

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MAJA VIDOVIĆ

**HEMATOLOŠKE I BIOKEMIJSKE PROMJENE U
CBA MIŠEVA NAKON PRIMJENE LIJEKA
LECTRANALA**

Diplomski rad

Zagreb, 2009.

Ovaj diplomski rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu endokrinologiju i transplantaciju, Zavod molekularne medicine, Institut „Ruđer Bošković“, pod vodstvom dr.sc. Mirka Hadžije znanstvenog savjetnika Instituta Ruđer Bošković i suvoditeljstvom prof.dr.sc. Gordane Lacković - Venturin, te predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja naziva profesor biologije.

Ovim putem najljepše se zahvaljujem voditelju dr.sc. Mirku Hadžiji na predloženoj temi, savjetima i pomoći, na iznimnoj susretljivosti i nesebičnom trudu koji mi je bio na raspolaganju tijekom izrade ovoga rada.

Zahvaljujem se suvoditeljici prof.dr.sc. Gordani Lacković - Venturin na susretljivosti u oblikovanju i pisanju ovog rada.

Također zahvaljujem kolegici Martini na pomoći u laboratoriju, te suradnicima Laboratorija za molekularnu endokrinologiju i transplantaciju na ljubaznosti tijekom izrade mog laboratorijskog rada.

Veliko hvala mojim prijateljicama Ivi i Sanji na podršci i međusobnoj pomoći tokom cijelog studija.

Posebno hvala i mojim roditeljima Ani i Vladimiru, sestrama Martini i Valeriji, dečku Žilijenu i cijeloj obitelji koji su tijekom cijelog mog školovanja bili uz mene i pružali mi podršku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

HEMATOLOŠKE I BIOKEMIJSKE PROMJENE U CBA MIŠEVA NAKON PRIMJENE LIJEKA LECTRANALA

Maja Vidović

Laboratorij za molekularnu endokrinologiju i transplantaciju
Bijenička cesta 54, Zagreb

Dosadašnja istraživanja na *Astragalus membranaceus* pokazala su da se ekstrakt astragalusa do sada nije primjenjivao kao regulator imunološke reakcije, već je primjenjivan kao antioksidans i imunostimulator. U istraživanju su korišteni CBA miševi oba spola koji su primili 3 različite doze lijeka, koje su im unošene u organizam *per os*. Cilj istraživanja bio je utvrditi da li je lijek Lectranal®, kao pripravak, toksičan kod oralne upotrebe. Tijekom akutnog ispitivanja u trajanju od 30 dana praćeni su slijedeći parametri: fenotipske promjene, promjene u ponašanju i preživljavanju, promjene u tjelesnoj težini, količina pojedene hrane i popijene vode, promjene u hematološkim i serumskim kliničko – kemijskim parametrima, promjene kliničkih kemijskih parametara u urinu, patohistološka analiza organa na žrtvovanim kontrolnim i ispitivanim životinjama. Nisu uočene razlike između tretiranih i kontrolnih životinja koje bi upućivale na ikakav toksični učinak Lectranal®-a.

(56 stranica, 23 slike, 15 tablica, 29 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Astragalus membranaceus*, hematološki, biokemijski, CBA miševi

Voditelj: Dr. sc. Mirko Hadžija, znanstveni savjetnik Instituta "Ruđer Bošković"
Suvoditelj: Prof. dr. sc. Gordana Lacković - Venturin
Ocjenjivači: Dr. sc. Mirko Hadžija, znanstveni savjetnik Instituta "Ruđer Bošković"
Prof. dr. sc. Gordana Lacković - Venturin
Prof. dr. sc. Zdravko Dolenc
Doc. dr. sc. Vesna Benković

Rad prihvaćen: 11. 3. 2009.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Maja Vidović

Laboratory of Molecular Endocrinology and Transplantation

Until now investigation on *A. membranaceus* was shown that the extract of *A. membranaceus* applied for stimulation of immune system and antioxidants too. CBA mice were used as experimental animals and treated with three different doses of drug. The drug used *per os*. The goal of our investigation is toxicity checking of Lectranal®. Duration of acute toxicity testing was 30 days. Gain of body weight, quantity of eaten food, volume of drank water hematological parameters, clinical-chemical parameters, urine analysis fenotyping changes, behavioral changes, were analyzed after 30 days. There are no differences between treated and control animals what would suggest no any toxicity effect of tested substance Lectranal®.

(56 pages, 23 figures, 15 tables, 29 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library.

Keywords: *Astragalus membranaceus*, hematological, biochemical, CBA mice

Supervisors: Mirko Hadžija, Ph.D. Senior scientist of Institute "Ruđer Bošković",

Commentor: Prof. Gordana Lacković – Venturin, Ph. D.

Reviewers: Mirko Hadžija, Ph.D. Senior scientist of Institute "Ruđer Bošković",

Prof. Gordana Lacković – Venturin, Ph. D.

Prof. Zdravko Dolenc, Ph. D.

Asst. prof. Vesna Benković, Ph. D.

Thesis accepted: 11 March 2009

1. UVOD

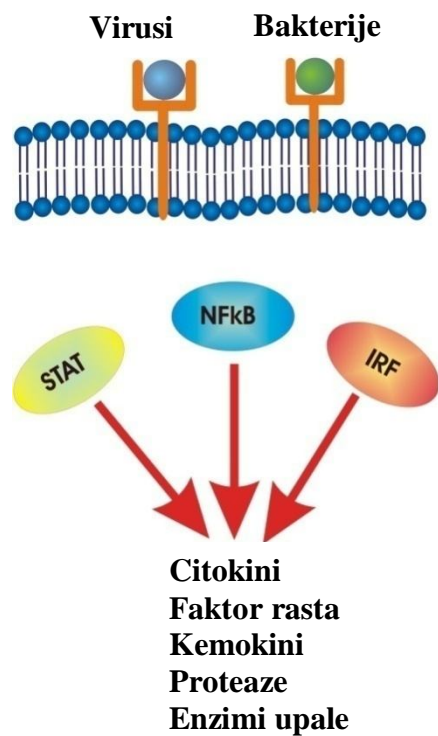
1.1. IMUNOLOŠKI ODGOVOR

Imunologija proučava sve oblike obrane domaćina od zaraze i štetnih posljedica, a definicija je proistekla iz vjekovnog opažanja da su osobe nakon što su preboljele određene zarazne bolesti, u pravilu, otporne na te bolesti, odnosno zarazu.

Pojam imunologija nastala je od latinske riječi (lat. *immunost* – otpornost) i grčke riječi (grč. *logos* – riječ), a grana je biomedicinske znanosti koja proučava cjelokupnu otpornost organizma na djelovanje stranih tvari tj. – antigena. Suvremena imunologija obuhvaća veliki broj disciplina koje istražuju ustrojstvo i fiziološke funkcije imunološkog sustava, imunost na zarazu, stanje imunološke preosjetljivosti (alergije), imunološke nedostatnosti (imunodeficijencije), imunološke reakcije na presađivanje i tumore, autoimune bolesti, kao i brojne imunodijagnostičke postupke.

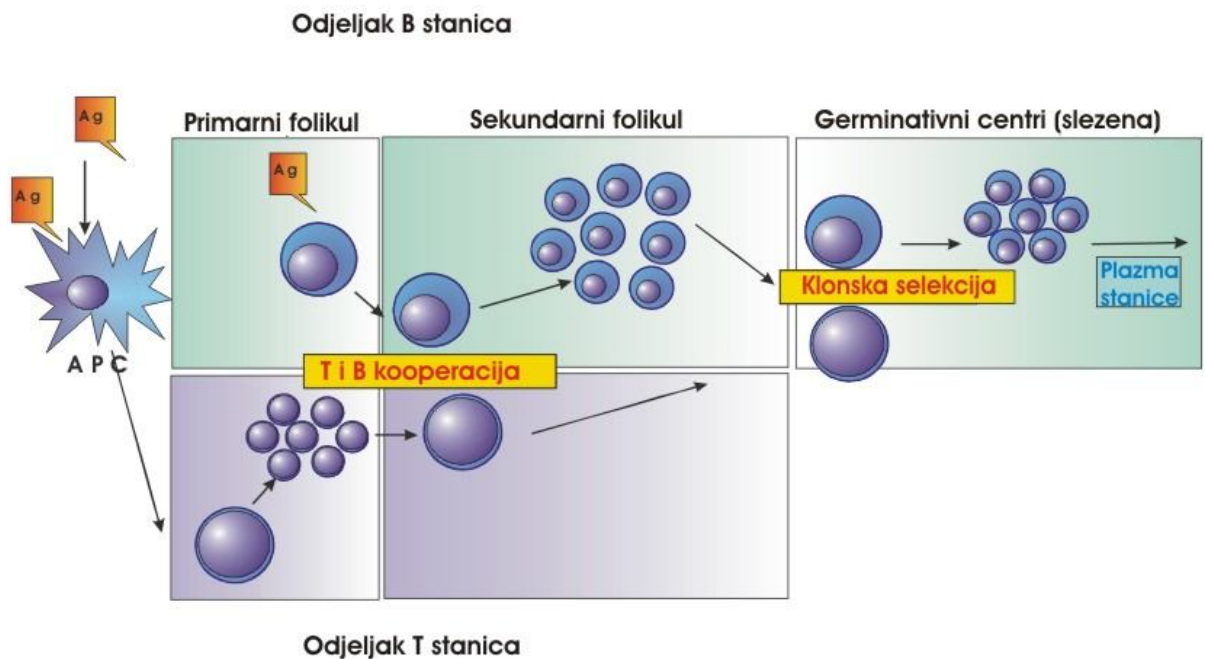
Glavni organi imunološkog sustava u ljudskom organizmu su: timus (prsna žlijezda), koštana srž, slezena te limfni čvorovi.

Imunološki sustav normalno štiti organizam od štetnih tvari kao što su bakterije, virusi ili strani antigeni. Ako tu reakciju promatramo iz kuta molekularne genetike, onda kažemo, da prisutnost antigena u organizmu aktivira nuklearni faktor kapa B (NFκB) i ostale transkripcijske faktore. Transkripcijski faktori u nenarušenoj urođenoj imunološkoj reakciji aktiviraju i reguliraju pojavnost velikog broja gena i produkata koje se dijele na: citokine, faktore rasta, kemokine, proteaze, enzime, angiogene faktore i itd. kao što prikazuje Slika 1. (Li i Verma, 2002).



Slika 1. Faktori iz okoliša (bakterije i virusi) aktiviraju NFκB i ostale transkripcijske faktore koji sudjeluju u aktivaciji i regulaciji mnoštva gena u imunološkoj reakciji.

Funkcija transkripcijskog faktora NFκB nije direktna i umiješana u nespecifičnu imunološku reakciju ili inflamatorni imunološki odgovor nego je uključen onda kada postoji potreba za aktivacijom imunoloških organa npr. aktivacijom germinativnih centara u slezeni te sazrijevanje i preživljavanja B limfocita kao što prikazuje Slika 2. (Bonizzi i Karin, 2004).



Slika 2. Shematski prikaz kako pomoćnički T limfociti (Th stanice) reguliraju proliferaciju B limfocita sve do plazma stanica. Primarni folikuli – razvoj primarnih antigen specifičnih Th stanica. Sekundarni folikuli – razvoj efektorskih B stanica. Germinativni centri - razvoj antigen specifičnih B stanica – plazma stanice

1.1.1. Razvoj B limfocita

Razvoj B limfocita, pa sve do plazma stanica u normalnoj odrasloj jedinki, u normalnom imunološkom odgovoru odvija se u tri faze kao što prikazuje Slika 2.

Prva faza - nastupa nakon što antigen predočne stanice (APC) upoznaju antigen i prenesu informaciju Th stanicama (primarni folikul – limfni čvorovi).

Druga faza - u limfnim čvorovima dolazi do kooperacije između T limfocita i B limfocita. Ova kooperacija potiče B limfocite na diobu i stvaraju se funkcionalni limfociti.

U trećoj fazi - funkcionalni B limfociti zajedno s T limfocitima u germinativnim centrima (npr. slezeni) kontrolirano i nakon klonске selekcije sazrijevaju u zrele B limfocite, odnosno plazma stanice, čija je aktivnost usmjerena prema specifičnom antigenu (McHeyzer-Williams i sur., 1993, Shih i sur., 2002).

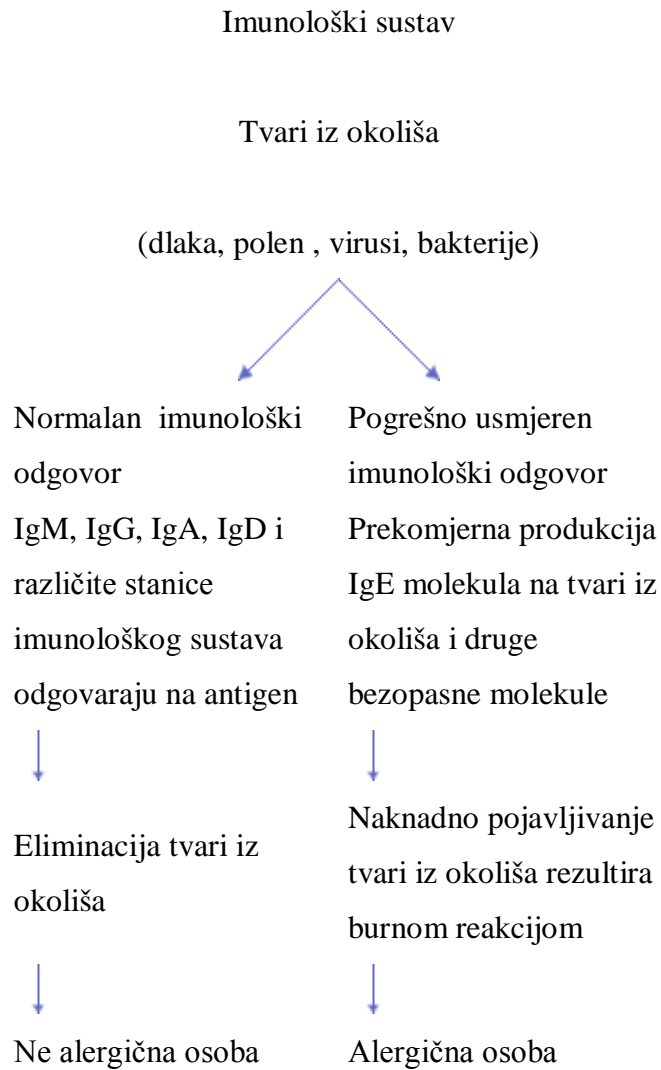
1.1.2. Uloga stanica Th1 i Th2 u imunološkom odgovoru

Općenito, Th stanice funkcionalno dijelimo na Th1 i Th2 stanice. Th1 stanice luče interleukin-2 (IL-2) i interferon gama ($IFN\gamma$), koji pospješuju stanični imunološki odgovor i inhibiraju prvo Th2 staničnu aktivnost i drugo humoralnu imunološku reakciju. Th1 stanice su inflamatorne, luče IL-2, $IFN\gamma$, transformirajući faktor rasta beta ($TGF\beta$), pružaju pomoć B limfocitima u sintezi i sekreciji imunoglobulina (IgG2a, IgG3...itd) te aktiviraju makrofage, citotoksične T limfocite (Tc stanice) i stimuliraju procese kasne preosjetljivosti (Mosmann i Coffman, 1989, Szabo i sur., 2000, Szabo, i sur., 2002, Finotto, i sur., 2002). Th2 stanice također su upletene u imunološku reakciju posredovanu stanicama. Th2 stanična aktivnost, odnosno sekrecija, inhibira stanicama posredovanu imunološku reakciju i pojačavaju humoralnu imunološku reakciju. Th2 stanice produciraju IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13. Nadalje pomažu B limfocitima prijelaz na sintezu IgE, IgG1, a također pomažu eozinofile i mastocite (Coffman i sur., 1988, Kopf i sur. 1993, Kaplan i sur., 1996, Shimoda i sur., 1996, Ho i sur., 1996, Ting i sur., 1996, Zheng i Flavell, 1997).

