralnu gustoću kostiju, indeks i relativnu težinu kosti
- povećavava fizikalne i gemetrijska obilježja kostiju
- broj osteoblasta, struktura i građa kostiju su poboljšani

11. Alendronat povećava upalni odgovor; broj monocita i neutrofila je povećan

12. Alendroant povećava razinu oksidacijskog stresa u jetri, slezeni i bubrezima

13. Estrogenska aktivnost alendronate je slabija u usporedbi s flavonoidima

14. Alendronat pokazuje genotoksični učinak na DNA limfocita; dužina repa je povećana, postotak DNA u repu i monment repa je smanjen što ukazuje na veliki broj ulomaka DNA male molekulske mase; dugi repovi malih molekulskih ulomaka značajka su pojačanog apoptotičkog procesa

15. Uzevši u obzir sve navedene pokazatelje, flavonoidi mogu biti dobra zamjena za alendronat, koji izaziva jak upalni učinak i njegova dugotrajna upotreba je povezana s povećanim rizikom od razvoja raka jajnika, endometrija i dojke u žena u postmenopauzi kao i atipičnih lomova nakon dugotrajnog unosa. Nadalje, laka dostupnost, ekonomska isplativost i nedostatak toksičnosti mogu biti prednost u primjeni flavonoida u odnosu na alendronat.

16. Flavonoidi i hrana bogata flavonoidima mogu biti korisni u svim oblicima stečene osteoporoze prouzročene oksidativnim stresom, smanjenjenom razinom estrogena i posljedičnom sintezom proupalnih citokina koji vode povećanju broja i aktivnosti osteoklasta te pojačanoj resorpciji kosti, smanjenju čvstoće, rasta i razine okoštavanja kosti.

17. Dobiveni rezultati pokazuju mogućnost novog farmakoterapijskog pristupa u terapiji osteoporotičnih promjena te moguće bioiskoristivosti flavonoida i potvrde njihove biološke učinkovitosti u međureakcijama hrana-lijek, hrana-toksin, hrana-hrana te novi pristup i napredak u razumijevanju odnosa između prehrane i zdravlja te razvoja koncepta funkcionalne hrane s temeljnim ciljem postizanja boljeg zdravstvenog statusa, sprječavanja i liječenja bolesti uključujući osteoporozu.

7. CITIRANA LITERATURA

1. Aganović I (1993) Epidemiologija osteoporoze. Medicus 2:25-33.
2. Agencija za lijekove i medicinske proizvode (Internet) (2012). http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-11-02-347.pdf.
3. Al tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C (2013) Vitamin A and retinoid signalling: genomic and non-genomic effetcs. J. Lipid Res. 54, 1761-1775.
4. Albright F, Smith Ph, Richardson Am (1941) Postmenopausal osteoporosis. JAMA 1941;116:2465–74.
5. Ambriović Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Ćetković H, Herak Bosnar M, Hranilović D, Katušić Hećimović S, Meštrović Radan N, Mihaljević S, Slade N, Vujaklija D (2007) Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb
6. Ammann P, Rizzoli R (2003) Bone strength and its determinants. Osteoporos. Int. 14 (3) : 13–18.
7. Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME (1995) Metaanalysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. N. Engl. J. Med. 333:276–282.
8. Anthony Ms, Clarkson Tb, Hughes Cl Jr, Morgan Tm, Burke Gl (1996) Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. J. Nutr. 126:43–50.
9. Arjmandi BH, Khan DA, Juma SS, Svanborg A (1997) The ovarian hormone deficiency induced hypercholesterolemia is reversed by soy protein and the synthetic isoflavone, ipriflavone. Nutr. Res. 17:885–894.
10. Aruoma OI (1994) Free radicals and antioxidant strategies in sports. J. Nutr. Biochem. 5:370-81.
11. Asano N, Katsuma Y, Tamura H, Higashikuni N, Hayashi M (1998) An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stainedperipheral blood cells. Mutat Res. 404:149-154.
12. Baatout S, Derradji H (2004) Cytometric methods to analyze radiation effects. J. Biol. Regul. Homeost Agents 18(2):101-5.
13. Badran Z, Kraehenmann MA, Guicheux J, Soueidan A (2009) Bisphosphonates in Periodontal Treatment: A Review. Oral Health Prev. Dent. 7(1):3-12.
14. Balmer JE, Blomhoff R (2002) Gene expression regulation by retinoic acid. J. Lipid Res. 43(11):1773-1808.

15. Ban M, Tonai T, Kohno T, Matsumoto K, Horie T, Yamamoto S, Moskowitz MA, Levine L (1989) A flavonoid inhibitor of 5-lipoxygenase inhibitis leukotriene production following ischemia in gerbil brain. Stroke 20(2):248-252.
16. Barnes S, Kim H, Darley-Usmar V, Patel R, Xu J, Boersma B, Luo M (2000) Beyond ERα and ERβ: estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. J. Nutr. 130 (3):656S-657S.
17. Bascu SK Michaelsson, Olofsson H, Johansson S, Melhus M (2001) Association between oxidative stress and bone mineral density. Biochem. Biophys. Res. Commun. 288:275-279.
18. Becker DJ, Kilgore ML (2010) The societal burden of osteoporosis. Curr. Rheumatol. Rep. 12(3):186–91.
19. Benavente-García O, Castillo J (2008) Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. J. Agric. Food Chem. 56(15):6185-205.
20. Bender DA (2003) Nutritional Biochemistry of the Vitamins. 2. Izdanje, Cambridge University Press, The Edinburgh Building, UK.
21. Berend S, Grabarić Z (2008) Određivanje polifenola u namirnicama metodom ubrizgavanja u pritok. Arh. Hig. Rada Toksikol. 59(3):205-212.
22. Berg-Divald I (2009) Flavonoid u propolisu kao moguća alternativa u borbi protiv raka. http://www.pcela.hr/index.php?option=com_content&task=view&id=352.
23. Bergman Jungestrom M, Thompson LU, Dabrosin C (2007) Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast xenografts in vivo. Clin. Cancer Res. 13:1061-7.
24. Bertelli AA, Ferrara F, Diana G, Fulgenzi A, Corsi M, Ponti W, Ferrero ME, Bertelli A. Resveratrol (1999) A natural stilbene in grapes and wine, enhances intraphagocytosis in human promonocytes: a co-factor in anti-inflammatory and anticancer chemopreventive activity. Int. J. Tissue. React. 21(4):93-104.
25. Biesalski HK (2007) Polyphenols and inflammation: basic interactions. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 10(6):724-728.
26. Binkley N, Krueger D (2000) Hypervitaminosis A and bone. Nutr. Rev. 58(5):138-144.
27. Bladé C, Arola L, Salvadó MJ (2010) Mol. Nutr. Food Res. 54(1):37-59.
28. Blaner WS, Olson JA (1994) Retinol and retinoid acid metabolism. U: Sparn M, Roberts A, Goodman D (eds.) The retinoids. Biology, chemistry and medicine. 2nd. ed, Vol 1. Raven Press, New York, pp 229-256.

29. Body JJ, Bergmann P, Boonen S, Boutsen Y, Devogelaer JP, Goemaere S, Kaufman JM, Rozenberg S, Reginster JY (2010) Evidence-based guidelines for the pharmacological treatment of postmenopausal osteoporosis: a consensus document by the Belgian Bone Club. Osteoporos Int. 21(10):1657-1680.
30. Bombail V, Aw D, Gordon E, Batty J (2001) Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (Pholis gunnellus) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. Chemosphere 44(3):383-92.
31. Bonura F (2009) Prevention, screening, and management of osteoporosis: an overview of the current strategies. Postgrad. Med. 121(4):5-17.
32. Boots AW, Haenen GR, Bast A (2008) Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. Eur. J. Pharmacol. 13(585):325-337.
33. Boots AW, Kubben N, Haenen GRMM, Bast A (2003) Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 308(3):560–565.
34. Boots AW, Li H, Schins RPF, Duffin R, Heemskerk JWM, Bast A, Haenen GRMM (2007) The quercetin paradox. FEBS Lett. 222(1):89–96.
35. Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr. Rev. 56:317-333.
36. Brown E, Hurd NS, McCall S, Ceremuga TE (2007) Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a Passiflora incarnata extract, in the laboratory rat. AANA J. 75(5):333-7.
37. Bugianesi R, Catasta G, Spigno P, Maiani G (2002) Naringenin from Cooked Tomato Paste Is Bioavailable in Men. J. Nutr. 132(11) :3349-3352.
38. Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Heaney RP (2004) Nutritional Aspects of Osteoporosis, 2nd Edition. Elsevier Inc., London
39. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A (2007) Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. J. Bone Miner. Res. 22(3):465-75.
40. Canalis E, Andrea G, Bilezikian JP (2007) N. Engl. J. Med. 2007357:905-16.
41. Carli CB, De Matos DC, Lopes FC, Maia DC, Dias MB, Sannomiya M, Rodrigues CM, Andreo MA, Vilegas W, Colombo LL, Carlos IZ (2009) Isolated flavonoids against mammary tumor cells LM2. Z. Naturforsch C. 64(1-2):32-6.
42. Cashman KD (2007) Diet, Nutrition, and Bone Health. J. Nutr. 137:2507S-2512S.
43. Cassidy A, Albertazzi P, Lise Nielsen I, Hall W, Williamson G, Tetens I, Atkins S, Cross H, Manios Y, Wolk A, Steiner C, Branca F (2006) Critical review of health effects

of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women. Proc. Nutr. Soc. 65(1):76-92.