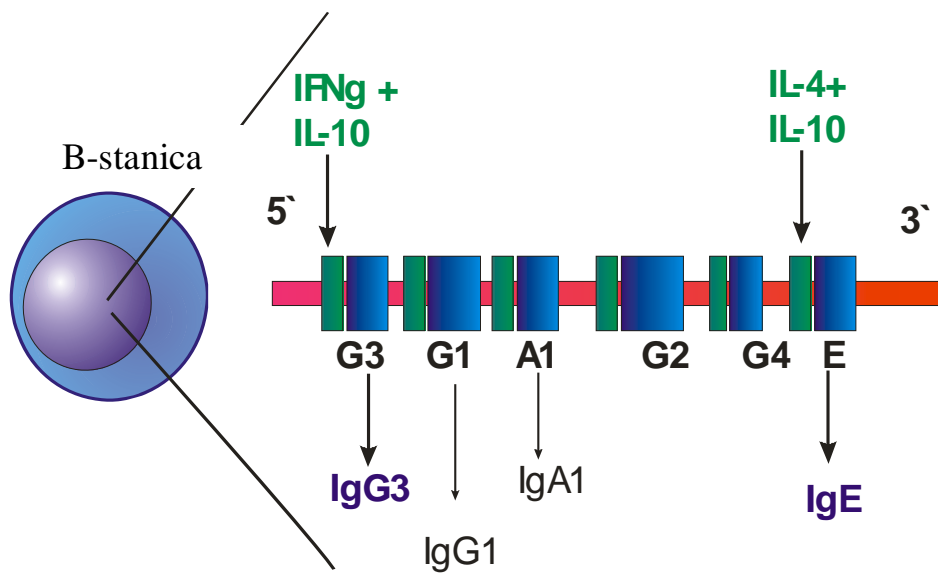
1.1.3. Regulacija imunološkog odgovora

Poznato je da imunološki sustav reagira na tvari iz okoliša, te da se ta reakcija izvodi po principima prirodne imunološke reakcije. U jednom trenutku, za sada još uvijek iz nepoznatog razloga, APC prepoznaju antigen, probave ga i pokažu ga u klasi II. No, očito je da se dogodi pogrešno usmjerenje imunološkog odgovora. Cijeli proces kreće na desnu stranu i pokreće sinteza IgE molekula kao što je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz tipova reakcije imunološkog sustava na tvari iz okoliša



Znanstvenici su nedavno pokazali analizirajući deoksiribonukleinsku kiselinu (DNA) B limfocita da se kao aktivatori promotora prepisivanja gena pojedinih klasa imunoglobulina javljaju citokini. Tako npr. poticaj za sintezu gena koji kodira molekulu IgG3 daje IFN γ , a za sintezu molekule IgE važan je IL-4 kao što prikazuje Slika 3.



Slika 3. Shematski prikaz položaja gena za imunoglobuline i odgovarajućih promotora na DNA izolirane iz B limfocita i to u smjeru 5' - 3'.

1.2. ALERGIJE

1.2.1. Općenito o alergijama

Ukoliko tijekom imunološke reakcije dođe do oštećenja organizma, tada govorimo o reakcijama preosjetljivosti ili alergijskoj reakciji. Alergijsku reakciju mogu potaknuti neki alergeni. Najčešći izvori alergena iz okoliša su: pelud, grinje, kućna prašina, životinjska dlaka, plijesni i spore, hrana, dodaci hrani, konzervansi, lijekovi i sl..

Pojam "alergija" (grč. *allos* - promijenjena, *ergon* - reaktivnost) uveo je početkom ovog stoljeća von Pirquet. Pojam alergijska reakcija obuhvaćao je dva aspekta imunološkog odgovora:

1. pojačanu otpornost na mikroorganizme i njihove toksine, nazvanu imunost,
2. različite štetne pojave, što se nazivalo preosjetljivošću.

Međutim, s vremenom je pojam alergije izgubio svoje prvobitno značenje, te se danas poistovjećuje s pojmom preosjetljivosti.

1.2.2. Preosjetljivost

Reakcije preosjetljivosti mogu biti posredovane protutijelima ili limfocitima. Reakcije posredovane protutijelima obično se nazivaju reakcijama rane preosjetljivosti, a one posredovane limfocitima reakcijama kasne preosjetljivosti. Uobičajeno je da se reakcije preosjetljivosti dijele u četiri oblika. Prva tri odnose se na reakcije posredovane protutijelima, a četvrti na reakcije posredovane limfocitima:

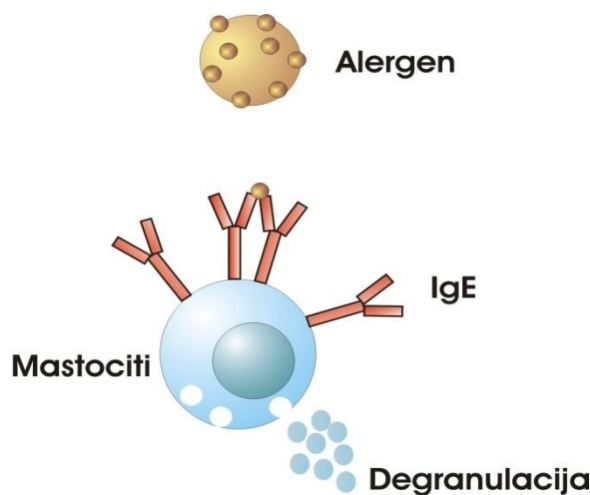
Ukratko, **u prvom** obliku (anafilaktička preosjetljivost) dolazi do oslobađanja medijatora anafilaksije nakon reagiranja antigena s IgE molekulama na ciljnim stanicama kao što prikazuje Slika 4.

Za **drugi** oblik (citotoksična preosjetljivost) karakteristično je fagocitiranje ili razaranje stanica do čega dolazi nakon vezanja protutijela za stanične antigene.

Treći oblik preosjetljivosti uzrokovan je stvaranjem slobodnih kompleksa antigena i protutijela; nakon odlaganja takvih kompleksa u tkiva dolazi do nagomilavanja različitih humoralnih i celularnih faktora, što izaziva oštećenje tkiva.

Četvrti oblik preosjetljivosti nastaje zbog izravnog toksičnog djelovanja T limfocita ili zbog oslobađanja limfokina iz njih nakon dodira s odgovarajućim antigenom.

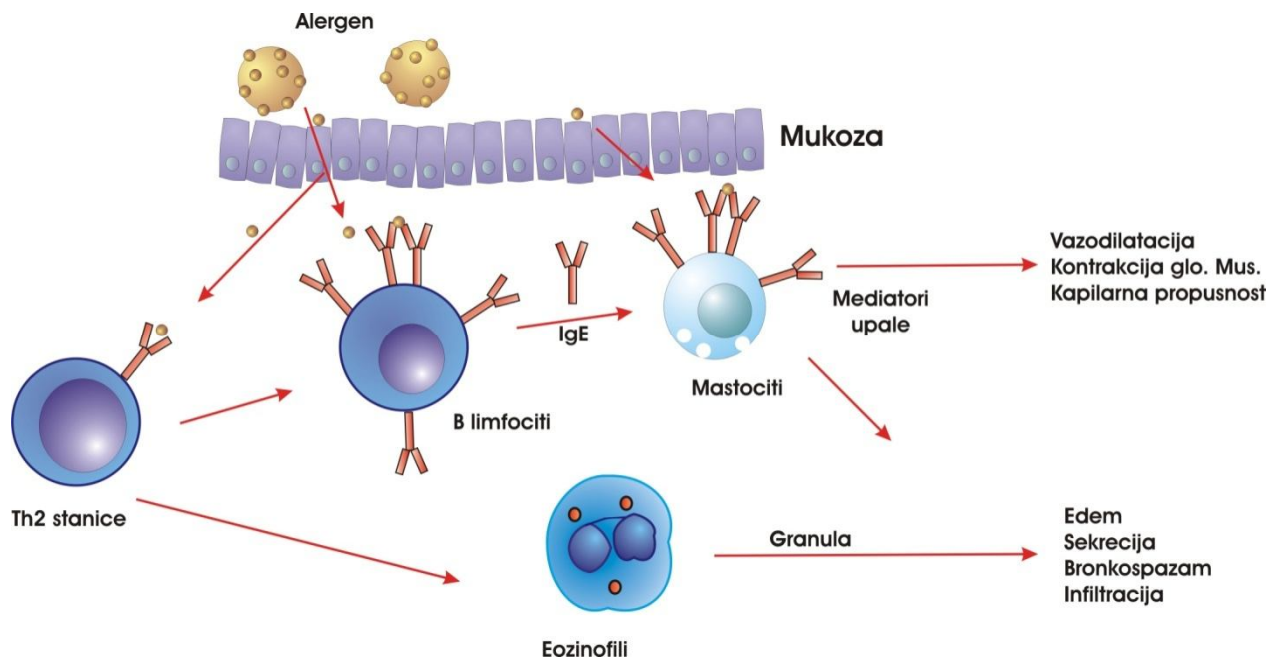
Međutim, klinička slika ponekad postaje još zamršenijom, jer se tijekom aktivacije imunološkog sustava mogu aktivirati i neki drugi sustavi, čiji se učinci međusobno isprepleću. Među njima je možda najvažniji sustav komplementa, a zatim to može biti i sustav zgrušavanja krvi, te fibrinolitički i kininski sustavi.



Slika 4. Reakcija antigena s IgE molekulama na ciljnim stanicama (mastocit).

1.2.3. Alergijska reakcija

Alergijsku reakciju možemo definirati kao prekid tolerancije i promijenjenu reaktivnu sposobnost organizma u prepoznavanju i reagiranju na strane tvari koje je do tada tolerirao. Uzrokuje čitav niz kaskadnih reakcija u vrlo kratkom vremenu. Pojednostavljeno : IgE se vežu na Fc receptor stanica mastocita, koje sadrže granule "histamina". Kada se dvije IgE molekule koje su vezane na mastocit, premoste alergenom, dolazi do oslobađanja histamina. U tom trenutku dolazi do pojave simptoma alergijske reakcije, a klinički se manifestira kao ekcem, crvenilo kao što prikazuje Slika 5.



Slika 5. Reakcija organizma na strani antigen.

1.2.4. Vrste alergije

Alergije respiratornog sustava

Peludna hunjavica ili alergijski rinitis

Najčešći je oblik alergijske reakcije od koje obolijeva desetina ljudske populacije. To je alergijsko oboljenje gornjih dišnih putova koje se javlja u vrijeme kada se u zraku nalaze čestice peludi drveća, trava i korova. Karakteristični simptomi ovog oboljenja su: svrbež i suzenje očiju, kihanje i vodenasti iscjedak iz sluznica i nosa. Tako na primjer niske koncentracije peludi (do 10 čestica polena u zraku) smatraju se normalom. Pri niskoj koncentraciji peludi u zraku samo osobe izrazito osjetljive na pelud imat će simptome peludne hunjavice.

Alergija na plijesan

U okolišu sporama se razmnožavaju gljivice i plijesni. Njihovom razvoju pogoduje visoka vlaga i visoka temperatura. Najčešći izvori su klima uređaji, odvodni umivaonici, kupaonice, tavani, madraci, vlažni dijelovi biljaka, kompostišta itd..

Alergija na životinjsku dlaku

Alergijsku reakciju mogu izazvati ne samo životinjska dlaka već ljuštenje kože ili životinjske tjelesne tekućine.

Alergija na kućnu prašinu

Grinje kao mikroskopski male životinje osnovni su sastav kućne prašine. Nalaze se u tepisima, jastucima, perju, zavjesama, tapeciranom namještaju. Hrane se mrtvim stanicama kože, perjem i plijesnima.

Alergije gastrointestinalnog sustava

Alergija na hranu najčešće se manifestira kao edem sluznice usne šupljine, svrbež, osjećaj gušenja, gubitak tjelesnih tekućina. Kao najčešći uzročnici navodi se: jaja, mlijeko, ribe, rakovi, školjke, soja, orasi, jagode, agrumi, čokolada itd..

Alergija na insekte

U okolišu ljudi postoji oko milijun vrsta kukaca, a ubodi osa, pčela, mrava se navode kao najčešći uzročnik alergijskih reakcija.

Alergija na lijekove i dijagnostička kontrastna sredstva

Alergijska reakcija nije rezultat normalnog fiziološkog utjecaja lijeka na organizam. O alergijskoj reakciji na lijekove i dijagnostička sredstva malo se zna, no uvođenjem penicilina u terapiju dobiven je ponajčešći uzročnik alergijske reakcija na lijekove. Nadalje, atopijska alergijska reakcija može se javiti na neki lijek, ali organizam reagira na njegove metabolite ili zaostajanje u organizmu zbog neizlučivanja (urin, izmet, koža ili dr.).

Alergijska reakcija na sunce

Alergije na sunce nastaju nakon djelovanja UVc i UVb svjetla na kožu. Alergijska reakcija manifestira se u obliku crvenila, jakog svrbeža i osipa. Nadalje, alergijsku reakciju mogu pospješiti i fotosenzibilizirajuće tvari uzete kao lijekovi ili kao kozmetička sredstva.

Profesionalne alergije

Nastaju nakon direktnog kontakta pokrovnog epitela s alergenom. Simptomi su crvenilo, edem, jak svrbež, osip, ljuskanje kože. Ukoliko je koža dugotrajno izložena djelovanju alergena javlja se kontaktni dermatitis.

1.2.5. Liječenje alergije

Najbolji i najefikasniji način sprječavanja alergijske reakcije je izbjegavanje alergena. To nažalost, u današnjem načinu i tempu života, najčešće nije moguće, pa se za prevenciju i liječenje posljedica alergijskih reakcija koriste različite metode kao što su: potkožna specifična imunoterapija, sublingvalna specifična imunoterapija i nazalna specifična imunoterapija, uz korištenje različitih sredstava kao što su oralni H₁-antihistaminici, intranazalni H₁-antihistaminici, intranazalni kortikosteroidi, intranazalni kromolini i antileukotrieni.