44. Cassidy A, Bingham S, Setchell K (1995) Biological effects of isoflavones in young women-importance of the chemical compostion of soya products. Br. J. Nutr. 74:587–560.
45. Cassidy A, Bingham S, Setchell KDR (1994) Biological effects of isoflavones present in soy in premenopausal women: implications for the prevention of breast cancer. Am. J. Clin. Nutr. 60:333–340.
46. Catala A (2009) Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. Chem. Phys. Lip. 157(1):1-11.
47. Channarayappa Ong T, Nath J (1992) Cytogenetic effects of vincristine sulfate and ethylene dibromide in human peripheral lymphocytes: micronucleus analysis. Environ Mol. Mutagen. 20(2):117-26.
48. Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. Br. Med. Bull. 49:481-93.
49. Chen KM, Ge BF, Liu XY, Ma PH, Lu MB, Bai MH (2007) Icariin inhibits the osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor in mouse bone marrow culture. Pharmazie 62:388–391.
50. Chen YM, Ho SC, Woo JL (2006) Greater fruit and vegetable intake is associated with increased bone mass among postmenopausal Chinese women. Br. J. Nutr. 96(4):745–51.
51. Cheng IF, Breen K (2000) On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. Biometals 13(1):77-83.
52. Chesnut CH 3rd, Silverman S, Andriano K, Genant H, Gimona A, Harris S, Kiel D, LeBoff M, Maricic M, Miller P, Moniz C, Peacock M, Richardson P, Watts N, Baylink D (2000) A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. Am. J. Med. 109(4):267-76.
53. Chiang CH, Huang CC, Chan WL, Huang PH, Chen TJ, Chung CM, Lin SJ, Chen JW, Leu HB (2012) Oral alendronate use and risk of cancer in postmenopausal women with osteoporosis: A nationwide study. J. Bone. Miner. Res. 27,1951-8.

54. Choi HJ, Park YR, Nepal M, Choi BY, Cho NP (2010) Inhibition of osteoclastogenic differentiation by Ikarisoside AinRAW264.7 cells via JNK and NF-B signaling pathways. Eur. J. Pharmacol. 636(1-3):28–35.
55. Chytil F, Ong DE (1979) Cellular retinol and retinoic acid-binding proteins in vitamin A action. Fed. Proc. 38:2510-8.
56. Cisneros FJ, Gough BJ, Patton RE, Ferguson SA (2005) Serum levels of albumin, triglycerides, total protein and glucose in rats are altered after oral treatment with low doses of 13-cis-retinoic acid or all-trans-retinoic acid. J. Appl. Toxicol. 25(6):470-8.
57. Close GL, Ashton TA, McArdle A, MacLaren DP (2005) The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. Comp. Biochem. Physiol. Part A 142:257-66.
58. Col N, Eckman MH, Karas RH, Pauker SG, Goldberg RJ, Ross EM, Orr RK, Wong JB (1997) Patient-specific decisions about hormone replacemant therapy in postmenopausal women. J. Am. Med. Assoc. 277:1140–1147.
59. Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol. Biotechnol. 26(3):249-61 (Review).
60. Collins AR, Dobson VL, Dušinská M, Kennedy G, Štetina R (1997) The comet assay: what can it really tell us? Mutation Res. 375:183-193.
61. Conquer JA, Maiani G, Azzini E, Raguzzini A, Holub BJ (1998) Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. J. Nutr. 128(3):593–597.
62. Conwell LS, Chang AB (2012) Bisphosphonates for osteoporosis in people with cystic fibrosis. Cochrane. Database. Syst. Rev. doi: 10.1002/14651858.CD002010.pub3.
63. Cooper C (1997) The crippling consequences of fractures and their impact on quality of life. Am. J. Med. 103(2A)12S-9.
64. Cooper C, Campion G (1992) Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. Osteoporosis Int. 2:285-289.
65. Cotelle N (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. Curr. Top. Med. Chem. 1(6):569-590.
66. Cotelle S, Férard JF (1999) Comet assy in Genetic Ecotoxicology: A Review. Environ Mol. Mutagen 34(4):246-255.
67. Coxam V (2008) Phyto-oestrogens and bone health. Proc. Nutr. Soc. 67(2):184-95.
68. Cranney A, Tugwell P, Zytaruk N, Robinson V, Weaver B, Adachi J, Wells G, Shea B, Guyatt G (2002) Osteoporosis Methodology Group and The Osteoporosis Research

Advisory Group. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. IV. Meta-analysis of raloxifene for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. Endocr. Rev. 23(4):524-528.

69. Crouse JR, Terry JG, Morgan TM, McGill BL, Davis DH, King T, Ellis JE, Burke GL (1998) Soy protein containing isoflavones reduces plasma concentrations of lipids and lipoproteins. Circulation 97:816 (abs).
70. Cvijetić Avdagić S, Grazio S, Kaštelan D, Koršić M (2007) Epidemiologija osteoporoze. Arh. Hig. Rada Toksikol. 58: 13-18.
71. Dalais FS, Rice GE, Wahlqvist ML, Grehan M, Murkies AL, Medley G, Ayton R, Strauss BJ (1998) Effects of dietary phytoestrogens in postmenopausal women. Climacteric 1:124–9.
72. DalBo S, Goulart S, Horst H, Pizzolatti MG, Ribeiro-do-Valle RM (2008) Activation of endothelial nitric oxide synthase by proanthocyanidin-rich fraction from Croton celtidifolius (Euphorbiaceae): involvement of extracellular calcium influx in rat thoracic aorta. J. Pharmacol. Sci. 107(2):181–189.
73. Dang ZC, Lowik C (2005) Dose-dependent effects of phytoestrogens on bone. Trends Endocrinol. Metab. 16:207–213.
74. De Boer J, Andresson JO, J de Wit, Juijmans J, Beems RB, H van Steeg (2002) Premature aging in mice deficient in DNA repair and transcription. Science 296:1276-1279.
75. De Wilde A, Colin C, Lacroix H (2001) In vivo and ex vivo effects of an isoflavone-rich diet on bone formation in growing pigs. Ann. Nutr. Metab. 45:227 (abstr).
76. Delmas PD (2008) Clinical potential of RANKL inhibition for the management of postmenopausal osteoporosis and other metabolic bone diseases. J. Clin. Densitom. 11(2):325-338.
77. Dennison E, Cooper C (2000) Epidemiology of osteoporotic fractures. Horm Res. 54 (suppl 1):58-63.
78. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo A, Capasso F (1999) Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, Life Sciences 65(4):337-353.
79. DiGiovanna JJ (2001) Systemic retinoid therapy. Dermatol. Clin. 19(1):161-167.
80. DiGiovanna JJ, Sollitto RB, Abangan DL, Steinberg SM, Reynolds JC (1995) Osteoporosis is a toxic effect of long-term etretinate therapy. Arch. Dermatol. 131 (11):1263-1267.

81. Domitrović R, Tota M, Milin Č (2006) Oxidative stress in mice: effects of dietary corn oil and iron. Biol. Trace. Elem. Res. 113(2):177-91.
82. Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS (2003) Phyto-oestrogens. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 17(2):253-271.
83. Durgo K, Vuković L, Rusak G, Osmak M, Franekić Čolić J (2007) Effect of Flavonoids on Glutathione Level, Lipid Peroxidation and Cytochrome p450 CYP1A1 Expression in Human Laryngeal Carcinoma Cell Lines. Food Technol. Biotechnol. 45:69-79.
84. EMA/258269/2013. (www.ema.europa.eu)
85. Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpaa J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A (2000) Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. Eur. J. Clin. Pharmacol. 56(8):545–553.
86. Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A (2001) Plasma Kinetics and Urinary Excretion of the Flavanones Naringenin and Hesperitin in Humans after Ingestion of Orange Juice and Grapefruit Juice. J. Nutr. 131:235-241.
87. Escarpa A, Gonzalez MC (2001) An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. Crit. Rev. Anal. Chem. 31:57-139.
88. Fahmy SR, Soliman AM (2009) Oxidative Stress as a Risk Factor of Osteoporotic Model Induced by Vitamin A in Rat. AJBAS 3(3):1559-1568.
89. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: a comprehensive review. Mutat. Res. 339(1):37-59.
90. Favus MJ (2010) Bisphosphonates for Osteoporosis. N. Engl. J. Med. 363(21):2027-3.
91. Fenech M (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutat. Res. 285(1):35-44.
92. Fenech M (1993a) The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. Environ Health Perspect. 101 Suppl. 3:101-7 (Review).
93. Fenech M (1993b) The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutat. Res. 285(1): 35-44 (Review).
94. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E (2003) Human Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutat. Res. 534(1-2):65-75.