Dosadašnje primijenjene metode liječenja alergija u najvećoj mjeri su usmjerene na supresiju imunološkog sustava, što izaziva lokalnu imunodeficijenciju, tj. eliminira stanice imunološkog sustava koje su bile prisutne na mjestu ulaska alergena u organizam. Dugotrajna primjena takvih lijekova može izazvati sistemsku imunosupresiju ili imunomodulaciju pa može imati neželjene posljedice po primatelja terapije.

Zbog navedenih razloga, postoji stalna potreba za pronalaženjem novih, efikasnijih metoda i sredstava širokog spektra djelovanja u prevenciji i liječenju posljedica alergijskih reakcija, koja neće izazivati imunosupresivni i/ili imunomodulacijski učinak kod primatelja terapije.

1.3. LECTRANAL®

Lectranal® je farmaceutski pripravak koji se sastoji od kalcijevih iona (Ca²⁺) vezanih za nosač i suhog ili tekućeg ekstrakta korijena kozlinca (*Astragalus membranaceus*), a koji je efikasan u kontroli i sprečavanju nastanka i razvoja inflamatornih i alergijskih reakcija i vraćanju funkcija organizma na normalne vrijednosti aktivacijom gena koji reguliraju inflamatorne i alergijske reakcije: crvenilo

(lat. *rubor*), pregrijavanje (lat. *calor*), otekline (lat. *tumor*), bol (lat. *dolor*) i oštećenje funkcije (lat. *functio laese*).

1.3.1. Kalcijevi ioni

Uloga iona Ca^{2+} u transmembranskom signalu igra ne malu ulogu. Ioni Ca^{2+} svojim prisustvom aktiviraju Ca/NaATP-azu koja svojim prisustvom snažno regulira procese degranulacije i otpuštanja kako citokina tako i mediatora upale. Ekstracelularna koncentracija Ca^{2+} iona stabilizira navedene procese.

1.3.2. Astragalus membranaceus

Astragalus membranaceus je višegodišnja biljka iz porodice Fabaceae prikazana je na Slici 6., visine od 16 – 36cm. Raste u sjevernom i istočnom dijelu Kine, Mongoliji i Koreji (www.umm.edu). Pripada među 50 osnovnih vrsta biljaka korištenih u tradicionalnoj kineskoj medicini gdje se koristi za brže zacjeljivanje rana i u liječenju dijabetesa, dok se u zapadnoj medicini koristi za ubrzanje metabolizma i regulaciju probave, a konzumira se u obliku čaja ili juhe od sušenog korijena često u kombinaciji s drugim ljekovitim biljem (www.wikipedia.org).



Slika 6. *Astragalus membranaceus*

Gelber i sur. (Gelber i sur., US Patent 6,841,544., US Patent 6,759,062) opisali su korištenje astragalusa u smjesi s ostalim biljkama kao antioksidansa, imunostimulatora (immune booster) i pripravka za zaštitu jetre.

Hu (Hu, US Patent 6,814, 985), je opisao korištenje ekstrakta astragalusa i ostalih biljaka za tretman alergijske reakcije, profilaksiju alergijske reakcije, inflamatorne reakcije i profilaksiju inflamatorne reakcije.

Gilber i sur. (Gilber i sur., US Patent 6,793.942., US Patent 6,787,164., US Patent 6,576,267), su opisali korištenje ekstrakta astragalusa kao antioksidansa.

Lam (Lam, US Patent 6,468,541., US Patent 5,464,982), je opisao korištenje astragalusa kao stimulatora imunološkog sustava.

Prema navedenim referencama, dosadašnja primjena astragalusa pokazala je da se ekstrakt astragalusa nije primjenjivao kao regulator imunološke reakcije, već je primjenjivan kao antioksidans i imunostimulator. S druge strane, Ca^{2+} kao farmaceutski produkt nije pokazao pozitivnu primjenu u alergijskoj reakciji, s obzirom na pacijenta, upravo suprotno njegova je prisutnost pogoršala alergijske reakcije.

Iz navedenog je jasno vidljivo da pojedinačna primjena astragalusa doprinosi, ali bitno ne utječe na razvoj tijeka alergijske reakcije, a pojedinačna primjena Ca^{2+} daje suprotne efekte.

Dong-Hee i sur. (Dong-Hee i sur., 2006), te Jeong i sur. (Jeong i sur., 2002) inhibirali su intracelularno oslobađanje Ca^{2+} iona i time spriječili oslobađanje medijatora upale. Na taj način pokazano je da Ca^{2+} ioni aktivno sudjeluju u alergijskoj reakciji. Svojim prisustvom oni pomažu oslobađanju imunoglobulina IgE i iz granula mastocita oslobađaju histamin te na taj način pojačavaju alergijsku reakciju.

Možemo zaključiti da pripravak koji se sastoji od astragalusa i Ca^{2+} iona nije do sada primjenjivan u regulaciji imunološkog odgovora na način na koji je to izvršeno u ovom radu.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti da li je lijek Lectranal®, kao pripravak, toksičan kod oralne uporabe. Kao model korišteni su laboratorijski miševi soja CBA/HZgr kojima je, kroz razdoblje od 30 dana, sandom davan pripravak.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISTRAŽIVAN PRIPRAVAK

Naziv pripravka: Lectranal® tvrtka MILSING d.o.o., Zagreb

Doze pripravka: 5, 50 i 100 mg po mišu dnevno, u volumenu od 500 µL

Način unošenja: sondom oralno

3.2. POKUSNE ŽIVOTINJE

U pokusu su korišteni visoko srođeni miševi soja CBA/HZgr(H-2^k) uzgojeni u Institutu Ruđer Bošković, Zagreb. Tjedan dana prije početka pokusa miševi su uzeti iz uzgoja i prilagođeni uvjetima prostorije, u kojoj su držani tijekom trajanja pokusa.

Pripravak je testirana na miševima soja CBA /HZgr nakon oralne primjene (sondiranje) kroz period od 30 dana.

Od okota do početka ispitivanja životinje su držane u standardnim uvjetima: 10 miševa po kavezu, 12/12 sati dan/ noć, temp. 22°C, vlažnost 50-70%, hranjeni standardnom GLP laboratorijskom hranom Mucedola srt, Italia, pristup hrani i vodi bio je ad libitum.

3.3. PRAĆENJE TJELESNE MASE MIŠEVA

Tjelesna masa svakog pojedinog miša određivana je jedanput tjedno tijekom mjesec dana, u svrhu procjene toksičnosti Lectranal®-a, vaganjem na električnoj vagi Scaltec, tipa SAC62 1.200g +0,1 g.

3.4. FENOTIPSKE PROMJENE I PROMJENE PONAŠANJA

Fenotipske promjene i promjene ponašanja (praćeno svaki dan) što podrazumijeva opća i toksikološka opažanja svih životinja te uvjeta držanja životinja. Svakodnevno su životinje sondirane te je praćen mortalitet. Nadalje, jednom tjedno životinje su detaljno klinički pregledane. Praćene su promjene na koži životinja, na

krznu, očima, sluznicama. Detaljno je praćeno ponašanje, pokreti, držanje, motorička aktivnost te autonomna aktivnost.

3.5. KLINIČKO LABORATORIJSKO ISTRAŽIVANJE

Nakon 30-to dnevne terapije pripravkom životinje su 24 sata provele u metabolićkim kavezima. Nakon 24 sata izmjerili smo:

A - kolićinu hrane koju su životinje pojele (g),

B - volumen popijene vode (ml)

C – volumen izlućenog urina (ml) te

D – kolićinu izlućenog izmeta (g)

3.5.1. Analiza urina

Za analizu urina koristili smo urinske trake (Combur 10 Test M, Roche GmbH) za semi-kvantitativno određivanje specifićne težine, pH, nitrita, glukoze, leukocita, proteina, ketona, urobilinogena, bilirubina i krvi u urinu.

3.5.2. Hematološki parametri

Hematološki parametri u krvi miševa određeni su pomoću brojaća Abbott Hematology Analyzer, USA od kojih su prikazani: hematokrit, broj eritrocita, koncentracija hemoglobina, leukociti, limfociti i monociti

3.5.3. Analiza seruma

Klinićko-kemijski parametri u serumu miševa određivali smo pomoću automatskog analizatora Olympus, AU 600, Japan. Određivani su ukupni proteini, albumin, glukoza, kolesterol, urea, kreatinin, AST, kalcij i kalij.

3.6. RAZUDBA

Nakon žrtvovanja životinje su detaljno pregledane te su im izvagani organi: mozak, timus, srce, jetra, slezena, bubreg, nadbubrežna žlijezda, te ovisno o spolu testis ili ovarij.

3.7. HISTOLOGIJA

Za histološku obradu uzeti su slijedeći organi (kontrolnih skupina i skupine miševa s najvećom dozom Lectranal®-a: mozak, želudac, crijevo, jetra, bubreg, nadbubrežna žlijezda, slezena, srce, timus, štitnjača (žljezdano tkivo), pluća, spolne žlijezde (testis ili ovarij), mokraćni mjehur, limfni čvor.

Izrada i bojenje histološkog preparata, ukratko: nakon fiksacije tkiva u Bouinu uzorci tkiva uklapaju su u parafin, izrežu na debljine 4 µm te oboje standardnom bojom hemalaun-eozin.

3.8. PATOLOŠKA ANALIZA

Za patološku analiza preparati su analizirani svjetlosnim mikroskopom. Mikroskopska evaluacija tkiva na eventualne patološke promjene obavljena je u Zavod za molekularnu medicinu IRB-a laboratorija LMET.

3.9. KOŽNI TEST

Miševi su pre tretirani Lectranal®om 30 dana svakodnevnim sondiranjem. Nakon 30 dana miševima je intradermalno ubrizgano 100µL Freund'sov adjuvant (FA) (Sigma, USA), u fosfatnom puferu (PBS, Sigma, USA). Tijekom narednih 4 dana miševi su primali Lectranal®. 5. dana ubrizgano im je metilensko modriilo 0,1 % u PBS-u i nakon 2 sata miševi su uspavani u atmosferi CO₂ i žrtvovani. Veličina edema, na leđima miša, mjerna je Kaliperom s milimetarskom podjelom.

4. REZULTATI

4.1. TEŽINA TIJELA

Na početku ispitivanja, težina tijela miševa ove ispitivane grupe kretala se prosječno oko 30 grama. Miševima koji su svakodnevno primali sondom Lectranal® u dozi od 5, 50 ili 100 mg, tijekom mjesec dana, težina tijela je varirala, no uvijek se kretala u granicama od oko 5 % u odnosu na početne vrijednosti.

Nakon mjesec dana terapije miševa Lectranal®-om, nije zapažena značajna promjena težine tijela miševa u odnosu na početnu težinu tijela. U grupi kontrolnih miševa, koji nisu primali Lectranal®, također su zapažene male promjene u težini tijela. Na kraju pokusa (30 dana) težina tijela ispitanih grupa miševa nije se značajno razlikovala u odnosu na početnu težinu tijela, niti prema kontrolama. Promjena tjelesne težine kontrolnih i tretiranih miševa prikazana je u Tablici 2.

Tablica 2. Promjena tjelesne težine (g) kontrolnih i tretiranih miševa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Pocetna tezina	Kontrola	12	29.50	2.195	.634	28.11	30.89	26	33
	Grupa 5	12	29.00	1.279	.369	28.19	29.81	28	32
	Grupa 50	12	29.83	1.899	.548	28.63	31.04	27	32
	Grupa 100	12	29.92	1.676	.484	28.85	30.98	28	33
	Total	48	29.56	1.773	.256	29.05	30.08	26	33
1 tjedan	Kontrola	12	28.75	2.094	.605	27.42	30.08	26	32
	Grupa 5	12	27.33	1.497	.432	26.38	28.28	25	30
	Grupa 50	12	28.75	1.658	.479	27.70	29.80	26	31
	Grupa 100	12	29.17	1.528	.441	28.20	30.14	27	31
	Total	48	28.50	1.798	.260	27.98	29.02	25	32
2 tjedan	Kontrola	12	29.33	1.969	.569	28.08	30.58	26	32
	Grupa 5	12	27.50	1.508	.435	26.54	28.46	26	30
	Grupa 50	12	29.17	1.801	.520	28.02	30.31	26	31
	Grupa 100	12	28.83	1.586	.458	27.83	29.84	26	31
	Total	48	28.71	1.821	.263	28.18	29.24	26	32
3 tjedan	Kontrola	12	29.83	1.946	.562	28.60	31.07	27	33
	Grupa 5	12	28.00	1.706	.492	26.92	29.08	26	31
	Grupa 50	12	29.17	1.992	.575	27.90	30.43	26	32
	Grupa 100	12	29.83	1.528	.441	28.86	30.80	28	32
	Total	48	29.21	1.901	.274	28.66	29.76	26	33
4 tjedan	Kontrola	12	29.33	1.923	.555	28.11	30.55	27	32
	Grupa 5	12	28.17	1.899	.548	26.96	29.37	27	32
	Grupa 50	12	29.00	3.104	.896	27.03	30.97	21	32
	Grupa 100	12	29.50	2.153	.622	28.13	30.87	26	33
	Total	48	29.00	2.306	.333	28.33	29.67	21	33

4.2. KOLIČINA POJEDENE HRANE

Miševi koji su svakodnevno primali sandom Lectranal® u dozi od 5, 50 ili 100 mg, tijekom mjesec dana, količina pojedene hrane kretala se granicama kontrolnih vrijednosti u prosjeku oko 3 grama dnevno. Tijekom 4 tjedna svi miševi su podjednako uzimali hranu i nije zapaženo odbijanje hrane ili prekomjerno uzimanje hrane. Količina pojedene hrane kontrolnih i tretiranih miševa prikazana je u Tablici 3.