95. Ferreira D, Li XC (2000) Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. Nat. Prod. Rep. 17:193–212.
96. Ferretti JL, Capozza RF, Zanchetta JR (1996) Mechanical validation of a tomographic (pQCT) index for noninvasive estimation of rat femur bending strength. Bone 18:97–102.
97. Feskanich D, Singh V, Willett WC, Colditz GA (2002) Vitamin A intake and hip fractures among postmenopausal women. JAMA 287(1):47-54.
98. Ficcara G, Beninati F, Rubino I, Vannucchi A, Longo G, Tonelli P, Pini Prato G (2005) Osteonecrosis of the jaws in periodontal patients with a history of bisphosphonates treatment. J. Clin. Periodontol. 32(11):1123-8.
99. Fitzpatrick LA (2002) Secondary causes of osteoporosis. Mayo Clin Proc. 77(5):453-468.
100. Fortini P, Raspaglio G, Falchi M, Dogliotti E (1996) Analysis of DNA alkylation damage and repair in mammalian cells by the comet assay. Mutagenesis 11(2):169-175.
101. Gadoth N, Göbel HH (2011) Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology. Humana Press, London.
102. Galati G, O`Brien PJ (2004) Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. Serial Review: Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorbtion, Metabolism, and Bioactivity. Free. Radic. Biol. Med. 37(3):287-303.
103. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O`Brien PJ (2002) Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other poliphenolics. Toxicol 177:91-104.
104. Gallagher JC, Rafferty K, Haynatzka V, Wilson M (2000) The effect of soy protein on bone metabolism. J. Nutr. 130:667S (abstr).
105. Galluzzo P, Ascenzi P, Bulzomi P, Marino M (2008) The Nutritional Flavanone Naringenin Triggers Antiestrogenic Effects by Regulating Estrogen Receptor -Palmitoylation. Endocrinology 149(5):2567-2575.
106. Gamet-Payrastre L, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H, Payrastre B (1999) Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. Gen. Pharmacol. 32(3):279–286.
107. Gao K, Henning SM, Niu Y, Youssefian AA, Seeram NP, Heber D (2006) The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. J. Nutr. Biochem. 17(2):89-95.

108. Garaj-Vrhovac V, Kopjar N (1998) The comet assay-a new technique for detection of DNA damage in genetic toxicology studies and human biomonitoring. Period. Biol. 100(3):361-366.

109. Gaspar J, Rodrigues Laries A, Silva F, Costa S, Monteiro MJ, Monteiro C, Rueff J (1994) On the mechanisms of genotoxicit and metabolism of quercetin. Mutagenesis 9(5):445-449.

110. Gašparević-Ivanek V (2003) Fitostrogeni, Medix 9(50):90-93.

111. Gates BJ, Sonnett TE, Duvall CA, Dobbins EK (2009) Review of osteoporosis pharmacotherapy for geriatric patients. Am. J. Geriatr. Pharmacother. 7(6):293-323.

112. Geraets L, Moonen HJJ, Brauers K, Wouters EFM, Bast A, Hageman GJ (2007) Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. J. Nutr. 137(10):2190–2195.

113. Giles GI (2006) The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer. Curr. Pharm. Des. 12(34):4427-4443 (Review).

114. Giljević Z (2008) Značenje stimulirajućeg hormona štitnjače (TSH) na koštanu masu u štakorskom modelu osteoporoze i u bolesnica sa smanjenom mineralnom gustoćom kosti. Doktorska disertacija, Središnja medicinska knjižnica, Sveučilište u Zagrebu

115. Gimeno AR, Zaragoza I, Vivo-Sese JR, Vina VJ Miralles (2004) Retinol, at concentrations greater than the physiological limit, induces oxidative stress and apoptosis in human dermal fibroblasts. Exp. Dermatol. 13(1):45-54.

116. Green MH, Lowe JE, Delaney CA, Green IC (1996) Comet assay to detect nitric oxide- dependent DNA damage in mammalian cells. Methods Enzymol. 269:243-266.

117. Grisolia CK, Starling FL (2001) Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoa, under influence of sewage treatment plant discharges. Mutat. Res. 491(1-2):39-44.

118. Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Pomblum VJ, Rocha JBT, Farina M (2009) Importance of the Lipid Peroxidation Biomarkers and Methodological Aspects For Malondialdehyde Quantification. Quim Nova 32 (1):169-174.

119. Halliwell B (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am. J. Med. 91(3C):14S-22S.

120. Halliwell B (2000) Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? Cardiovasc. Res. 47(3):410-418.

121. Halliwell B (2007) Biochemistry of oxidative stress. Biochem. Soc. Transact. 35(5):1147-1150.

122. Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free Radicals in Biology and Medicine 3rd ed. Oxford University Press, New York.

123. Halliwell B, Rafter J, Jenner A (2005) Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? Am. J. Clin. Nutr. 81:268S-76S.

124. Hammam MT, Tucker KL, Dawson-Hudghes B, Cupples LA, Felson DT, Kieli DP (2000) Effect of Dietary Protein on Bone Loss in Elderly Men and Women: The Framingham Osteoporosis Study. 15(12):2504.

125. Harmon AW, Patel YM (2004) Naringenin inhibits glucose uptake in MCF-7 breast cancer cells: a mechanism for impaired cellular proliferation. Breast Cancer Res. Treat. 85(2):103–110.

126. Harris HA (2007) Estrogen receptor-ß: recent lessons from in vivo studies. Mol. Endocrinol. 21(1):1-13.

127. Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M Jr (1990) The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. Mutat. Res. 254(4):245-9.

128. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. J. Nutr. Biochem. 13:572-584.

129. Heo HJ, Choi SJ, Kim HK, Shin DH (2004) Effect of Antioxidant Flavanone, Naringenin, from Citrus junos on Neuroprotection. J. Agric. Food Chem. 52(6):1520-1525.

130. Hertrampf T, Gruca MJ, Seibel J, Laudenbach U, Fritzemeier KH, Diel P (2007) The bone-protective effect of the phytoestrogen genistein is mediated via ER alpha-dependent mechanisms and strongly enhanced by physical activity. Bone 40(6):1529-1535.

131. Hollman PC, De Vries JH, Van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. Am. J. Clin. Nutr. 62(6):1276–1282.

132. Horcajada-Molteni MN, Crespy V, Coxam V, Davicco MJ, Rémésy C, Barlet JP (2000) Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. J. Bone Miner. Res. 15(11): 2251-2258.

133. Hou YC, Hsiu SL, Yen HF, Chen CC, Chao PD (2000) Effects of honey on naringin absorption from a decocton oft he pericarps of Citrus grandis. Planta Medica 66 (5):439-43.

134. Hough S, Avioli LV, Muir H, Gelderblom D, Jenkins G, Kurasi H, Slatopolsky E, Bergfeld MA, Teitelbaum SL (1988) Effects of hypervitaminosis A on the bone and mineral metabolism of the rat. Endocrinology 122(6):2933-2939.

135. Hsieh TP, Sheu SY, Sun JS, Chen MH (2011) Icariin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF-κB regulated HIF-1α and PGE(2) synthesis. Phytomedicine 18(2-3):176-185.

136. http://www.odisej.biz/revija/clanak.asp?id=5443.

137. Huang GC, Lee CJ, Wang KT, Weng BC, Chien TY, Tseng SH (2013) Immunomodulatory effects of Hedysarum polybotrys extract in mice macrophages, splenocytes and leucopenia. Molecules 18:14862–75.

138. Hulbert AJ (2010) Metabolism and longevity: is there a role for membrane fatty acids? Integr. Comp. Biol. 50(5):808-817.

139. Ilich JZ, Kerstetter JE (2000) Nutrition in Bone Health Revisited: A Story Beyond Calcium. J. Am. Coll. Nutr. 19(6):715-737.

140. Inoue J, Choi JM, Yoshidomi T, Yashiro T, Sato R (2010) Quercetin enhances VDR activity, leading to stimulation of its target gene expression in Caco-2 cells. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) 56(5):326-30.

141. International Osteoporosis Foundation. IOF Osteoporosis Teaching Slide Kit. Available<http://www.osteofound.org/health_professionals/teaching_resources/

142. Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, Langdahl B, Van Meurs JB, Mosekilde L, Scollen S, Albagha OM, Bustamante M, Carey AH, Dunning AM, Enjuanes A, van Leeuwen JP, Mavilia C, Masi L, McGuigan FE, Nogues X, Pols HA, Reid DM, Schuit SC, Sherlock RE, Uitterlinden AG; GENOMOS Study (2004) Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. JAMA 292(17):2105-2114.

143. Irina I, Mohamed G (2012) Biological Activities and Effects of Food Processing on Flavonoids as Phenolic Antioxidants. Adv. Appl. Biotechnol. DOI:10.5772/30690.

144. Jagetia GC, Reddy KT (2005) Modulation of radiation-induced alteration in the antioxidant status of mice by naringin. Life. Sci. 77(7):780-794.

145. Jagetia GC, Reddy TK (2002) The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. Mutat. Res. 519(1-2):37 48.

146. Jayo MJ, Anthony MS, Register TC, Rankin SE, Vest T, Clarkson TB (1996) Dietary soy isoflavones and bone loss: a study in ovariectomized monkeys. J. Bone Miner. Res. 11:S228 (abstr).

147. Jensen EV, Jordan VC (2003) The estrogen receptor: A model for molecular medicine. Clin. Cancer Res. 9(6):1980– 1989.

148. Johansson S, Lind PM, Hakansson H, Oxlund H, Orberg J, Melhus H (2002) Subclinical hypervitaminosis A causes fragile bones in Rats. Bone 31:685–689.

149. Josipović P, Oršolić N (2008) Citotoksičnost polifenolnih/flavonoidnih spojeva u kulturi leukemijskih stanica. Arh. Hig. Rada Toksikol. 59(4):298-308.

150. Junqueira LC, Carneiro J (2005) Osnove histologije. Školska knjiga, Zagreb, str. 141-144; 428.

151. Kanis JA, Melton LJ 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N (1994) The diagnosis of osteoporosis. J. Bone Miner. Res. 9(8):1137-1141.

152. Kaštelan D (2000) Osteoporoza-tiha epidemija: Rizični čimbenici, dijagnostika i liječenje. Fizioterapija 4:12-16.

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

154. Kazazić S (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. Arh. Hig. Rada Toksikol. 55:279-290.

155. Keinan-Boker L, van Der Schouw YT, Grobbee DE, Peeters PH (2004) Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. Am. J. Clin. Nutr. 79(2):282–288.

156. Khan MS, Devaraj H, Devaraj N (2011) Chrysin abrogates early hepatocarcinogenesis and induces apoptosis in N-nitrosodiethylamine-induced preneoplastic nodules in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 251(1):85-94.

157. Khaw KT, Reeve J, Luben R, Bingham S, Welch A, Wareham N, Oakes S, Day N (2004) Prediction of total and hip fracture risk in men and women by quantitative ultrasound of the calcaneus: EPIC-Norfolk prospective population study. Lancet 363 (9404):197-202.

158. Khosla S, Melton III LJ, Riggs BL (2011) The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed Bone Miner. Res. 26(3):441–51.

159. Kindmark A, Törmä H, Johansson A, Ljunghall S, Melhus H (1993) Reverse transcription-polymerase chain reaction assay demonstrates that the 9-cis retinoic acid receptor alpha is expressed in human osteoblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 192(3):1367-1372.

160. Klejdus B, Mikelová R, Petrlová J, Potěšil D, Adam V, Stiborová M, Hodek P, Vacek J, Kizek R, Kubáň V (2005) Evaluation of isoflavone aglycon and glycoside distribution in soy plants and soybeans by fast column high-performance liquid chromatography coupled with a diode-array detector. J. Agric Food Chem. 53(15):5848-5852.

161. Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB, Abbott TA 3rd, Berger M (2000) Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. J. Bone Miner. Res.15(4):721-39.

162. Kneissel M, Studer A, Cortesi R, Susa M (2005) Retinoid-induced bone thinning is caused by subperiosteal osteoclast activity in adult rodents. Bone 36(2):202-14.

163. Kohen R, Nyska A (2002) Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. Toxicol. Pathol. 30(6):620-650.

164. Kopjar N, Garaj-Vrhovac V, Milas I (2002) Assesment of chemotherapyinduce DNA damage in peripheral blood leukocytes of cancer pateints using the alkaline comet assay. Teratog. Carcinog. Mutagen. 22(1):13-30.

165. Koršić M (1993) Klinička slika osteoporoze. Medicus 2:55-65.

166. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, Van der Saag PT, Van der Burg B, Gustafsson JA (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. Endocrinology 139(10):4252-4263.

167. Kulak CA, Dempster DW (2010) Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. 54(2):87-98.

168. La VD, Tanabe S, Grenier D (2009) Naringenin inhibits human osteoclastogenesis and osteoclastic bone resorption. J. Periodontal Res. 44(2):193-198.

169. Lechner and von Baehr (2015) Chemokine RANTES/CCL5 as an unknown link between wound healing in the jawbone and systemic disease: is prediction and tailored treatments in the horizon? The EPMA Journal 6:10 DOI 10.1186/s13167-015-0032-4.

170. Lee CA, Einharn TA (2001) The bone organ system: form and function. U: Marcus R, Feldman D, Kelsey J (eds.) Osteoporosis. 2nd ed, Vol 1. Elsevier Academic Press, London, UK.

171. Lee GS, Kochhar DM, Collins MD (2004) Retinoid-induced limb malformations. Curr. Pharm. 10,2657-99.

172. Lee JC, Kim J, Park JK, Chung GH, Jang YS (2003) The antioxidant, rather than prooxidant, activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis. Exp. Cell Res. 291(2):386-397.

173. Lee S, Israel B (2007) Osteoporosis. Elsevier Saunders 33(2007)149–176.

174. Lee SH, Park YB, Bae KH, Bok SH, Kwon YK, Lee ES, Choi MS (1999) Cholesterol-Lowering Activity of Naringenin via Inhibition of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase and Acyl Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase in Rats. Ann. Nutr. Metab 43(3):173-80.

175. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA (2008) The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. Comp. Med. 58(5):424-30.

176. Lephart ED, Setchell KD, Lund TD (2005) Phytoestrogens: hormonal action and brain plasticity. Brain Res. Bull. 65(3):193-198.

177. Li X, Wang JN, Huang JM, Xiong XK, Chen MF, Ong CN, Shen HM, Yang XF (2011) Chrysin promotes tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis in human cancer cell lines. Toxicol. In Vitro 25(3):630-635.

178. Lian JB, Stein GS, Canalis E (1999) Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins, and the mineralization process. In: Favus MJ (ed.) Primer on the Metabolic Bone Diseases of Mineral Metabolism. 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

179. Liao EY, Luo XH, Wang WB (2003) Effects of different nylestriol/levonorgestrel dosages on bone metabolism in female Sprague-Dawley rats with retinoic acid-induced osteoporosis. Endocr. Res. 29(1):23-42.

180. Lim EK, Higgins GS, LiY, Bowles DJ (2003) Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose: glucosyltransferase is maintained in planta. Biochem. J. 373(3):987-992.

181. Lind PM, Johansson S, Rönn M, Melhus H (2006) Subclinical hypervitaminosis A in rat: measurements of bone mineral density (BMD) do not reveal adverse skeletal changes. Chem. Biol. Interact. 159(1):73-80.

182. Liu YZ, Cao YG, Ye JQ, Wang WG, Song KJ, Wang XL, Wang CH, Li RT, Deng XM (2010) Immunomodulatory effects of proanthocyanidin A-1 derived in vitro from Rhododendron spiciferum. Fitoterapia 81(2):108-14.

183. Looker AC, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP, Johnston CC Jr, Lindsay R (1998) Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults. Osteoporos Int. 8(5):468–489.

184. Lv PC, Cai TT, Qian Y, Sun J, Zhu HL (2011) Synthesis, biological evaluation of chrysin derivatives as potential immunosuppressive agents. Eur. J. Med. Chem. 46(1):393-398.

185. Lydeking-Olsen E, Jensen JBE, Setchell KDR, Damhus M, Jensen TH (2002) Isoflavone-rich soymilk prevents bone-loss in the lumbar spine of postmenopausal women: a 2 year study. J. Nutr. 132:582S (abstr).

186. Ma HP, Ming LG, Ge BF, Zhai YK, Song P, Xian CJ, Chen KM (2011) Icariin is more potent than genistein in promoting osteoblast differentiation and mineralization in vitro. J. Cell. Biochem. 112(3):916-923.

187. Mackinnon ES, Rao AV, Josse RG, Rao LG (2011) Supplementation with the antioxidant lycopene significantly decreases oxidative stress parameters and the bone resorption marker N-telopeptide of type I collagen in postmenopausal women. Osteoporos Int. 22:1091–1101.

188. MacLean C, Newberry S, Maglione M, McMahon M, Ranganath V, Suttorp M, Mojica W, Timmer M, Alexander A, McNamara M, Desai SB, Zhou A, Chen S, Carter J, Tringale C, Valentine D, Johnsen B, Grossman J (2008) Systematic review: comparative effectiveness of treatments to prevent fractures in men and women with low bone density or osteoporosis. Ann. Intern. Med. 148(3):197-213.

189. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. 79(5):727-747.

190. Manjeet KR, Ghosh B (1999) Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production in murine macrophages. Int. J. Immunopharmacol. 21(7):435–443.

191. Marucs R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ (2010) Fundamentals of Osteoporosis. Academic Press, Burlington USA.