Tablica 3. Količina pojedene hrane (g) kontrolnih i tretiranih miševa

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
1 tj. hrana	Kontrola	12	2.250	.0522	.0151	2.217	2.283	2.2	2.3
	Grupa 5	12	2.650	.4700	.1357	2.351	2.949	2.2	3.1
	Grupa 50	12	3.050	.0522	.0151	3.017	3.083	3.0	3.1
	Grupa 100	12	3.100	.2089	.0603	2.967	3.233	2.9	3.3
	Total	48	2.763	.4286	.0619	2.638	2.887	2.2	3.3
2 tj. hrana	Kontrola	12	2.850	.1567	.0452	2.750	2.950	2.7	3.0
	Grupa 5	12	2.350	.4700	.1357	2.051	2.649	1.9	2.8
	Grupa 50	12	3.050	.1567	.0452	2.950	3.150	2.9	3.2
	Grupa 100	12	3.075	.1828	.0528	2.959	3.191	2.9	3.3
	Total	48	2.831	.3970	.0573	2.716	2.947	1.9	3.3
3 tj. hrana	Kontrola	12	3.000	.1044	.0302	2.934	3.066	2.9	3.1
	Grupa 5	12	2.800	.1044	.0302	2.734	2.866	2.7	2.9
	Grupa 50	12	2.650	.2611	.0754	2.484	2.816	2.4	2.9
	Grupa 100	12	3.150	.0522	.0151	3.117	3.183	3.1	3.2
	Total	48	2.900	.2423	.0350	2.830	2.970	2.4	3.2
4 tj. hrana	Kontrola	12	2.500	.1044	.0302	2.434	2.566	2.4	2.6
	Grupa 5	12	2.950	.4700	.1357	2.651	3.249	2.5	3.4
	Grupa 50	12	2.900	.3133	.0905	2.701	3.099	2.6	3.2
	Grupa 100	12	2.600	.1044	.0302	2.534	2.666	2.5	2.7
	Total	48	2.738	.3425	.0494	2.638	2.837	2.4	3.4

4.3. VOLUMEN POPIJENE VODE

Tijekom mjesec dana miševi koji su svakodnevno primali sondom Lectranal® u dozi od 5, 50 ili 100 mg, i bez obzira na put unošenja, volumen popijene vode kretao se granicama kontrolnih vrijednosti te nema razlika između tretiranih i kontrolnih miševa. Volumeni popijene vode kontrolnih i tretiranih miševa prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4. Volumeni (ml) popijene vode kontrolnih i tretiranih miševa

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
1 tj. voda	Kontrola	12	1.450	.2611	.0754	1.284	1.616	1.2	1.7
	Grupa 5	12	2.350	.6789	.1960	1.919	2.781	1.7	3.0
	Grupa 50	12	2.250	.0522	.0151	2.217	2.283	2.2	2.3
	Grupa 100	12	3.100	.6267	.1809	2.702	3.498	2.5	3.7
	Total	48	2.288	.7519	.1085	2.069	2.506	1.2	3.7
2 tj. voda	Kontrola	12	2.150	.1567	.0452	2.050	2.250	2.0	2.3
	Grupa 5	12	2.200	.1044	.0302	2.134	2.266	2.1	2.3
	Grupa 50	12	1.750	.0522	.0151	1.717	1.783	1.7	1.8
	Grupa 100	12	2.000	.3133	.0905	1.801	2.199	1.7	2.3
	Total	48	2.025	.2514	.0363	1.952	2.098	1.7	2.3
3 tj. voda	Kontrola	12	2.850	.1567	.0452	2.750	2.950	2.7	3.0
	Grupa 5	12	2.700	.2089	.0603	2.567	2.833	2.5	2.9
	Grupa 50	12	2.500	.3133	.0905	2.301	2.699	2.2	2.8
	Grupa 100	12	2.700	.2089	.0603	2.567	2.833	2.5	2.9
	Total	48	2.688	.2548	.0368	2.614	2.761	2.2	3.0
4 tj. voda	Kontrola	12	2.750	.0522	.0151	2.717	2.783	2.7	2.8
	Grupa 5	12	2.900	.4178	.1206	2.635	3.165	2.5	3.3
	Grupa 50	12	2.950	.0522	.0151	2.917	2.983	2.9	3.0
	Grupa 100	12	2.500	.0000	.0000	2.500	2.500	2.5	2.5
	Total	48	2.775	.2709	.0391	2.696	2.854	2.5	3.3

4.4. KOLIČINA IZLUČENOG URINA

Tijekom mjesec dana ispitivanja miševi koji su svakodnevno primali sandom Lectranal® u dozi od 5, 50 ili 100 mg, količina izlučenog urina kretala se granicama kontrolnih vrijednosti te nije bilo razlika između tretiranih i kontrolnih miševa. Količina izlučenog urina u kontrolnih i tretiranih miševa prikazana je u Tablici 5.

Tablica 5. Količina izlučenog urina (ml) u kontrolnih i tretiranih miševa

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
1. tj. urin	Kontrola	12	1.550	.2611	.0754	1.384	1.716	1.3	1.8
	Grupa 5	12	1.600	.1044	.0302	1.534	1.666	1.5	1.7
	Grupa 50	12	1.400	.3133	.0905	1.201	1.599	1.1	1.7
	Grupa 100	12	1.500	.2089	.0603	1.367	1.633	1.3	1.7
	Total	48	1.513	.2393	.0345	1.443	1.582	1.1	1.8
2. tj. urin	Kontrola	12	1.650	.1567	.0452	1.550	1.750	1.5	1.8
	Grupa 5	12	1.800	.0000	.0000	1.800	1.800	1.8	1.8
	Grupa 50	12	1.600	.1044	.0302	1.534	1.666	1.5	1.7
	Grupa 100	12	1.850	.1567	.0452	1.750	1.950	1.7	2.0
	Total	48	1.725	.1578	.0228	1.679	1.771	1.5	2.0
3 tj. urin	Kontrola	12	1.400	.1044	.0302	1.334	1.466	1.3	1.5
	Grupa 5	12	1.400	.1044	.0302	1.334	1.466	1.3	1.5
	Grupa 50	12	1.400	.1044	.0302	1.334	1.466	1.3	1.5
	Grupa 100	12	1.450	.2611	.0754	1.284	1.616	1.2	1.7
	Total	48	1.413	.1552	.0224	1.367	1.458	1.2	1.7
4 tj. urin	Kontrola	12	1.150	.1567	.0452	1.050	1.250	1.0	1.3
	Grupa 5	12	1.500	.3133	.0905	1.301	1.699	1.2	1.8
	Grupa 50	12	1.400	.1044	.0302	1.334	1.466	1.3	1.5
	Grupa 100	12	1.400	.1044	.0302	1.334	1.466	1.3	1.5
	Total	48	1.363	.2256	.0326	1.297	1.428	1.0	1.8

4.5. ANALIZA URINA

Izmjereni pH urina u kontrolnih i tretiranih miševa prikazan je u Tablici 6. **pH** urina kontrolnih i ispitanih miševa kretao se između 6 i 7. Ostale vrijednosti nisu zabilježene.

Tablica 6. pH urina u kontrolnih i tretiranih miševa

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
1 tj. ph	Kontrola	12	6.500	.5222	.1508	6.168	6.832	6.0	7.0
	Grupa 5	12	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
	Grupa 50	12	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
	Grupa 100	12	6.500	.5222	.1508	6.168	6.832	6.0	7.0
	Total	48	6.750	.4376	.0632	6.623	6.877	6.0	7.0
2. tj. ph	Kontrola	12	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
	Grupa 5	12	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
	Grupa 50	12	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
	Grupa 100	12	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
	Total	48	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
3 tj. ph	Kontrola	12	6.500	.5222	.1508	6.168	6.832	6.0	7.0
	Grupa 5	12	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
	Grupa 50	12	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
	Grupa 100	12	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
	Total	48	6.875	.3342	.0482	6.778	6.972	6.0	7.0
4 tj. ph	Kontrola	12	6.000	.0000	.0000	6.000	6.000	6.0	6.0
	Grupa 5	12	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
	Grupa 50	12	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
	Grupa 100	12	7.000	.0000	.0000	7.000	7.000	7.0	7.0
	Total	48	6.750	.4376	.0632	6.623	6.877	6.0	7.0

Rezultati specifične težine urina prikazani su u Tablici 7. Specifična težina urina kontrolnih i ispitanih miševa kretala se u granicama kontrolnih vrijednosti.

Tablica 7. Specifična težina urina u kontrolnih i tretiranih miševa

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Sp. tez.1 Kontrola	12	1.01000	.000000	.000000	1.01000	1.01000	1.010	1.010
Grupa 5	12	1.01000	.000000	.000000	1.01000	1.01000	1.010	1.010
Grupa 50	12	1.01125	.002261	.000653	1.00981	1.01269	1.010	1.015
Grupa 100	12	1.01250	.002611	.000754	1.01084	1.01416	1.010	1.015
Total	48	1.01094	.001972	.000285	1.01036	1.01151	1.010	1.015
Sp. tez.4 Kontrola	12	1.01000	.000000	.000000	1.01000	1.01000	1.010	1.010
Grupa 5	12	1.01500	.000000	.000000	1.01500	1.01500	1.015	1.015
Grupa 50	12	1.01375	.002261	.000653	1.01231	1.01519	1.010	1.015
Grupa 100	12	1.01000	.000000	.000000	1.01000	1.01000	1.010	1.010
Total	48	1.01219	.002507	.000362	1.01146	1.01292	1.010	1.015

4.5.1. Ostali parametri u urinu

Tijekom pokusa urini su bili testirani na eventualnu prisutnost proteina, acetona, glukoze ili stanica krvi. Ni u jednog miša, tijekom ispitivanja, nije zapažena prisutnost na proteine, acetone, glukozu ili stanice krvi u urinu.

4.6. HEMATOLOŠKI PARAMETRI

Hematološki parametri (hematokrit, eritrociti i hemoglobin) kontrolnih i tretiranih miševa prikazan je u Tablici 8.

Tablica 8. Hematološki parametri hematokrit (%), eritrociti ($10^{12}/L$) i hemoglobin (g/L) kontrolnih i tretiranih miševa

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
hematokrit	Kontrola	12	.26042	.041485	.011976	.23406	.28677	.187	.317
	Grupa 5	12	.25800	.037195	.010737	.23437	.28163	.217	.334
	Grupa 50	12	.26650	.016373	.004727	.25610	.27690	.244	.286
	Grupa 100	12	.28100	.030943	.008932	.26134	.30066	.230	.335
	Total	48	.26648	.033090	.004776	.25687	.27609	.187	.335
Eritrociti	Kontrola	12	5.5592	.51697	.14924	5.2307	5.8876	4.87	6.39
	Grupa 5	12	5.1358	.76521	.22090	4.6496	5.6220	3.88	6.52
	Grupa 50	12	5.4642	.39286	.11341	5.2146	5.7138	4.57	6.03
	Grupa 100	12	5.6517	.53730	.15510	5.3103	5.9930	5.00	6.50
	Total	48	5.4527	.58477	.08440	5.2829	5.6225	3.88	6.52
hemoglobin	Kontrola	12	95.50	7.693	2.221	90.61	100.39	82	106
	Grupa 5	12	93.75	7.533	2.175	88.96	98.54	80	104
	Grupa 50	12	101.58	4.379	1.264	98.80	104.37	94	109
	Grupa 100	12	101.50	5.962	1.721	97.71	105.29	94	115
	Total	48	98.08	7.249	1.046	95.98	100.19	80	115

U Tablici 9. prikazane su vrijednosti ostalih izmjerenih hematoloških parametara kao što su: leukociti, limfociti i monociti.

Tablica 9. Hematološki parametri leukociti ($10^9/L$), limfociti ($10^9/L$) i monociti ($10^9/L$) kontrolnih i tretiranih miševa

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Leukociti	Kontrola	12	5.792	1.1341	.3274	5.071	6.512	4.3	7.5
	Grupa 5	12	4.700	.6688	.1931	4.275	5.125	3.5	6.0
	Grupa 50	12	4.775	.8237	.2378	4.252	5.298	3.3	6.0
	Grupa 100	12	5.867	1.0386	.2998	5.207	6.527	4.6	7.7
	Total	48	5.283	1.0596	.1529	4.976	5.591	3.3	7.7
Limfociti	Kontrola	12	4.900	1.0445	.3015	4.236	5.564	3.4	6.7
	Grupa 5	12	4.025	.6851	.1978	3.590	4.460	2.8	5.4
	Grupa 50	12	4.142	.6802	.1964	3.709	4.574	2.8	5.1
	Grupa 100	12	5.183	.9233	.2665	4.597	5.770	4.1	6.7
	Total	48	4.563	.9589	.1384	4.284	4.841	2.8	6.7
Monociti	Kontrola	12	.600	.1477	.0426	.506	.694	.3	.9
	Grupa 5	12	.433	.1371	.0396	.346	.520	.2	.7
	Grupa 50	12	.333	.1614	.0466	.231	.436	.1	.6
	Grupa 100	12	.550	.2195	.0634	.411	.689	.2	.9
	Total	48	.479	.1946	.0281	.423	.536	.1	.9

Iz Tablice 8. i 9. se može vidjeti kako kontrolni miševi, tako i miševi tretirani Lectranal®-om, tijekom 30 dana nisu pokazivali odstupanja od kontrolnih vrijednosti.

4.7. BIOKEMIJSKI PARAMETRI

Biokemijski parametri (proteini, albumini, glukoza i kolesterol) kontrolnih i tretiranih miševa prikazani su u Tablici 10. Nadalje u Tablici 11. prikazani su rezultati analize seruma i to za vrijednosti: urea, kreatinin, AST, kalcij i kalij. Statističkom analizom ovih skupina ANOVA testom nije utvrđena statistička značajnost testiranih miševa u odnosu na kontrolne vrijednosti. Svi izmjereni parametri kretali su se u rasponu varijacije kontrolnih vrijednosti

Tablica 10. Biokemijski parametri proteini (g/L), albumini (g/L), glukoza (mmol/L) i kolesterol (mmol/L) kontrolnih i tretiranih miševa

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Proteini	Kontrola	12	58.08	2.151	.621	56.72	59.45	55	61
	Grupa 5	12	58.58	1.621	.468	57.55	59.61	55	61
	Grupa 50	12	58.83	2.290	.661	57.38	60.29	55	62
	Grupa 100	12	60.67	1.614	.466	59.64	61.69	58	63
	Total	48	59.04	2.123	.306	58.43	59.66	55	63
Albumin	Kontrola	12	32.517	1.2590	.3635	31.717	33.317	30.5	34.2
	Grupa 5	12	32.875	.7921	.2287	32.372	33.378	31.3	34.2
	Grupa 50	12	32.592	1.5906	.4592	31.581	33.602	29.3	34.7
	Grupa 100	12	33.750	.8274	.2388	33.224	34.276	31.9	34.7
	Total	48	32.933	1.2310	.1777	32.576	33.291	29.3	34.7
Glukoza	Kontrola	12	4.358	1.0326	.2981	3.702	5.014	2.5	5.9
	Grupa 5	12	4.717	1.2328	.3559	3.933	5.500	2.3	7.7
	Grupa 50	12	6.267	1.1812	.3410	5.516	7.017	4.3	7.8
	Grupa 100	12	4.225	1.0199	.2944	3.577	4.873	2.5	6.4
	Total	48	4.892	1.3608	.1964	4.497	5.287	2.3	7.8
Kolesterol	Kontrola	12	3.4000	.46301	.13366	3.1058	3.6942	2.40	3.98
	Grupa 5	12	3.7033	.14361	.04146	3.6121	3.7946	3.46	3.91
	Grupa 50	12	3.5975	.48763	.14077	3.2877	3.9073	2.17	3.98
	Grupa 100	12	3.9608	.26183	.07558	3.7945	4.1272	3.36	4.23
	Total	48	3.6654	.41050	.05925	3.5462	3.7846	2.17	4.23

Tablica 11. Biokemijski parametri urea (mmol/L), kreatinin umol/L), AST (IJ/L), kalcij (mmol/L) i kalij (mmol/L) kontrolnih i tretiranih miševa

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Urea	Kontrola	12	6.442	.4379	.1264	6.163	6.720	5.8	6.9
	Grupa 5	12	6.333	.9432	.2723	5.734	6.933	5.0	7.9
	Grupa 50	12	6.667	1.0782	.3112	5.982	7.352	5.2	8.4
	Grupa 100	12	6.875	.7629	.2202	6.390	7.360	5.9	8.2
	Total	48	6.579	.8402	.1213	6.335	6.823	5.0	8.4
Kreatinin	Kontrola	12	41.25	2.179	.629	39.87	42.63	38	45
	Grupa 5	12	39.33	2.498	.721	37.75	40.92	35	43
	Grupa 50	12	41.00	2.296	.663	39.54	42.46	37	45
	Grupa 100	12	40.08	2.644	.763	38.40	41.76	37	47
	Total	48	40.42	2.457	.355	39.70	41.13	35	47
AST	Kontrola	12	106.58	27.734	8.006	88.96	124.20	82	183
	Grupa 5	12	72.67	14.304	4.129	63.58	81.76	52	99
	Grupa 50	12	76.00	31.674	9.144	55.87	96.13	48	138
	Grupa 100	12	111.75	27.621	7.974	94.20	129.30	70	172
	Total	48	91.75	30.918	4.463	82.77	100.73	48	183
Kalcij	Kontrola	12	2.2925	.05225	.01508	2.2593	2.3257	2.18	2.39
	Grupa 5	12	2.3075	.06166	.01780	2.2683	2.3467	2.15	2.37
	Grupa 50	12	2.3667	.09247	.02670	2.3079	2.4254	2.20	2.52
	Grupa 100	12	2.2717	.15038	.04341	2.1761	2.3672	1.94	2.48
	Total	48	2.3096	.10049	.01450	2.2804	2.3388	1.94	2.52
Kalij	Kontrola	12	10.458	1.2391	.3577	9.671	11.246	8.7	12.3
	Grupa 5	12	9.733	.6959	.2009	9.291	10.175	8.4	10.6
	Grupa 50	12	9.617	1.0599	.3060	8.943	10.290	8.1	11.3
	Grupa 100	12	10.100	1.3003	.3754	9.274	10.926	8.3	12.5
	Total	48	9.977	1.1147	.1609	9.653	10.301	8.1	12.5

4.8. RAZUDBA I PATOLOŠKA ANALIZA

Težina organa prikazana je Tablicama 12. i 13. Nema razlike u težinama organa u odnosu na kontrolnu vrijednost. Izgled organa in situ: - svi organi su normalne veličine bez ikakvih patohistoloških promjena (mozak, želudac, crijevo, jetra, bubreg, nadbubrežna žlijezda, slezena, srce, timus, štitnjača, pluća, spolne žlijezde, mokraćni mjehur, limfni čvor).

Tablica 12. Težina organa kontrolnih i tretiranih miševa: jetra (g), bubreg (g), nadbubrežna žlijezda (mg) i mozak (mg)

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Težina jetre	Kontrola	12	1.12342	.115313	.033288	1.05015	1.19668	.929	1.280
	Grupa 5	12	1.13442	.124695	.035996	1.05519	1.21364	.946	1.429
	Grupa 50	12	1.28417	.147676	.042631	1.19034	1.37800	1.049	1.605
	Grupa 100	12	1.31058	.175288	.050601	1.19921	1.42196	1.022	1.574
	Total	48	1.21315	.162470	.023451	1.16597	1.26032	.929	1.605
Težina bubrega	Kontrola	12	.24150	.023524	.006791	.22655	.25645	.198	.285
	Grupa 5	12	.20575	.028026	.008091	.18794	.22356	.144	.260
	Grupa 50	12	.21983	.026642	.007691	.20291	.23676	.169	.258
	Grupa 100	12	.23383	.031060	.008966	.21410	.25357	.186	.283
	Total	48	.22523	.029934	.004321	.21654	.23392	.144	.285
Težena nadbubrežne	Kontrola	12	3.17	1.528	.441	2.20	4.14	1	6
	Grupa 5	12	4.83	2.209	.638	3.43	6.24	1	8
	Grupa 50	12	4.00	2.045	.590	2.70	5.30	1	8
	Grupa 100	12	2.83	1.467	.423	1.90	3.77	1	6
	Total	48	3.71	1.946	.281	3.14	4.27	1	8
Težina mozga	Kontrola	12	398.58	34.305	9.903	376.79	420.38	342	452
	Grupa 5	12	388.00	32.325	9.331	367.46	408.54	314	429
	Grupa 50	12	363.42	34.246	9.886	341.66	385.18	304	429
	Grupa 100	12	406.75	38.019	10.975	382.59	430.91	342	461
	Total	48	389.19	37.470	5.408	378.31	400.07	304	461

Tablica 13. Težina organa kontrolnih i tretiranih miševa: timus (mg), slezena (mg), testis (mg) i srce (mg).

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Težina timusa	Kontrola	12	24.58	8.806	2.542	18.99	30.18	14	40
	Grupa 5	12	33.08	12.845	3.708	24.92	41.24	20	64
	Grupa 50	12	36.83	16.146	4.661	26.57	47.09	19	65
	Grupa 100	12	30.83	10.718	3.094	24.02	37.64	17	57
	Total	48	31.33	12.840	1.853	27.60	35.06	14	65
Težina slezene	Kontrola	12	67.00	17.560	5.069	55.84	78.16	44	100
	Grupa 5	12	58.58	6.156	1.777	54.67	62.49	51	70
	Grupa 50	12	71.67	13.062	3.771	63.37	79.97	57	102
	Grupa 100	12	63.58	12.471	3.600	55.66	71.51	45	84
	Total	48	65.21	13.443	1.940	61.30	69.11	44	102
Ovarij Testis	Kontrola	12	59.25	7.921	2.287	54.22	64.28	40	74
	Grupa 5	12	66.08	11.509	3.322	58.77	73.40	56	99
	Grupa 50	12	65.75	9.047	2.612	60.00	71.50	41	76
	Grupa 100	12	62.42	6.986	2.017	57.98	66.86	52	74
	Total	48	63.38	9.174	1.324	60.71	66.04	40	99
Težina srca	Kontrola	12	131.58	15.559	4.492	121.70	141.47	115	168
	Grupa 5	12	130.00	16.376	4.727	119.60	140.40	104	156
	Grupa 50	12	125.42	11.774	3.399	117.94	132.90	112	151
	Grupa 100	12	134.25	17.669	5.101	123.02	145.48	117	173
	Total	48	130.31	15.344	2.215	125.86	134.77	104	173

4.9. PROMJENE U PONAŠANJU

Jednom tjedno praćene se autonomne aktivnosti životinja kontrolnih i ispitivanih skupina miševa (lakrimacija, piloerekcija, reakcija zjenica, način disanja) držanje, ponašanje i pokreti životinja, a na kraju ispitana je reakcija na podražaj i motoričke aktivnosti.

Tijekom ispitivanja nismo zapazili promjene u ponašanju životinja kako kontrolnih tako i miševa koji su primali Lectranal®.

4.10. SMRTNOST ŽIVOTINJA

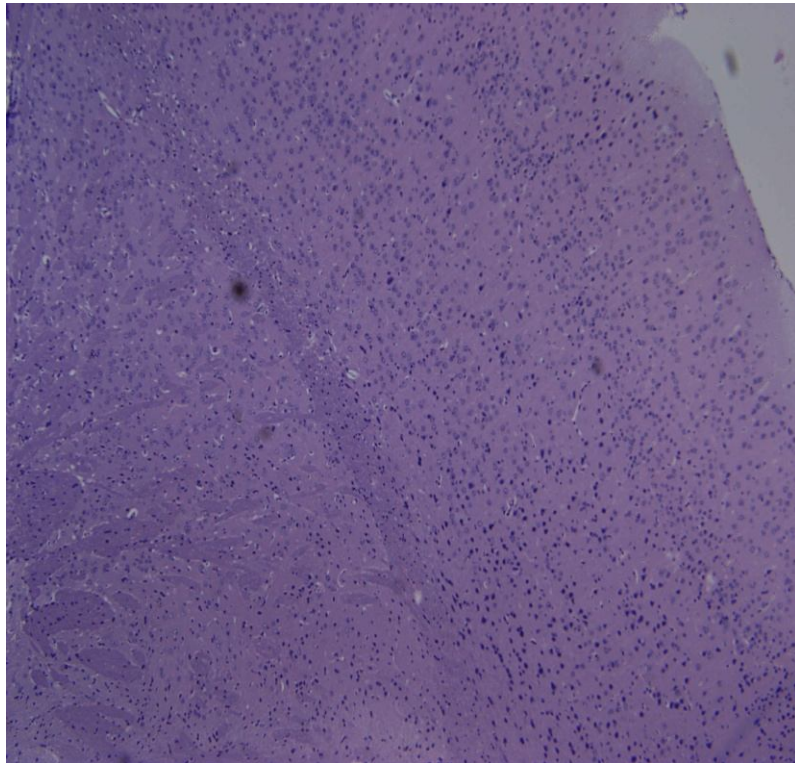
Primijenjene doze od 5, 50 i 100 mg Lectranal®-a nisu izazvale pomor tijekom 30 dana primjene.

4.11. BIHEVIORALNO PONAŠANJE

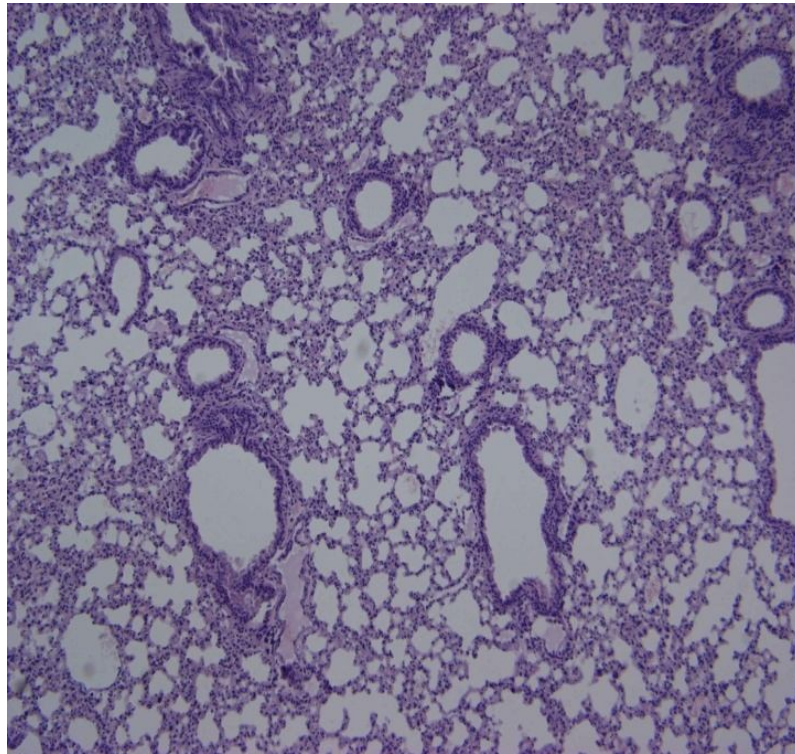
Promjene u ponašanju i reakcije na okolinu nisu zabilježene

4.12. PATOLOŠKA ANALIZA

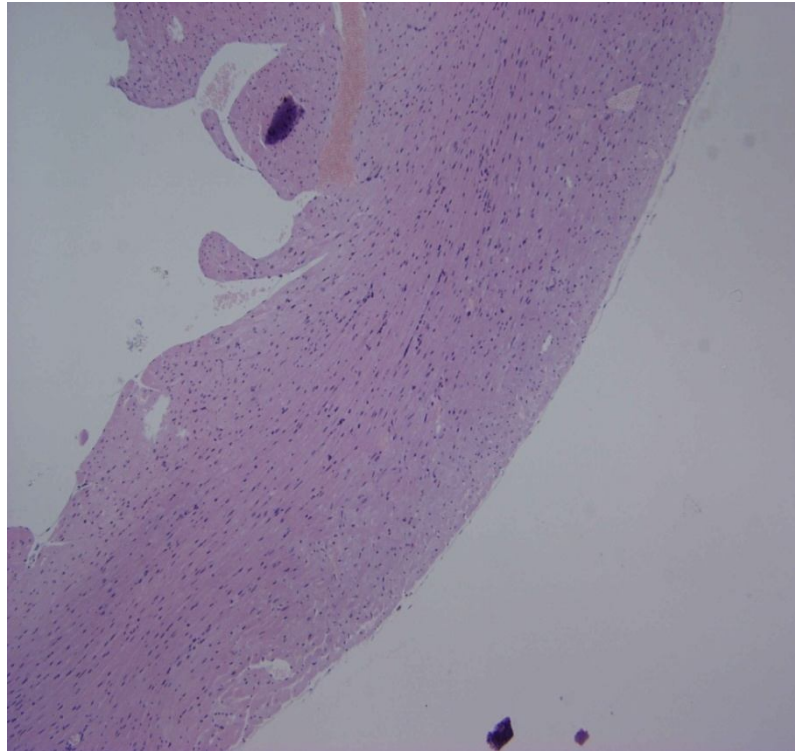
Da bi analizirali akutni toksični učinak primijenjenog Lectranal®-a, nakon 30 dana životinje su žrtvovane, organi su fiksirani u Bouieniu te izrađeni histološki preparati. Pažljivom patološkom analizom nije uočena niti jedna patološka promjena koja bi bila vidljiva na crtežu obrađenih organa. Kao dokumentaciju tog nalaza prilažem fotografije (Slike 7 – 22) svakog organa i to skupine životinja koje su kroz 30 dana primale najvišu dozu Lectranal®-a.