192. Matovinović J (1970) Osteoporoza, Medicinska enciklopedija, Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 107-108.

193. McCord JM (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress. Am. J. Med. 108 (8):652-659.

194. McKelvey-Martin VJ, Ho ET, McKeown SR, Johnston SR, McCarthy PJ, Rajab NF, Downes CS (1998) Emerging applications of the single cell gel electrophoresis

(Comet assay). I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. Mutagenesis 13(1):1-8.

195. Meunier PJ, Slosman DO, Delmas PD (2004) SOTI. N. Engl. J. Med. 350:459-468.

196. Michaelsson K, Lithell H, Vessby B, Melhus H (2003) Serum Retinol Levels and the Risk of Fracture. N. Engl. J. Med. 348(4):287-294.

197. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacol Rev. 52(4):673-751 (Review).

198. Mi-Kyung L, Song-Hae B, Tae-Sook J, Surk-Sik M, Seung-Eun L, Yong Bok P, Myung-Sook C (2002) Supplementation of naringenin and its synthetic derivative alter antioxidant enzyme activities of erythrocyte and liver in high cholesterol-fed rats. Bioorg. Med. Chem. 10(7):2239-2244.

199. Miller B, Potter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D, Madle S (1998) Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test. Mutat. Res. 410:81-116.

200. Milner JA (2006) Diet and cancer: facts and controversies. Nutr. Cancer 56(2):216–224.

201. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC (1997) Antimicrobial actin of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbiol. Res. 152(3):239-246.

202. Mok SK, Chen WF, Lai WP, Leung PC, Wang XL, Yao XS, Wong MS (2010) Icariin protects against bone loss induced by oestrogen deficiency and activates oestrogen receptor-dependent osteoblastic functions in UMR 106 cells. Br. J. Pharmacol. 159(4):939-49.

203. Moon YJ, Wang X, Morris ME (2006) Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. Toxicol. In Vitro 20(2):187–210.

204. Morton MS, Chan PSF, Cheng C, Blacklock N, Matos Ferreira A, Abranches Monteiro L, Correia R, Lloyd S, Griffiths K (1997) Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the UK. Prostate 32:122– 128.

205. Mosekilde L (1995) Assessing bone quality--animal models in preclinical osteoporosis research. Bone 17(4 Suppl):343-352.

206. Mulvihill EE, Allister EM, Sutherland BG, Telford DE, Sawyez CG, Edwards JY, Markle JM, Hegele RA, Huff MW (2009) Naringenin prevents dyslipidemia, apolipoprotein B overproduction, and hyperinsulinemia in LDL receptor-null mice with diet-induced insulin resistance. Diabetes. 58(10):2198-2210.

207. Murakami A, Ashida H, Terao J (2008) Multitargeted cancer prevention by quercetin. Cancer Lett. 269(2):315-25.

208. Muratović M (2016) Faktori rizika za osteoporozu. Medical, izdanje Br.17.

209. Murkies AL, Wilcox G, Davis SR (1998) Phytoestrogens. J. Clin. Endocrin. Metab. 83:297-303.

210. Muthusami S, Ramachandran I, Muthusami B, Vasudevan G, Prabhu V, Subramniam A, Narasimhan S (2005) Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. Clinica Chimica Acta 360:81-86.

211. Napoli JL (1999) Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. Prog Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 63:139-188.

212. Natarajan AT (2002) Chromosome aberrations: past, present and future. Mutat. Res. 504(1-2):3-16.

213. Nath CJ, Ong T (1990) Micronuclei assay in cytokinesis-blocked binucleated and conventional mononucleated methods in human peripheral lymphocytes. Teratog. Carcinog. Mutagen J. 10(3): 273-9.

214. Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH (2001) Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. N. Engl. J. Med. 344(19):1434-1441.

215. Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. Eur. J. Clin. Nutr. 42:29-42.

216. Nian H, Ma MH, Nian SS, Xu LL (2009) Antiosteoporotic activity of icariin in ovariectomized rats. Phytomedicine 16:320–326.

217. Nieves JW (2012) Skeletal effects of nutrients and nutraceuticals,beyond calcium and vitamin D. Osteoporos Int. 24:771–786.

218. Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PAM (2001) Flavonoids: a Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. Am. J. Clin. Nutr. (74):418-425.

219. Nollevaux MC, Guiot Y, Leclereq I (2006) Hypervitaminosis A-induced liver fibrosis: Stellate cell activation and daily dose consumption. Liver Int. 26:182-186.

220. Norppa H, Luomahaara S, Heikanen H, Roth S, Sorsa M, Renzi L, Lindholm C (1993) Micronucleus assay in lymphocytes as a tool to biomonitor human exposure to aneuploidogens and clastogens. Environ Health Perspect. 101 Suppl 3:139-43.

221. North American Menopause Society (2006) Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2006 position statement of The North American Menopause Society. Menopause 13(3):340-367.

222. Nusse M, Miller BM, Viaggi S, Grawe J (1996) Analysis of the DNA content distribution of micronuclei using flow sorting and fluorescent in situ hybridization with a centromeric DNA probe. Mutagenesis 11(4):405-413.

223. Oak MH, El Bedoui J, Schini-Kerth VB (2005) Antiangiogenic properties of natural polyphenols from redwine and green tea. J. Nutr. Biochem. 16:1-8.

224. Okamoto I, Iwaki K, Koya-Miyata S, Tanimoto T, Kohno K, Ikeda M, Kurimoto M (2002) The flavonoid kaempferol suppresses the graft-versushost reaction by inhibiting type 1 cytokine production and CD8+ T cell engraftment. Clin. Immunol. 103(2):132-144.

225. Olive P, Banáth JP, Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "comet assay". Radiat. Res. 122: 86-94.

226. Olive PL (1999) DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. Int. J. Radiat. Biol. 75(4):395-405.

227. Ong DE, Kakkad B, MacDonald PN (1987) Acyl-CoA-independent esterification of retinol bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. J. Biol. Chem. 262(6):2729-2736.

228. Oršolić N (2010) A review of propolis antitumor action in vivo and in vitro. JAAS 2, 1-20.

229. Oršolić N, Bašić I (2007) Cancer chemoprevention by propolis and its polyphenolic compounds in experimental animals. In: Singh VK, Govil JN, Arunachalam C (eds.) Recent Progress in Medicinal Plants. Studium Press LLC, USA. pp. 55-113.

230. Oršolić N, Bašić I (2008a) Polyphenols from propolis and plants in control of allergy and inflammation. In: Oršolić N and Bašić I (eds.) Scientific evidence of the use of propolis in ehtnomedicine. Ethnopharmacology - Review Book, Transworld Research Network 2008, India, pp. 311-336.

231. Oršolić N, Bašić I (2008b) Propolis and plant flavonoids in human allergies and inflammations.In: Oršolić N and Bašić I (eds.) Scientific evidence of the use of propolis in ehtnomedicine. Ethnopharmacology - Review Book, Research Signpost, India pp. 337-376.

232. Oršolić N, Goluža E, Dikić D, Lisičić D, Sašilo K, Rođak E, Jeleč Z, Lazarus MV, Orct T. (2014). Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contents in the retinoic acid-induced bone loss model of rat. Eur J Nutr.53(5):1217-27.

233. Oršolić N, Horvat Knežević A, Benković V, Bašić I (2008) Benefits of use of propolis and related flavonoids against the toxicity of chemotherapeutic agents. In: Oršolić N, Bašić I (eds.) Ethnopharmacology - Review Book. Research Signpost; India. pp.195-222.

234. Oršolić N, Kunštić M, Kukolj M, Gračan R, Nemrava J (2016) Oxidative stress, polarization of macrophages and tumour angiogenesis: Efficacy of caffeic acid. Chem. Biol. Interact. 256:111-24.

235. Oršolić N, Šver L, Terzić S, Tadić Z, Bašić I (2003) Inhibitory effect of water soluble derivative of propolis (WSDP) and its polyphenolic compounds on tumor growth and metastasizing ability: a possible mode of antitumor action. Nutr. Cancer 47(2):156- 163.

236. Palomo L, Bissada N, Liu J (2006) Bisphosphonate therapy for bone loss in patients with osteoporosis and periodontal disease: clinical perspectives and review of the literature. Quintessence Int. 37(2):103-7.

237. Parnham MJ, Verbanac D (2011) Mild plant & dietary immunomodulators. Principles of immunopharmacology. (Eds: Nijkamp, Frans P., Parnham, Michael J., Springer, pp 391-405

238. Pasco JA, Sanders KM, Hoekstra FM, Henry MJ, Nicholson GC, Kotowicz MA (2005) The human cost of fracture. Osteoporos Int. 16(12):2046-2052.

239. Pećina M, Smoljanović T, Cicvara-Pećina T, Tomek-Roksandić S (2007) Osteporotic fractures in the elderly. Arh. Hig. Rada Toksikol. 58:41-47.

240. Penniston KL, Tanumihardjo SA (2006) The acute and chronic toxic effects of vitamin A. Am. J. Clin. Nutr. 83(2):191-201.

241. Perazzella MA, Markowitz GS (2008) Bisphosphonate Nephrotoxicity. Kidney Int. 74,1385-93.

242. Pevalek- Kozlina B (2003) Fiziologija bilja, Profil multimedia, Zagreb.

243. Pichichero E, Cicconi R, Mattei M, Canini A (2011) Chrysin-induced apoptosis is mediated through p38 and Bax activation in B16-F1 and A375 melanoma cells. Int. J. Oncol. 38(2):473-483.

244. Pietschmann P (2012) Principles of Osteoimmunology. Springer, str. 7-9.

245. Pilšáková L, Riečanský I, Jagla F (2010) The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. Physiol. Res. 59(5):651-664.

246. Pitts CJ, Kearns AE (2011) Update on medications with adverseskeletal effects. Mayo Clin. Proc. 86:338–343.

247. Pizato N, Bonatto S, Yamazaki RK, Aikawa J, Nogata C, Mund RC (2005) Ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. Nutr. Cancer 53(2):194-201.

248. Plappert U, Raddatz K, Roth S, Fliedner TM (1995) DNA damage detection in man after radiation exposure the comet assay-its possible application for human monitoring. Stem. Cells 13(1):215-222.

249. Poljsak B, Šuput D, Milisav I (2013) Achieving the Balance Between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. Oxid. Med. Cell Longev. 956792.

250. Poole KES, Compston JE (2006) Osteoporosis and its menagment. BMJ 333(7581): 1251–1256.

251. Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW Jr (1998) Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 68(suppl):1375S–9S.

252. Prior RL (2003) Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. Am. J. Clin. Nutr. 78(Suppl):570-578.

253. Promislow JHE, Goodman-Gruen D, Slymen DJ, Barrett-Connor E (2002) Retinol intake and bone mineral density in the elderly: the Rancho Bernardo Study. J. Bone Miner. Res. 17(8):1349-1358.

254. Prouillet C, Mazière JC, Mazière C, Wattel A, Brazier M, Kamel S (2004) Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. Biochem. Pharmacol. 67(7):1307-1313.

255. Prynne CJ, Mishra GD, O'Connell MA, Muniz G, Laskey MA, Yan L, Prentice A, Ginty F (2006) Fruit and vegetable intakes and bone mineral status: a cross sectional study in 5 age and sex cohorts. Am. J. Clin. Nutr. 83(6):1420–8.

256. Rahmani P, Morin S (2009) Prevention of osteoporosis-related fractures among postmenopausal women and older men. CMAJ 181(11):815-820.

257. Raisz LG (2005) Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. J. Clin. Invest. 115(12):3318-3325.

258. Ramalho SA, Gualberto NC, Neta MTSL, Batista RA, Araújo SM (2014) Catechin and Epicatechin Contents in Wines Obtained from Brazilian Exotic Tropical Fruits. Food Nutr. Sci. 05:449–457.

259. Read MA (1995) Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents. Am. J. Pathol. 147(2):235–237.

260. Recker RR, Davies KM, Hinders SM, Heaney RP, Stegman MR, Kimmel DB (1992) Bone gain in young adult women. JAMA 268(17):2403-2408.

261. Reed TT (2011) Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. Free Rad. Biol. Med. 51(7):1302-1319.

262. Reginster JY1, Seeman E, De Vernejoul MC, Adami S, Compston J, Phenekos C, Devogelaer JP, Curiel MD, Sawicki A, Goemaere S, Sorensen OH, Felsenberg D, Meunier PJ (2005) TROPOS, JCEM 90:2816-2822.

263. Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL (2000) Cocoa inhibits platelet activation and function. Am. J. Clin. Nutr. 72(1):30–35.

264. Ren W, Qiao Z, et al (2003) Flavonoids: Promising Anticancer Agents. Med. Res. Rev. 23: 519-534.

265. Reuben C (1998) Antioksidansi. Cjeloviti vodič. Bibilioteka Sana, Zagreb.

266. Rezaković S (2008) Osteoporoza-bolest krhkih kostiju

267. Ricketts M-L, Moore DD, Banz WJ, Mezei O, Shay NF (2005) Molecular mechanisms of action of the soy isoflavones includes activation of promiscuous nuclear receptors. Am. J. Nutr. Biochem. 16:321–330 (review).

268. Riggs BL, Melton LJ (1995) The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. Bone 17(suppl):505S-11.

269. Rodan GA, Reszka AA (2002) Bisphosphonate Mechanism of Action. Curr. Mol. Med. 2(6):571-7.

270. Rodrigo R (2009) Oxidative stress and antioxidants: Their role in human disease. Nova Biomedical Books, New York.

271. Rohde CM, DeLuca H (2003) Bone resorption activity of all-trans retinoic acid is independent of vitamin D in rats. J. Nutr. 133(3):777-783.

272. Rose DP,Connolly JM (2000) Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids. Nutr. Cancer 37:119-27.

273. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA 288(3):321–333.

274. Rozenberg S, Vandromme J, Kroll M, Pastijn A, Degueldre M (1994) Osteoporosis prevention with sex hormone replacement therapy. Int. J. Fertil. Menopausal Stud. 39 (5):262–271.

275. Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, Barcellona ML, Vanella A (2000) Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. Cell Biol. Toxicol. 16(2):91-98.

276. Sambrook P, Cooper C (2006) Osteoporosis. Lancet. 367:2010-8.

277. Sandhar HK, Kumar B, Prasher S, Tiwari P, Salhan M, Sharma P (2011) A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. IPS 1-1:25-41.

278. Saneshige S, Mano H, Tezuka K, Kakudo S, Mori Y, Honda Y, Itabashi A, Yamada T, Miyata K, Hakeda Y (1995) Retinoic acid directly stimulates osteoclastic bone resorption and gene expression of cathepsin K/OC-2. Biochem. J. 309(3):721-724.

279. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45(4):287-306 (Review).

280. Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C (2002) Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. Biomed. Pharmacother. 56(6):276-82.

281. Schaier M, Lehrke I, Schade K, Morath C, Shimizu F, Kawachi H, Grone HJ, Ritz E, Wagner J (2001) Isotretinoin alleviates renal damage in rat chronic glomerulonephritis. Kidney Int. 60(6):2222-2234.

282. Schwartz A, Sutton SL, Middleton E jr (1982) Quercetin inhibition of the induction and function of cytotoxic T-lymphocytes. Immunopharmacology 4(2):125-38.

283. Seeman E (2003) Periosteal bone formation - a neglected determinant of bone strength, N. Engl. J. Med. 349:320–323.

284. Sellmeyer DE, Stone KL, Sebastian A, Cummings SR (2001) A high ratio of dietary animal to vegetable protein increases the rate of bone loss and the risk of fracture in postmenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 73(1):118-122.

285. Setchel K, Lydeking-Olsen E (2003) Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vtro and in vivo human observational and dietary intervention studies, Am. J. Clin. Nutr. 78:593-609.

286. Shen CL, Wang P, Guerrieri J, Yeh JK, Wang JS (2008) Protective effect of green tea polyphenols on bone loss in middle-aged female rats. Osteoporos Int. 19(7):979-990.

287. Sheweita SA, Khoshhal KI (2007) Calcium metabolism andoxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. Curr. Drug. Metab. 8:519–52.

288. Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Schneider EL (1998) A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. Exp. Cell Res. 175: 184-191.

289. Smietana MJ, Arruda EM, Faulkner JA, Brooks SV, Larkin LM (2010) Reactive Oxygen Species on Bone Material Density and Mechanics in Cu, Zn Superoxide Dismutase (Sod1) Knockout Mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 403:149-153.

290. Sobočanec S (2006) Učinak propolisa na oksidacijski/antioksidacijski status u CBA miša. Doktorska disertacija. Zagreb. Prirodoslovno-matematički fakultet.

291. Sohair R, Amel M Soliman (2009) Oxidative Stress as a risk Factor of Osteoporotic Model Induced by vitamin A in Rats. AJBAS 3(3):1559-1568.

292. Sparn M, Roberts A, Roberts A, Goodman D (1994) The retinoids. Biology, chemistry and medicine. 2nd ed Raven Press, New York.

293. Spencer JP (2003) Metabolism of Tea Flavonoids in the Gastrointestinal Tract. J. Nutr. 133,3255-3261.

294. Stavric B (1994) Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. Clin. Biochem. 27(4):245-248 (Review).

295. Sternberg Z, Chadha K, Lieberman A, Hojnacki D, Drake A, Zamboni P, Rocco P, Grazioli E, Weinstock-Guttman B, Munschauer F (2008) Quercetin and interferon-beta modulate immune response(s) in peripheral blood mononuclear cells isolated from multiple sclerosis patients. J. Neuroimmunol. 15;205(1-2):142-7.

296. Stevanović J, Borozan S, Jović S, Ignjatović I (2011) Fiziologija slobodnih radikala. Vet. glasnik 65(1-2):95-107.

297. Stewart A, Reid DM (2000) Quantitative ultrasound or clinical risk factors--which best identifies women at risk of osteoporosis?. Br. J. Radiol. 73(866):165-171.