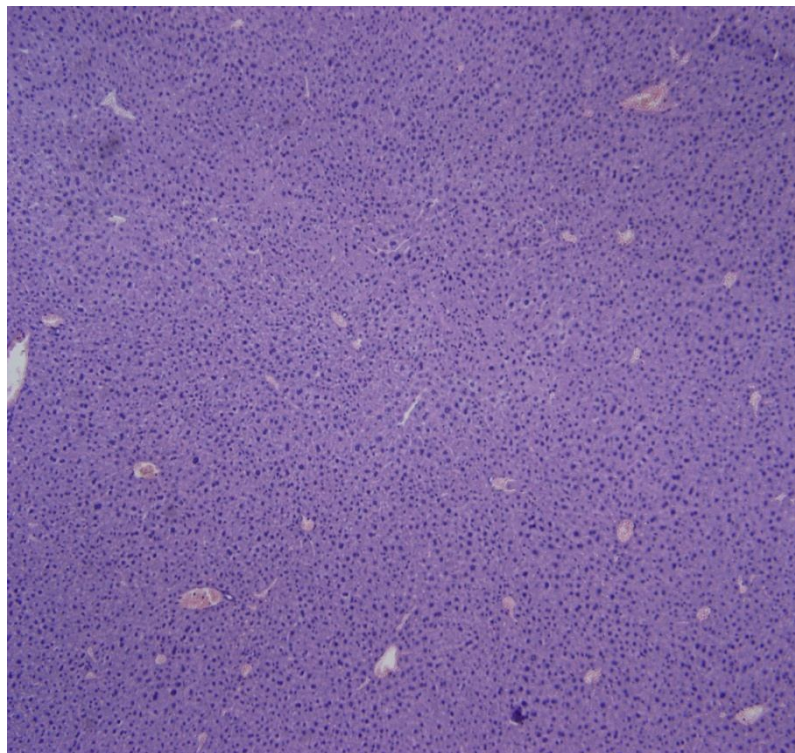
Slika 7. Patohistološki presjek kroz moždano tkivo miša koji je kroz 30 dana primao Lectranal®. Na slici se vidi pravilan crtež moždanih struktura bez ikakvih vidljivih lezija i infiltrata. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



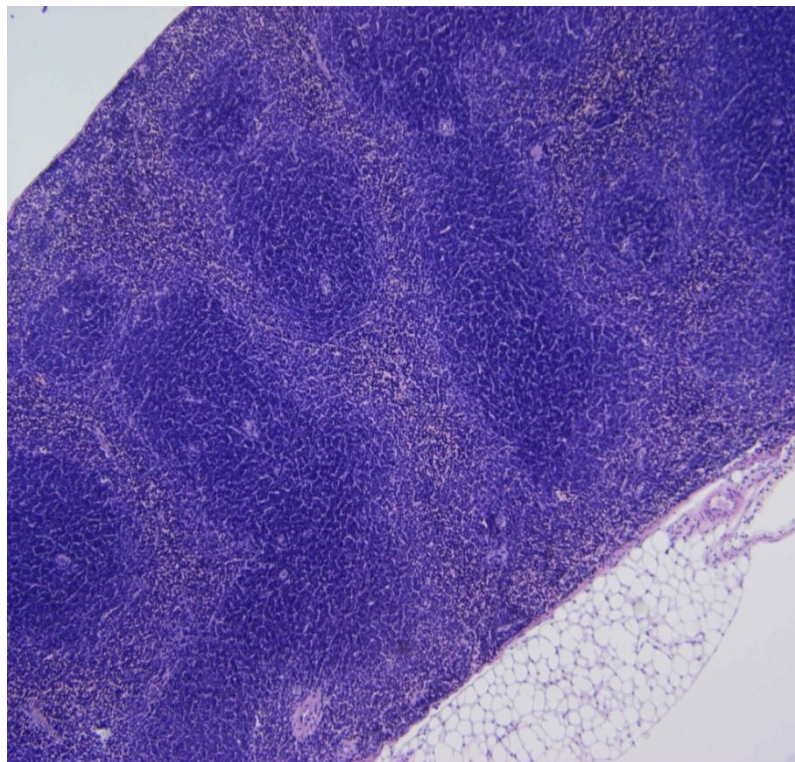
Slika 8. Patohistološki presjek kroz plućno tkivo miša koji je kroz 30 dana primao Lectranal®. Na slici se vidi pravilan crtež struktura pluća bez ikakvih vidljivih lezija i infiltrata. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



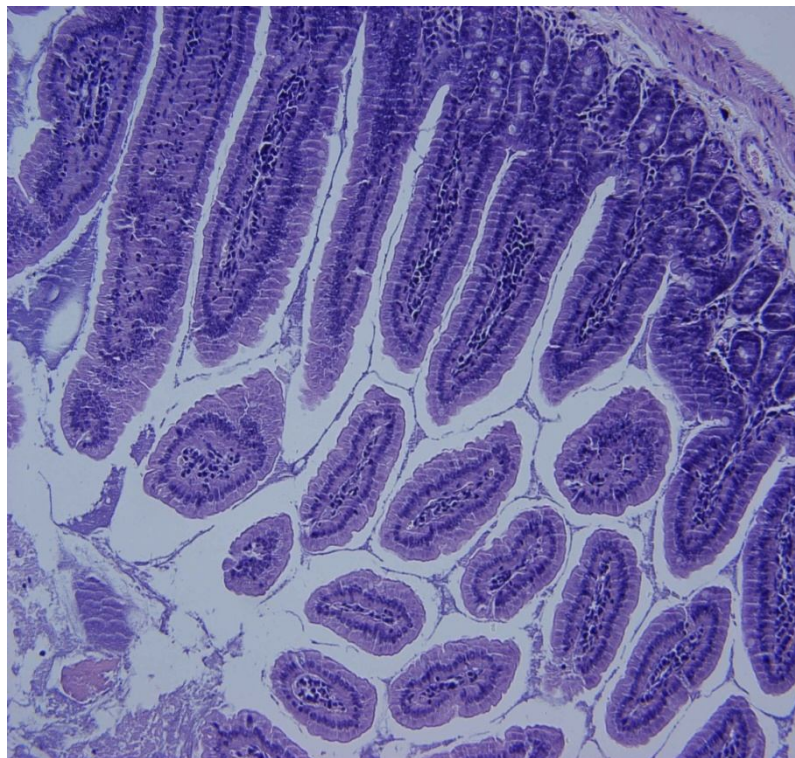
Slika 9. Patohistološki presjek srčanog mišića miša koji je kroz 30 dana primao Lectranal®. Na slici se vidi pravilan crtež srčanog mišića bez ikakvih vidljivih oštećenja i ishemije. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



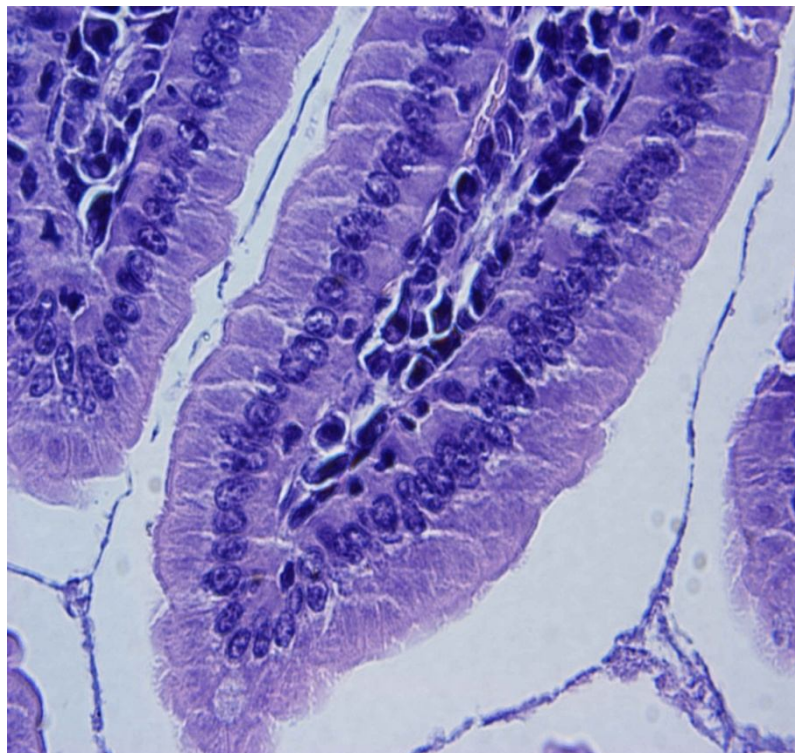
Slika 10. Patohistološki presjek jetrenog tkiva miša koji je kroz 30 dana primao Lectranal®. Na slici se vidi pravilan crtež jetre bez ikakvih vidljivih lezija, infiltrata ili masne degeneracije. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



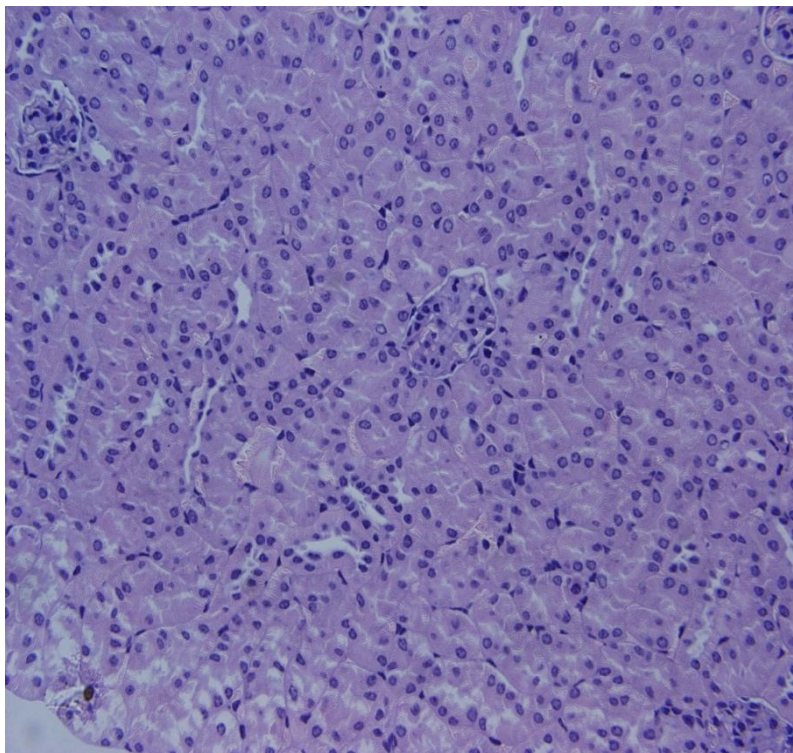
Slika 11. Patohistološki presjek kroz tkivo slezene miša koji je kroz 30 dana primao Lectranal®. Na slici se vidi pravilan crtež slezene bez vidljivih neo germinativnih centara u bijeloj ili crvenoj pulpi. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



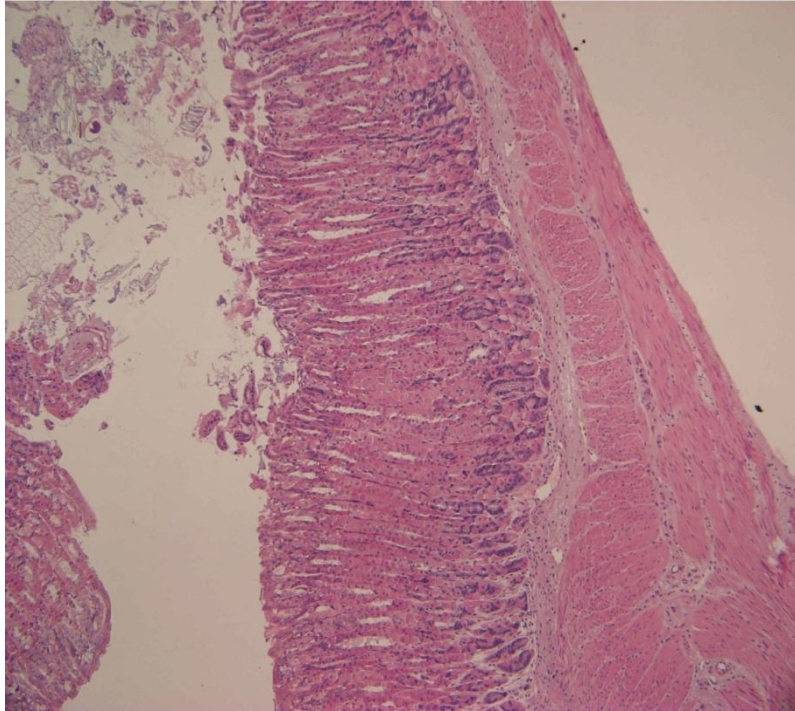
Slika 12. Patohistološki presjek kroz crijevne resice miša koji je kroz 30 dana primao Lectranal®. Na slici se vidi pravilan crtež bez infiltrata, oštećenja ili bilo kakve erozije. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



Slika 13. Patohistološki presjek kroz crijevnu resicu što pokazuje da je tkivo crijevne resice u potpunosti intaktno bez vidljivih oštećenja. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 200x.



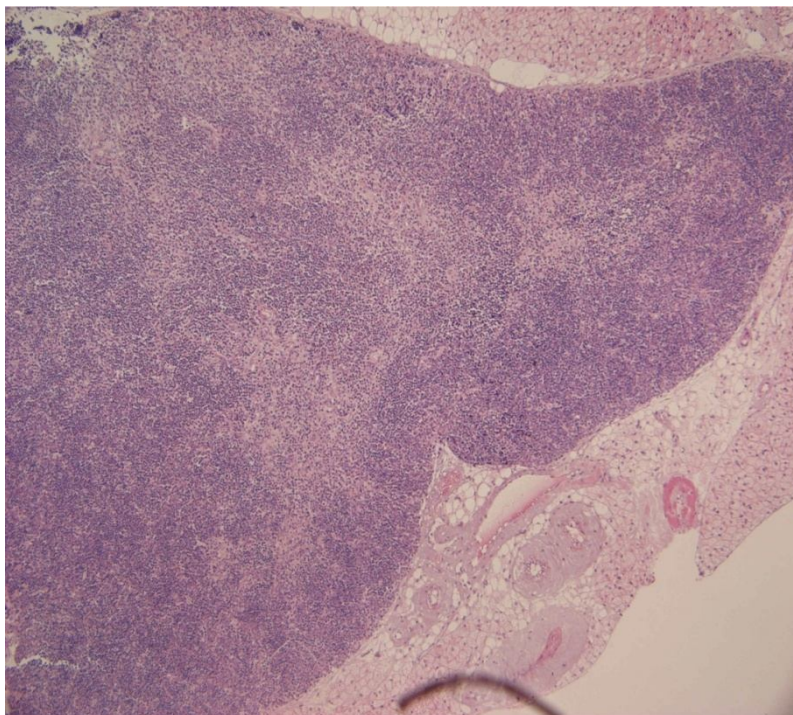
Slika 14 . Patohistološki presjek kroz bubrežno tkivo miša koji je kroz 30 dana primao Lectranal®. Na slici su vidljivi glomeruli i tubularno tkivo bubrega bez vidljivih znakova oštećenja ili nekroze. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