298. Stone KL, Seeley DG, Lui LY, Cauley JA, Ensrud K, Browner WS, Nevitt MC, Cummings SR (2003) BMD at multiple sites and risk of fracture of multiple types: long-term results from the Study of Osteoporotic Fractures, J. Bone Miner. Res. 18:1947–1954.

299. Strahan JE, Raimer S (2006) Isotretinoin and the controversy of psychiatric adverse effects. Int. J. Dermatol. 45:789-99.

300. Sturdee DW (1997) Clinical symptoms of estrogen deficiency. Curr. Obstet. Gynaecol. 7:190–196.

301. Surralles J, Puerto S, Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Mullenders LH, Natarajan AT (1998) Links between chromatin structure, DNA repair and chromosome fragility. Mutat. Res. 404(1-2):39-44.

302. Svedbom A, Hernlund E, Ivergard M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA (2013) Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. Arch. Osteoporos. 8(1–2):137.

303. Sze SC, Tong Y, Ng TB, Cheng CL, Cheung HP (2010) Herba Epimedii: anti-oxidative properties and its medical implications. Molecules 15(11):7861-7870.

304. Šaban S (2005) Kvercetin zdravlje čuva. Vaše zdravlje 41 (4).

305. Šimić P, Giljević Z, Šimunić V, Vukičević S, Koršić M (2007) Liječenje osteoporoze, Arh. Hig. Rada Toksikol. 58:55-71.

306. Štefan L, Tepšić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R (2007): Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. Medicina 43:84-93.

307. Švarc H (2007) Prevencija u mladosti, zdrave kosti u starosti. Vaše zdravlje 54:76-79.

308. Tanabe S, Santos J, La VD, Howell AB, Grenier D (2011) A-Type Cranberry Proanthocyanidins Inhibit the RANKL-Dependent Differentiation and Function of Human Osteoclasts. Molecules 16(3):2365-2374.

309. Tapas AR, Sakarar DM, Kakde RB (2008) Flavonoids as Nutraceuticals. Trop. J. Pharm. Res. 7(3):1089-1099 (Review).

310. Teelmann K (1989) Retinoids: toxicology and teratogenicity to date. Pharmacol. Ther. 40(1):29-43 (Review).

311. Terra X, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardèvol A, Bladé C, Fernández-Larrea J, Pujadas G, Salvadó J, Arola L, Blay M (2009) Grape-seed procyanidins

prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. J. Nutr. Biochem. 20(3):210–218.

312. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mutagen. 35(3):206-21.

313. Tice RR, Andrews PW, Singh NP (1990) The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. Basic Life Sci. 53:291-301.

314. Totta P, Acconcia F, Leone S, Cardillo I, Marino M (2004) Mechanisms of naringenin-induced apoptotic cascade in cancer cells: involvement of estrogen receptor and signalling. IUBMB Life 56(8):491–499.

315. Tsuji M, Yamamoto H, Sato T, Mizuha Y, Kawai Y, Taketani Y, Kato S, Terao J, Inakuma T, Takeda E (2009) Dietary quercetin inhibits bone loss without effect on the uterus in ovariectomized mice. J. Bone Miner. Metab. 27(6):673-681.

316. Tsukada M, Schroder M, Roos TC (2000) 13-cis retinoic acid exerts its specific activity on 114 human sebocytes through selective isomerisation to all-trans retinoic acid and binding to retinoic acid receptors. J. Invest. Dermatol. 115:321-7.

317. Tucker KL, Hannan MT, Chen H, Cupples LA, Wilson PW, Kiel DP (1999) Potassium, magnesium, and fruit and vegetable intakes are associated with greater bone mineral density in elderly men and women. Am. J. Clin. Nutr. 69(4):727–36.

318. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones SM, Ghebranious N, Igelmann H (2002) p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. Nature 415:45-53.

319. US Department of Health and Human Services. Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General. 2004. Rockville, MD, US Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General.

320. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Funtions and Human Disease. Intl. J. Biochem. Cell Biol. 39:44-84.

321. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. Chem. Biol. Interact. 160:1-40.

322. Vasiljeva A (2003) Bolesti kostiju, Orakul, Zagreb.

323. Villar IC, Galisteo M, Gera R, O'valle F, Garcia-Saura MF, Zarzuelo A, Duarte J (2004) Effects of the dietary flavonoid chrysin in isolated rat mesenteric vascular bed. J. Vasc. Res. 41(6):509-516.

324. Virgili F, Acconcia F, Ambra R, Rinna A, Totta P, MarinoM (2004) Nutritional flavonoids modulate estrogen receptor signaling. IUBMB Life 56:145–151.

325. Vitseva O, Varghese S, Chakrabarti S, Folts JD, Freedman JE (2005) Grape seed and skin extracts inhibit platelet function and release of reactive oxygen intermediates. J. Cardiovasc. Pharmacol. 46(4):445-451.

326. Wada S, Kurahayashi H, Kobayashi Y, Funayama T, Yamamoto K, Natsuhori M, Ito N (2003) The relationship between cellular radiosensitivity and radiation-induced DNA damage measured by the comet assay. J. Vet. Med. Sci. 65(4):471-7.

327. Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK (2005) Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. J. Nutr. 135:48-52.

328. Walle T, Otake Y, Brubaker JA, Walle UK, Halushka PV (2001) Disposition an metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. Br. J. Clin. Pharmacol. 51 (2):143-146.

329. Wattel A, Kamel S, Prouillet C, Petit JP, Lorget F, Offord E, Brazier M (2004) Flavonoid quercetin decreases osteoclastic differentiation induced by RANKL via a mechanism involving NF kappa B and AP-1. J. Cell Biochem. 92(2):285-295.

330. Wei M, Yang Z, Zhang Y, Sse WC (2007) Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model. Am. J. Chin. Med. 35(4):663-667.

331. Wong RWK, Rabie ABM (2008) Effect of Quercetin on Proosteoblasts and Bone Defects. Open Orthop. J. 2:27-32.

332. World Health Organization (2003) Prevention and management of osteoporosis. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 921:1–164.

333. Woude H van der (2006) Mechanisms of toxic action of the flavonoid quercetin and it’s phase II metabolites. PhD Thesis. Wageningen University.

334. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND (2004) Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. ASN 0022-3166/04: 489-492.

335. Wu X, Gu L, Prior RL, McKay S (2004) Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. J. Agric. Food Chem. 52:7846–56.

336. Xie DY, Sharma SB, Paiva NL, Ferreira D, Dixon RA (2003) Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. Science 299:396–399.

337. Xu P, Guo X, Zhang YG, Li YF, Cao JL, Xiong YM. (2005) The effect of retinoic acid on induction of osteoporotic model rats and the possible mechanism]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue BanMar; 36(2):229-32.

338. Yahara N, Tofani I, Maki K, Kojima K, Kojima Y, Kimura M (2005) Mechanical assessment of effects of grape seed proanthocyanidins extract on tibial bone diaphysis in rats. J. Musculoskelet. Neuronal Interact. 5(2):162-169.

339. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annu Rev. Nutr. 21:381-406.

340. Yang NN, Venugopalan M, Hardikar S, Glasebrook A (1996) Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17beta-estradiol and raloxifene. Science 273(5279):1222–1225.

341. Yellayi S, Naaz A, Szewczykowski MA, Sato T, Woods JA, Chang J, Segre M, Allred CD, Helferich WG, Cooke PS (2002) The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern? PNAS 99:7616–7621.

342. Yin X, Chen Z, Liu Z, Ma Q, Dang G (2007) Icariine stimulates proliferation and differentiation of human osteoblasts by increasing production of bone morphogenetic protein 2. Chin. Med. J. 120:204–210.

343. Yoon JH, Baek SJ (2005) Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. Yonsei Med. J. 46(5):585-596.

344. Zalloua PA, Hsu YH, Terwedow H, Zang T, Wu D, Tang G, Li Z, Hong X, Azar ST, Wang B, Bouxsein ML, Brain J, Cummings SR, Rosen CJ, Xu X (2006) Impact of seafood and fruit consumption on bone mineral density. Maturitas 20;56(1):1-11.

345. Zanoli P, Avallone R, Baraldi M (2000) Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. Fitoterapia 71(1):117-123.

346. Zhang G, Qin L, Shi Y (2007) Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial. J. Bone Miner. Res. 22:1072–1079.

347. Zhang JK, Yang L, Meng GL, Yuan Z, Fan J, Li D, Chen JZ, Shi TY, Hu HM, Wei BY, Luo ZJ, Liu J (2013) Protection by salidroside against bone loss via inhibition

of oxidative stress and bone-resorbing mediators. PLoS One 8:e57251. doi:10.1371/journal.pone.0057251.

348. Zhang L, Lin G, Zuo Z (2007) Involvement of UDP-glucuronosyltransferases in the extensive liver and intestinal first-pass metabolism of flavonoid baicalein. Pharm Res. 24:81-89.

349. Zhang XY, Li WG, Wu YJ, Zheng TZ, Li W, Qu SY, Liu NF (2005) Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. Int. Immunopharmacol. 5(7-8):1247-57.

350. Zhang Y, Li Q, Li X, Wan HY, Wong MS (2010) Erythrina variegata extract exerts osteoprotective effects by suppression of the process of bone resorption. Br. J. Nutr. 104(7):965-971.

351. Zhao M, Yang B, Wang J, Liu Y, Yu L, Jiang Y (2007) Immunomodulatory and anticancer activities of flavonoids extracted from litchi (Litchi chinensis Sonn) pericarp. Int. Immunopharmacol. 7(2):162-6.

352. Zoričić-Cvek S (2008) Biopsija i histomorfometrija kosti u dijagnostici osteoporoze i metaboličkih bolesti kosti. Medicina Fluminensis 44:235-240.

353. Zupan J, Jeras M, Marc J (2013) Osteoimmunology ant the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts, University of Ljubljana, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Biochemistry, Ljubljana, Slovenia, Biochem. Med. 23(1):43-63.

354. Nowak B, Matuszewska A, Filipiak J, Nikodem A, Merwid-Ląd A, Pieśniewska M, Kwiatkowska J, Grotthus B, Szeląg A (2016) The Negative Impact of Selective Activation of Retinoic Acid Receptors on Bone Metabolism and Bone Mechanical Properties in Rats. Adv Clin. Exp. Med. 25(2):213-8.

355. Zhao S, Niu F, Xu CY, Liu Y, Ye L, Bi GB, Chen L, Tian G, Nie TH (2016) Diosgenin prevents bone loss on retinoic acid-induced osteoporosis in rats. Ir. J. Med. Sci. 185(3):581-7.

356. Liu RH, Kang X, Xu LP, Nian HL, Yang XW, Shi HT, Wang XJ (2015a) Effects of the combined extracts of Herba Epimedii and Fructus Ligustri Lucidi on bone mineral content and bone turnover in osteoporotic rats. BMC Complement Altern. Med. 15:112. doi: 10.1186/s12906-015-0641-4.

357. Henning P, Conaway HH, Lerner UH (2015) Retinoid receptors in bone and their role in bone remodeling. Front. Endocrinol. (Lausanne). 6:31. doi: 10.3389/fendo.2015.00031. Review.

358. Liu R, Kang X, Xu L, Nian H, Yang X, Shi H, Wang X (2015b) Effect of the combined extracts of herba epimedii and fructus ligustri lucidi on sex hormone functional levels in osteoporosis rats. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 184802. doi:10.1155/2015/184802.

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

360. De Jonge EA, Kiefte-de Jong JC, Campos-Obando N, Booij L, Franco OH, Hofman A, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Zillikens MC (2015) Dietary vitamin A intake and bone health in the elderly: the Rotterdam Study. Eur. J. Clin. Nutr. 69(12):1360-8.

361. Chen GD, Zhu YY, Cao Y, Liu J, Shi WQ, Liu ZM, Chen YM (2015) Association of dietary consumption and serum levels of vitamin A and β-carotene with bone mineral density in Chinese adults. Bone.79:110-5.

362. Joo NS, Yang SW, Song BC, Yeum KJ (2015) Vitamin A intake, serum vitamin D and bone mineral density: analysis of the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES, 2008-2011). Nutrients. 7(3):1716-27.

363. Miyamoto T (2015) Mechanism Underlying Post-menopausal Osteoporosis: HIF1α is Required for Osteoclast Activation by Estrogen Deficiency. Keio. J. Med. 64(3):44-7.

364. Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, Föger-Samwald U, Ellinger I (2016) Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. Gerontology. 62(2):128-37.

365. Zeng QM, Liu DC, Zhang XC, Wu JP, Ding L, Meng DH, Zhang J (2015) Estrogen deficiency inducing shifted cytokines profile in bone marrow stromal cells inhibits Treg cells function in OVX mice. Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand) 61(2):64-8.

366. Fan XL, Duan XB, Chen ZH, Li M, Xu JS, Ding GM (2015) Lack of estrogen down-regulates CXCR4 expression on Treg cells and reduces Treg cell population in bone marrow in OVX mice.Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand) 61(2):13-7.

367. Lai N, Zhang Z, Wang B, Miao X, Guo Y, Yao C, Wang Z, Wang L, Ma R, Li X, Jiang G (2015) Regulatory effect of traditional Chinese medicinal formula Zuo-Gui-Wan on the Th17/Treg paradigm in mice with bone loss induced by estrogen deficiency.J. Ethnopharmacol. 166:228-39.

368. Bouxsein ML, Karasik D (2016) Bone geometry and skeletal fragility. Curr. Osteoporos. Rep. 4(2):49-56. Review.

369. Gatti D, Adami S, Viapiana O, Rossini M (2015) The use of bisphosphonates in women: when to use and when to stop. Expert Opin. Pharmacother. 16(16):2409-21. Review.

370. Gökkus K, Yazicioglu G, Sagtas E, Uyan A, Aydin AT (2016) Possible alendronate-induced polyarticular synovitis. J. Postgrad. Med. 62(2):126-8.

371. Fadda V, Maratea D, Trippoli S, Messori A (2015) Gastrointestinal and renal side effects of bisphosphonates: differentiating between no proof of difference and proof of no difference. J. Endocrinol. Invest. 38(2):189-92.

372. Iglesias JE, Salum FG, Figueiredo MA, Cherubini K (2015) Important aspects concerning alendronate-related osteonecrosis of the jaws: a literature review. Gerodontology. 32(3):169-78.

373. Rennert G, Pinchev M, Gronich N, Saliba W, Flugelman A, Lavi I, Goldberg H, Fried G, Steiner M, Bitterman A, Landsman K, Rennert H (2016) Oral bisphosphonates and improved survival of breast cancer.Clin. Cancer Res. pii: clincanres.0547.2016.

374. Qaseem A, Snow V, Shekelle P, Hopkins R Jr, Forciea MA, Owens DK (2008) Clinical Efficacy Assessment Subcommittee of the American College of Physicians. Pharmacologic treatment of low bone density or osteoporosis to prevent fractures: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. Ann. Intern. Med. 149(6):404-15.

8. ŽIVOTOPIS

Dr. med. Johann Nemrava rođen je 27. studenog 1981. godine u Zagrebu, gdje je završio osnovnu školu i srednju medicinsku školu. 2000. godine upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci na kojem je diplomirao 2006. godine i stekao zvanje doktora medicine. Odmah nakon toga zapošljava se u Općoj bolnici Zabok, gdje 2008. godine polaže stručni ispit i započinje specijalizaciju iz opće kirurgije.

Od 2008. do 2013 godine provodi specijalistički staž u Općoj bolnici Zabok, zagrebačkim bolnicama (Kliničkoj bolnici Merkur, Kliničkom bolničkom centru Zagreb - Jordanovac, Klinici za dječje bolesti Zagreb - Klaićeva, Kliničkom bolničkom centru Sestre milosrdnice, Kliničkoj bolnici Dubrava) i Klinici za kardiovaskularne bolesti Magdalena.

Specijalistički ispit iz opće kirurgije položio je 2013. godine i stekao zvanje specijaliste opće kirurgije sa licencom za samostalni rad u RH, a 2014. godine postao je član GMC-a (General Medical Council) sa licencom za samostalni rad kao specijalist opće kirurgije u Velikoj Britaniji.

Poslijediplomski studij na Prirodoslovno matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, biološkog odsjeka upisao je u studenom 2011. godine.

Od studentskih dana stručni interes dr. Johanna Nemrave usmjeren je kirurgiji, a osobito traumatološko ortopedskom dijelu i plastično rekonstruktivnoj kirurgiji, temeljem kojeg je nastalo i znanstveno usmjeravanje prema istraživanjima različitih modusa te vrste kirurškog liječenja. Dr. med. J. Nemrava je završio brojne europske tečajeve stručnog usavršavanja u domeni kirurgije i hitne medicine, a 2011. godine postao je član AO Trauma Europe.

Tečajeve, seminare, kongrese, predstavljanje radova i postera u razdoblju od 2003. isprva je radio kao aktivni sudionik, potom predavač, da bi 2015. na AO Trauma tečaju - Advanced Principles of Fractur Management –u Zagrebu postao i instruktor .

Osim temeljne djelatnosti kojom se dr. med. Nemrava bavi, on je veliki poklonik športa, pa je u svom životu bio i višestruki prvak Hrvatske u veslanju, član je Hrvatske veslačke reprezentacije, bio je sudionik Europskog veslačkog prvenstva (Luzern, Švicarska – 1994./1995) i sudionik Svjetskih veslačkih prvenstava (Indianapolis, SAD – 1994., Tampere, Finska – 1995.). Danas je licencirani nogometni i motociklistički liječnik, aktivist Crvenoga križa i nastavnik u srednjoj medicinskoj školi.