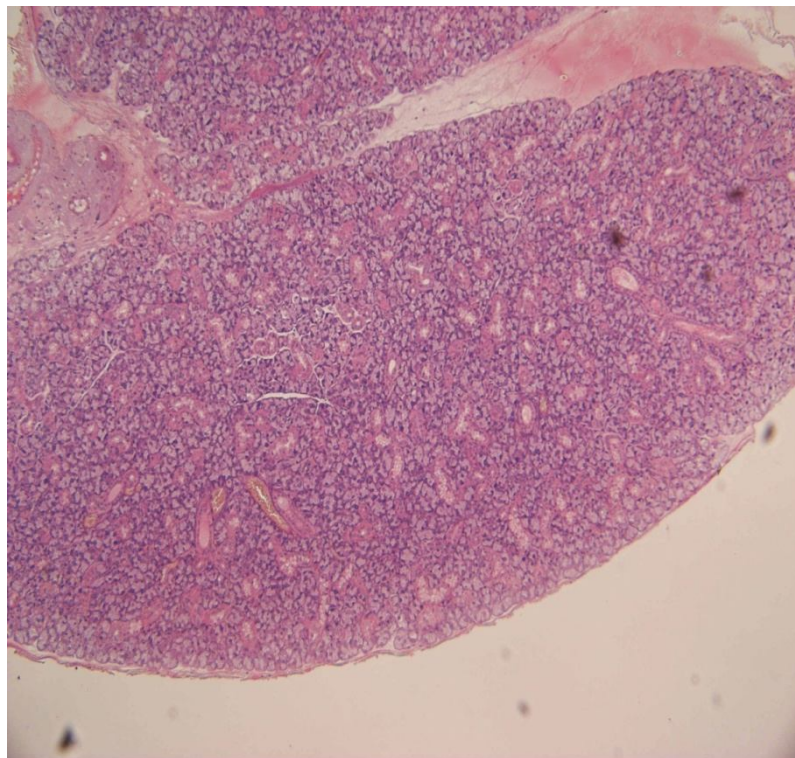
Slika 15. Histološki presjek želuca miša koji je tijekom 30 dana primao Lectranal®. Svakodnevno unošenje Lectranal®-a nije dovelo do narušavanja klasičnog crteža želučane strukture. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



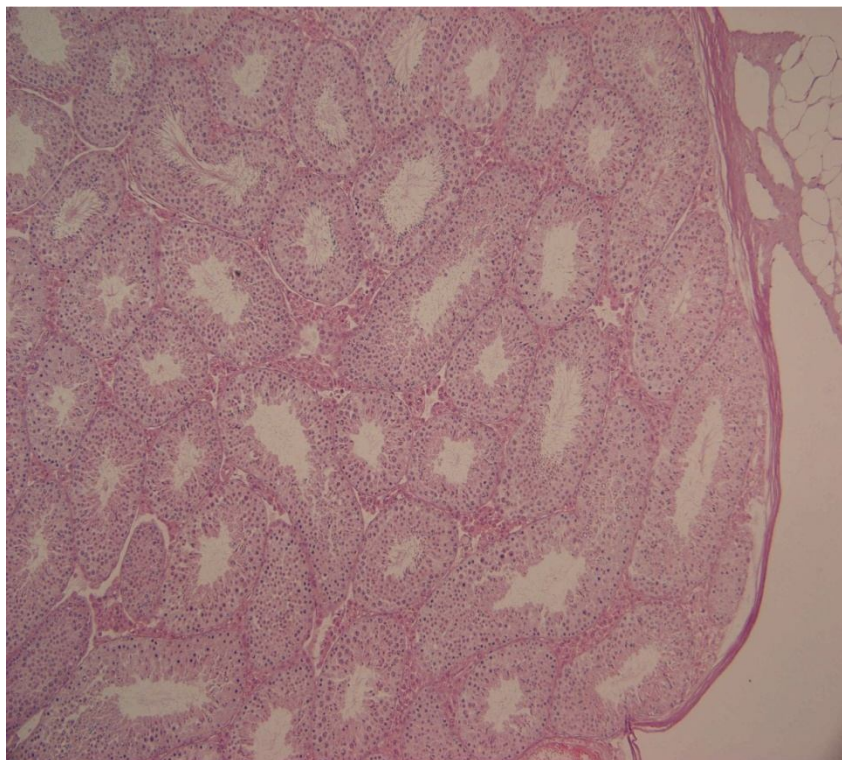
Slika 16. Histološki presjek nadbubrežne žlijezde miša koji je tijekom 30 dana primao Lectranal®. Nadbubrežna žlijezda kako svojom težinom tako i histološkim presjekom pokazuje pravilan crtež te nepromijenjeni odnos kore i medule. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



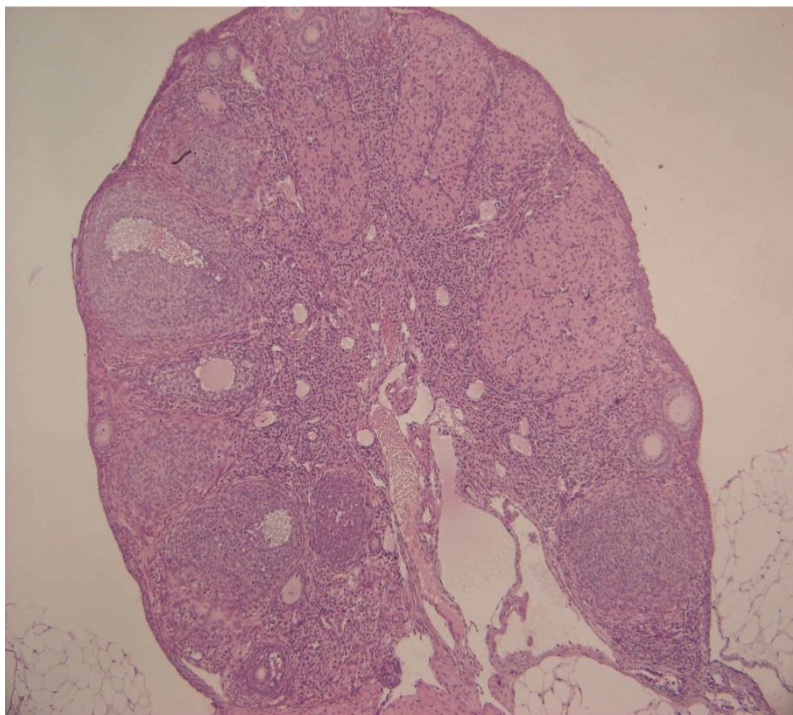
Slika 17. Histološki presjek timusa miša koji je tijekom 30 dana primao Lectranal®. Tijekom ispitivanja nije došlo do promjena težina timusa. Nadalje histološka analiza crteža timusa ne pokazuje postojanje hematopoetske proliferacije. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



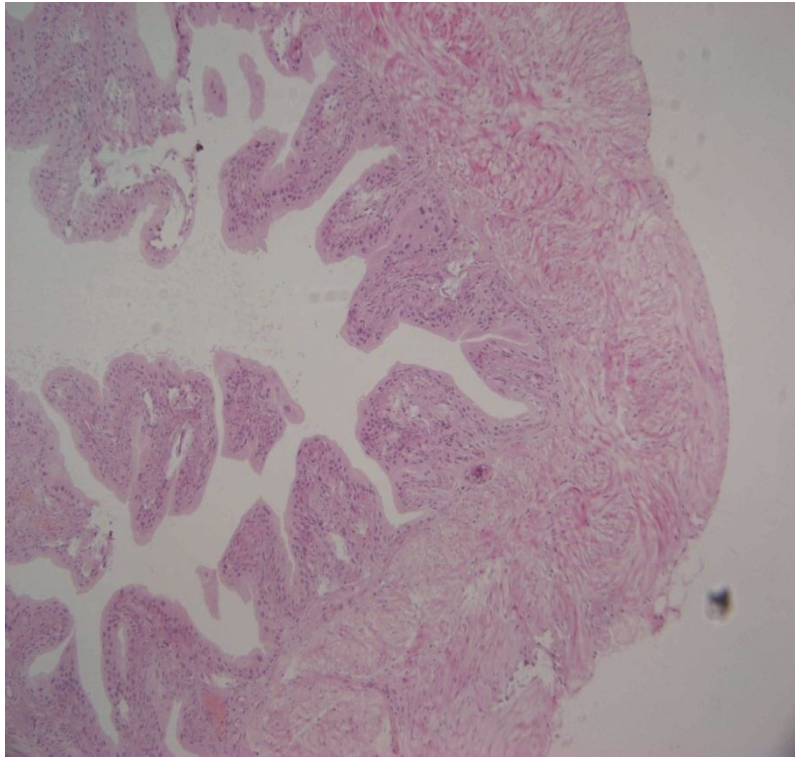
Slika 18. Histološki presjek žlijezde miša koji je tijekom 30 dana primao Lectranal®. Pregledom žljezdanog tkiva pokazalo se je da Lectranal® ne narušava strukturu i crtež žljezdanog tkiva. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



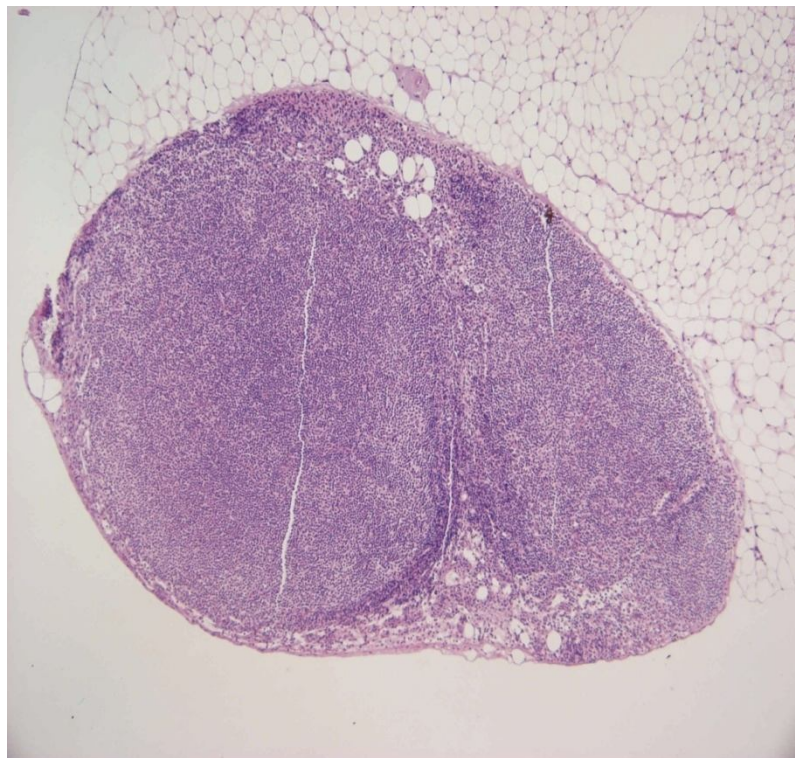
Slika 19. Histološki presjek testisa miša koji je kroz 30 dana primao Lectranal®. Na slici se vidi pravilan crtež testisa bez vidljivih znakova lezija ili bilo kakvog oštećenja. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



Slika 20. Histološki presjek ovarija miša koji je kroz 30 dana primao Lectranal®. Crtež ovarija odgovora crtežu trenutnog ciklusa u kojem se životinja nalazi bez znakova patoloških promjena. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



Slika 21. Poprečni presjek mjehura miša koji je kroz 30 dana primao Lectranal®. Struktura i histološki crtež mjehura pokazuje njegov pravilan izgled. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.



Slika 22. Poprečni presjek limfnog čvora miša koji je kroz 30 dana primao Lectranal®. Limfni čvor, kao što pokazuje ova slika, nije ekstra eradiciran te ne pokazuje *de novo* hematopoetske kolonije. Bojenje standardnom bojom hemalaun – eozin, povećanje 100x.

4.13. KONCENTRACIJA IMUNOGLOBULINA U SERUMU MIŠEVA

Uzorci dobivenog seruma su analizirani biokemijskim pretragama te su dobiveni rezultati izraženi na ukupne proteine u serumu. Takvim pristupom rezultati su prikazani s vrlo malim biološkim varijacijama što također doprinosi kvaliteti ove analize. Nakon analize imunoglobulini su izraženi kao g/L kao što je prikazano u Tablici 14.

Tablica 14. Prikaz koncentracija imunoglobulina miševa kontrolnih i eksperimentalnih skupina (rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška)

Grupe	Koncentracija imunoglobulina g/L		
	IgM	IgG	IgA
Kontrola	19,10 \pm 0,1	25,3 \pm 0,4	10,5 \pm 0,2
Kontrola +FA	22,3 \pm 0,5	29,6 \pm 0,2	12,3 \pm 0,5
Lactranal®	21,5 \pm 0,2	33,5 \pm 0,6*	10,2 \pm 0,3

*Značajno različito u odnosu na kontrolnu vrijednost $p < 0.035$

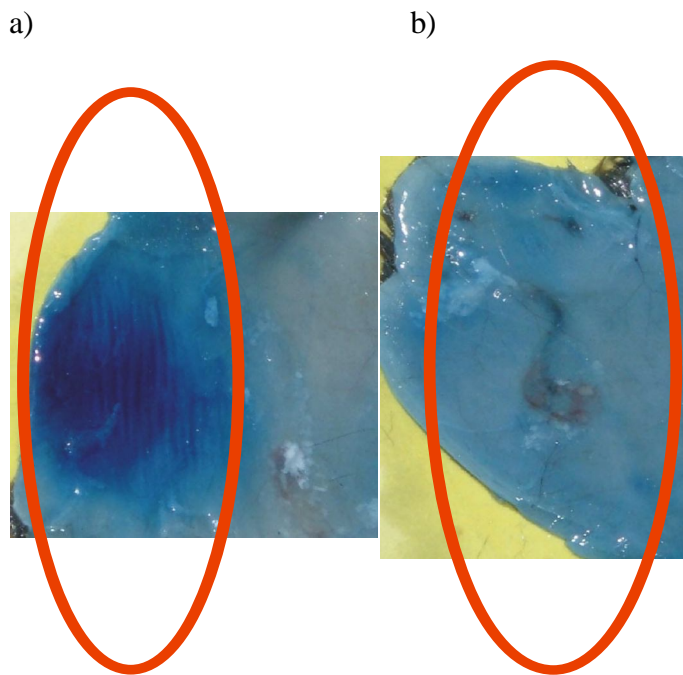
Iz Tablice 14. je vidljivo da terapija Lactranal®-om kroz 30 dana snažno i signifikantno značajno povisuje koncentraciju IgG.

4.14. ANALIZA KOŽNOG TESTA

Rezultati ispitivanja pokazali su da nakon ubrizgavanja FA kod skupine miševa koja je bila tretirana Lactranal®-om ne dolazi do značajnog razvoja edema. Promjer izmjenog zadebljanja praktički odgovara volumenu ubrizganog FA. Dok su istovremeno miševi bez terapije snažno razvili inflamatornu reakciju koja je i do 4 puta veća od grupe tretirane Lactranal®-om. Rezultati su prikazani u Tablici 15. i Slici 23. a i b.

Tablica 15. Promjer zadebljanja kožnog edema na leđima miševa

Grupe	Promjer lezije (mm)
FA	12,1 \pm 2,8*
FA+Lactranal®	3,3 \pm 1,2



Slika 23. Inflamatorni proces u koži miša (a), te miša koji je tretiran Lectranal®-om (b)

5. RASPRAVA

5.1. PREVENCIJA I ZAUSTAVLJANJE INFLAMATORNOG PROCESA

Alergije nisu izlječive, ali se simptomi alergijske reakcije mogu umanjiti. Postoje metode koje se primjenjuju u klinici i tako se umanjuju simptomi alergijske reakcije.

Prvenstveno se za umanjivanje simptoma alergijske reakcije koriste pripravci antihistaminika.

Za umanjivanje reakcije sluznica na alergene koriste se površinski kortikosteroidi koji se unose direktno u nosnu šupljinu ili nanose na sluznicu npr: kapi za oči.

Nadalje, hipersezibilizacija spada u imunoterapiju i ponekad je ona metoda izbora. Ona je dugotrajna a ponekad usprkos pozitivnim rezultatima, može potaknuti i neželjene posljedice.

5.2. UČINAK SLIČNIH PRIPRAVAKA LECTRANAL®-U

Nedvojbeno je pokazano da imunološka reakcija u jednom trenutku skrene sa svoje uobičajne rute i krene u smjeru alergijske reakcije. Za sad je poznato da molekula IL-4 igra središnju ulogu i daje povod za sintezu IgE. IgE antitijela vežu se na IgE receptor na bazofilima ili mastocitima. U prisutnosti antigena mastocisti su potaknuti na oslobađanje svojih granula i iz kojih se oslobađa histamin ili ostali medijatori upalnog procesa na mjestu reakcije (Costa i sur., 1997). Budući da je utvrđeno da citokin IL-4 igra važnu ulogu u patogenezi alergijske bolesti, inhibitori IL-4 postali su važan cilj istraživanja znanstvenika. Tako je grupa znanstvenika oko Toshio Tanake opisala niz inhibitora sinteze IL-4 (Hirano i sur., 2006).

Nadalje, pokazano je da ceramidi kao hidrofobne molekule inhibiraju oslobađanje medijatora upale i time reguliraju alergijsku reakciju (Park i sur., 2006). Moguće je također, flavonoidima spriječiti sintezu IL-4 inhibirajući aktivnost translokacijskog faktora (NF-AT). (Park, i sur., 2006).

Do sada publiciran je niz pokusa koji su rađeni s *A.membranaceus*, a kao aktivna supstanca korišten je alkoholni iscrpak ili supstance iz korijena astragalusa pročišćene

pomoću HPLC. Dobivene frakcije analizirane su masenom spektroskopijom, a rezultati su pokazali da se u alkoholnom ekstraktu korijena *Astragalus* nalaze:

- polisaharidi,
- saponini,
- flavonoidi,
- aminokiseline i
- makroelementi u tragovima.

Tradicionalna primjena, ili primjena u narodnoj medicini *A. membranaceus* opisuje per os primjenu biljnog ekstrakta kako npr.

stimulira imunološki sustav,

pojačava fagocitozu,

stimulira transformaciju T limfocita,

povećava broj makrofaga,

povisuje koncentraciju IgA i IgG i

pojačava stvaranje IFN.

Mehanizam učinka *A. membranaceus* u potpunosti nije objašnjen. Primjena astragaloida u inflamatornom procesu pokazala je antinflamatorni učinak koji se objašnjava smanjenjem ekspresije adhezivnih molekula te na mjestu upale smanjenog vezanja adhezivnih limfocita na endotel preko inhibicije NFκB aktivnosti (Zhang i sur., 2003). Literaturni podaci također su pokazali da ekstrakt *A. membranaceus* u imunodeficijentnim miševima pokazuje sposobnost pojačavanja T ovisnog imunološkog odgovora (Zhao i sur., 1990). Osim toga, znanstvenici su također pokazali da u terapiji tumora *A. membranaceus* zajedno s rekombinantnim IL-2 pokazuje imunomodulatorni učinak (Chu i sur., 1988).

Nekoliko flavonoida kao npr. apigenin, luteolin, miricetin inhibiraju antigenom potaknutu imunološku reakciju čimbenika tumorske nekroze alfa (TNFα) i IL-4 koji sudjeluju u završnom obliku alergijske reakcije tipa I. Ovi pokusi su napravljeni na mastocitima RLB-2H3 (Kimata i sur., 2000, Mastuda i sur., 2002).

5.3. IMUNOREGULACIJSKI UČINAK LECTRANAL®-A

Ispitan je antiinflamatorni učinak Lectranal®a a kao model korišteni su laboratorijski miševi. Ubrizgavanjem adjuvansa potiče se inflamatorna reakcija u miševa koji već nakon 5 dana pokazuju sve simptome snažnog inflamatornog procesa u organizmu.

Adjuvans svojim snažnim učinkom inducira aktivaciju Th2 stanica, hiperprodukciju IL-4, što je za B stanice kostimulirajući citokin. IL-4 u prisutnosti antigena aktivira specifične B stanice koje proizvode protutijela klase IgE (Romagnani, 2000) . No, analizom većeg broja gena koji su involvirani u inflamatorne procese miša pokazalo se je da Lectranal® snažno aktivira NFkB i njegovu translokaciju iz citoplazme u jezgru u stanicama slezene. Osim toga Lectranal® aktivacijom gena relb pomiče ravnotežu Th1/Th2 u smjeru Th1 tako da potiče regrutaciju Th0 u Th1 i njihovo umnožavanje. Nadalje Ca²⁺ ioni Lectranal®-a također aktivno sudjeluju u regulaciji ovog procesa.

Lectranal® regulira aktivnost klonski selektiranih B limfocita, tako da selektivni promotori kao što su npr. IFN γ i IL-10 potiču kodiranje molekula teškog lanca Ig te produkciju IgG u borbi protiv alergena. Pripravak Lectranal® koristio bi se stoga za prevenciju alergijske reakcije te ima imunoregulatornu funkciju kada su simptomi alergijske reakcije već prisutni.

Za razliku od ispitanih komponenti Lectranal®-a, *A. membranaceus* i Ca²⁺ iona pojedinačno, Lectranal® je pokazao imunoregulacijski učinak preko aktivacije prevalencije Th1 puta, te stimulirao aktivaciju B limfoctnog kompartimenta sve do plazma stanica.

Nastali IgG omogućuju makrofazima da opsoniziraju i fagocitiraju alergen, te ga tako neutraliziraju bez pojave simptoma.

Nakon primjene Lectranal®-a sprječava se senzibilizacija bolesnika, a stvorena protutijela klase IgG štite osobu od samo za nju specifičnog alergena.

6. ZAKLJUČAK

Istraživanje je izvršeno na Institutu "Ruđer Bošković" u Laboratoriju za molekularnu endokrinologiju i transplantaciju u razdoblju od 16. kolovoza do 16. prosinca 2007.

U istraživanju su korišteni CBA miševi oba spola (mužjaci i ženke) koji su primili 3 različite doze lijeka, koje su im unošene u organizam gastralnom i intestinalnom sondom.

Cilj istraživanja bio je utvrditi da li je lijek Lectranal®, kao pripravak, toksičan kod oralne upotrebe.

Tijekom akutnog istraživanja u trajanju od 30 dana praćeni su slijedeći parametri:

Fenotipske promjene.

Promjene u ponašanju i preživljavanju.

Promjene u tjelesnoj težini.

Količina pojedene hrane i popijene vode.

Promjene u hematološkim i serumskim kliničko – kemijskim parametrima.

Promjene kliničkih kemijskih parametara u urinu.

Patohistološka analiza organa na žrtvovanim kontrolnim i ispitivanim životinjama.

Nisu uočene razlike između tretiranih i kontrolnih životinja koje bi upućivale na ikakav toksični učinak Lectranal®-a.

7. LITERATURA

1. Bonizzi, G., Karin, M., 2004. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25: 280-288.
2. Chu, D.T., Lepe-Zuniga, J., Wong, W.L., LaPushin, R., Mavligit, G.M., 1988. Fractionated extract of *Astragalus membranaceus*, a Chinese medicinal herb, potentiates LAK cell cytotoxicity generated by a low dose of recombinant interleukin-2. *J Clin Lab Immunol.* 26:183.
3. Coffman R.L, Seymour, B.W.P., Leberman,D.A,Hiraki,D.D, Christiansen, J.A., Shrader, B., Cherwinski, H.M., Savelkoul, H.F.J., Finkelman, F.D., Bond, M.W., Mosmann, T.R., 1988. The role of helper T cell product in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev.* 102: 5-28.
4. Costa, J.J., Weller, P.F., 1997. Galli SJ. The cells of the allergic response: mast cells, basophils and eosinophils. *J Am Med Assoc* 278: 1815 – 1822.
5. Dong-Hee, L., Sang-Hyun, K., Jae-Soon, E., Tae-Yong, S.,2006. *Mosla dianthera* inhibits mast cell mediated allergic reactions through the inhibition of histamine release and inflammatory cytokine production. *Toxi. App. Pharmacol.* 216 479.
6. Finotto, S., Neurath, M. F., Glickman, J.N., Qin, S., Lehr, H.A., Green, F.H.Y., Ackerman, K., Haley, K., Galle,P.R., Szabo,S.J., i sur. , 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295:336.
7. Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Naka, T., Ogata, A., Shima, Y., Fujimoto, M., Yamadori, T., Ohkawara, T., Kuwabara, Y., Kawai, M., Matsuda, H., Yoshikawa, M., Maezaki, N., Tanaka, T., Kawase, I., Tanaka, T., 2006. Luteolin, a flavonoid, inhibits AP-1 activation by basophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 1–7.
8. Ho, I.C., Hodge, M.R., Rooney, J.W., Glimcher, L.H., 1996. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 85:973.

9. Jeong, H.J., Hong, S.H., Lee, D.J., Park, J.H., Kim K.S., Kim, H.M., 2002. Role of Ca²⁺ on TNF- α and IL-6 secretion from RBL-2H3 mast cells. *Cell. Signal.* 14:633.
10. Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S.T., Grusby, M.J., 1996. Stat 6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4:313.
11. Kimata, M., Inagaki, N., Nagai, H., 2000. Effects of luteolin and other flavonoids on IgE-mediated allergic reactions. *Planta Med.* 66: 25–9.
12. Kopf, M., G. Le Gros, M. Bachmann, M. C. Lamers, H. Bluethmann, G. Kohler., 1993. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362:245.
13. Li Q., Verma, I.M., 2002. NF- κ B regulation in the immune system. *Nature Rev. Immunol.* 2: 725–734.
14. Mastuda, H., Morikawa, T., Ueda, K., Managi, H., Yoshikawa, M., 2002. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF- α and IL-4 production from RBL-2H3 cells. *Bioorg Med Chem* 10:3123–8.
15. McHeyzer-Williams, M.G., McLean, M.J., Lalor, P.A., Nossal, G.J.V. ,1993. Antigen-driven B cell differentiation in vivo. *J Exp Med.* 178:295–307.
16. Mosmann, T. R., Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145
17. Park, J., Kim, S.H., Qian, L., Chang, Y.T., Kim, T.S., 2006. Inhibition of interleukin-4 production in activated T cells via the downregulation of AP-1/NF-AT activation by N-lauroyl-D-erythro-sphingosine and N-lauroyl-D-erythro-C20-sphingosine. *Biochemical Pharmacology* 71: 1229–1239.
18. Park, J., Kim, S.H., Kim, T.S., 2006. Inhibition of interleukin-4 production in activated T cells via down-regulation of NF-AT DNA binding activity by apigenin, a flavonoid present in dietary plants. *Immunol. Letters* 103: 108-114.
19. Romagnani, S., 2000. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* 105: 399-408
20. Shih, T.A., Meffre, E., Roederer, M., Nussenzweig, M.C., 2002. Role of BCR affinity in T cell dependent antibody responses in vivo. *Nat. Immunol.* 3:570–575.

21. Shimoda K., van Deursen J., Sangster, M.Y., Sarawar, S.R., Carson, R.T., Tripp R.A., Chu, C., Quelle, W.F., Nosaka, T., Vignali, D.A., et al., 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380:630.
22. Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., Glimcher, L. H., 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655.
23. Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Stemmann, C., Satoskar, A. R., Sleckman, B. P., Glimcher, L. H., 2002. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 295:338.
24. Ting, C.N., Olson, M.C., Barton, K.P., Leiden, J.M., 1996. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 384:474.
25. Zhang, W.J., Hufnagl, P., Binder, B.R., Wojta, J., 2003. Antiinflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF- κ B activation and adhesion molecule expression. *Thrombosis and Haemostasis*. 90: 904-914.
26. Zhao, K.S., Mancini, C., Doria, G., 1990. Enhancement of the immune response in mice by *Astragalus membranaceus* extracts. *Immunopharmacology*. 20:225-233.
27. Zheng, W., Flavell, R.A., 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89:587.
28. <http://www.umm.edu/altmed/articles/astragalus-000223.htm>
29. http://en.wikipedia.org/wiki/Astragalus_membranaceus

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. IMUNOLOŠKI ODGOVOR.....	1
1.1.1. Razvoj B limfocita	3
1.1.2. Uloga stanica Th1 i Th2 u imunološkom odgovoru	4
1.1.3. Regulacija imunološkog odgovora	4
1.2. ALERGIJE	7
1.2.1. Općenito o alergijama	7
1.2.2. Preosjetljivost	7
1.2.3. Alergijska reakcija	8
1.2.4. Vrste alergije.....	9
1.2.5. Liječenje alergije.....	11
1.3. LECTRANAL ®	11
1.3.1. Kalcijevi ioni	12
1.3.2. Astragalus membranaceus.....	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. ISTRAŽIVAN PRIPRAVAK	15
3.2. POKUSNE ŽIVOTINJE.....	15
3.3. PRAĆENJE TJELESNE MASE MIŠEVA.....	15
3.4. FENOTIPSKU PROMJENE I PROMJENE PONAŠANJA.....	15
3.5. KLINIČKO LABORATORIJSKO ISTRAŽIVANJE.....	16
3.5.1. Analiza urina.....	16
3.5.2. Hematološki parametri	16
3.5.3. Analiza seruma	16
3.6. RAZUDBA.....	17
3.7. HISTOLOGIJA	17
3.8. PATOLOŠKA ANALIZA	17
3.9. KOŽNI TEST	17
4. REZULTATI.....	18
4.1. TEŽINA TIJELA.....	18
4.2. KOLIČINA POJEDENE HRANE	20

4.3. VOLUMEN POPIJENE VODE.....	21
4.4. KOLIČINA IZLUČENOG URINA	22
4.5. ANALIZA URINA.....	23
4.5.1. Ostali parametri u urinu.....	24
4.6. HEMATOLOŠKI PARAMETRI	25
4.7. BIOKEMIJSKI PARAMETRI.....	27
4.8. RAZUDBA I PATOLOŠKA ANALIZA	29
4.9. PROMJENE U PONAŠANJU	30
4.10. SMRTNOST ŽIVOTINJA.....	31
4.11. BIHEVIORALNO PONAŠANJE	31
4.12. PATOLOŠKA ANALIZA	31
4.13. KONCENTRACIJA IMUNOGLOBULINA U SERUMU MIŠEVA.....	47
4.14. ANALIZA KOŽNOG TESTA.....	48
5. RASPRAVA	50
5.1. PREVENCIJA I ZAUSTAVLJANJE INFLAMATORNOG PROCESA.....	50
5.2. UČINAK SLIČNIH PRIPRAVAKA LECTRANAL®-U.....	50
5.3. IMUNOREGULACIJSKI UČINAK LECTRANAL®-A	52
6. ZAKLJUČAK	53
7. LITERATURA.....	54