

# Terapijski učinak proantocijanidina na osteoporozi štakora prouzročenu retinoičnom kiselinom

---

**Rođak, Edi**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:392435>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-12**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Edi Rođak

**TERAPIJSKI UČINAK  
PROANTOCIJANIDINA NA  
OSTEOPOROZU ŠTAKORA  
PROUZROČENU RETINOIČNOM  
KISELINOM**

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić te je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, u svrhu stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

*Od srca se zahvaljujem prof. dr. sc. Nadi Oršolić na stručnom vodstvu, svoj pruženoj pomoći i ogromnom strpljenju kao i uloženom vremenu u mene i ostvarivanje ovoga rada.*

*Profesorice, od srca Vam hvala!*

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

*Također, zahvaljujem se i mojoj obitelji na potpori i strpljenju što me je dovelo do kraja velikog poglavlja moga života.*

*Hvala Vam!*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### TERAPIJSKI UČINAK PROANTOCIJANIDINA NA OSTEOPOROZU ŠTAKORA PROUZROČENU RETINOIČNOM KISELINOM

Edi Rodak

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Osteoporoza je bolest koštanog sustava uzrokovana poremećajem u ravnoteži između izgradnje i razgradnje koštanog tkiva u korist razgradnje. Produljenjem životnog vijeka, učestalost osteoporoze je počela rasti, što je dovelo do istraživanja patogeneze osteoporoze i razvoja lijekova ili terapeutika protiv osteoporoze. U ovom radu smo istražili učinak proantocijanidina na terapiju osteoporoze uzrokovane retinoičnom kiselinom na modelu štakora. Osteoporozi štakora smo izazvali intragastričkom primjenom 13 *cis*-retinoične kiseline (13cRA, 80 mg kg<sup>-1</sup>) tijekom 15 dana te potom primijenili proantocijanidin (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronat (pozitivna kontrola, 40 mg kg<sup>-1</sup>) sljedećih 15 dana. Učinkovitost proantocijanidina smo istražili praćenjem promjene mase životinja, analizom fizikalnih čimbenika bedrenih kostiju (masa, duljina i promjeri), mjerenjem mineralne gustoće metafize bedrene kosti, određivanjem udjela kalcija i fosfora u kostima te hematološkom i biokemijskom analizom. Antioksidativni i antiupalni učinak proantocijanidina smo odredili analizom relativnih masa organa, stopom lipidne peroksidacije i koncentracijama glutationa u bubregu, jetri i jajnicima. Fitoestrogeni utjecaj je procijenjen na temelju relativne mase maternice. Dobiveni rezultati pokazuju značajni antioksidativni, antiupalni, fitoestrogeni i antiosteoporotski učinak proantocijanidina na animalnom modelu osteoporoze. Izostanak negativnih posljedica proantocijanidina i njihova laka dostupnost im daje prednost u terapiji osteoporoze u odnosu na alendronat.

(45 stranica, 14 slike, 7 tablica, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: proantocijanidini, osteoporoza, alendronat, retinoična kiselina

Voditelj: Dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor

Ocjenitelji: Dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor

Dr. sc. Antun Alegro, izvandredni profesor

Dr. sc. Petar Kružić, docent

Rad prihvaćen: 18.2.2016

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

### THERAPEUTIC EFFECT OF PROANTHOCYANIDINS ON RETINOIC ACID INDUCED OSTEOPOROSIS IN RAT

Edi Rođak

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

Osteoporosis is a disease of the skeletal system caused by disturbances in the equilibrium between formation and degradation of bone tissue in favor of decomposition. With extending life expectancy, the incidence of osteoporosis began to grow, leading to increased research into pathogenesis of osteoporosis and development of drugs or therapeutics against osteoporosis. In this study, we investigated the effect of proanthocyanidins in the treatment of osteoporosis induced by retinoic acid in the rat model. We caused osteoporosis in rats by intragastric use of 13-cis retinoic acid (13cRA, 80 mg kg<sup>-1</sup>) for 15 days, and then applied proanthocyanidin (100 mg kg<sup>-1</sup>) or alendronate (positive control, 40 mg kg<sup>-1</sup>) for the next 15 days. We have explored effectiveness of proanthocyanidins by monitoring of changes in mass of animals, analysis of femur's physical factors (weight, length and diameter), measurement of bone mineral density of femur's metaphysis, determination of calcium and phosphorus in bone and hematological and biochemical analysis. Antioxidant and anti-inflammatory effect of proanthocyanidins was determined by analyzing the relative weight of animals, the rate of lipid peroxidation and glutathione concentrations in the kidney, liver and ovaries. Phytoestrogens impact was estimated based on the relative weight of the uterus. The results show a significant antioxidant, anti-inflammatory, phytoestrogen and antiosteoporotic effect of proanthocyanidins in animal models of osteoporosis. The absence of the negative consequences of proanthocyanidins and their easy accessibility gives them an advantage in the treatment of osteoporosis compared to alendronate.

(45 pages, 14 figures, 7 tables, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: proanthocyanidins, osteoporosis, alendronate, retinoic acid

Supervisor: Dr. sc. Nada Oršolić, Professor

Reviewers: Dr. sc. Nada Oršolić, Professor

Dr. sc. Antun Alegro, Assoc. Prof.

Dr. sc. Petar Kružić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 18.2.2016

## Pregled sadržaja:

1. UVOD .....	1
1.1 Osteoporoza .....	1
1.2 Čimbenici koji utječu na razvoj osteoporoze.....	2
1.2.1 Metabolizam kalcija.....	3
1.2.2 Estrogen i fitoestrogeni .....	3
1.2.3 Oksidativni stres.....	4
1.3 Proantocijanidini.....	5
1.4 Retinoični model osteoporoze .....	7
1.5 Ciljevi istraživanja.....	8
2. MATERIJALI I METODE .....	9
2.1 Materijali .....	9
2.1.1 Životinje.....	9
2.1.2 Reagensi.....	9
2.2 Plan pokusa.....	10
2.3 Metode.....	11
2.3.1 Praćenje promjene mase životinja.....	11
2.3.2 Uzimanje uzoraka .....	11
2.3.3 Mjerenje mase maternice .....	11
2.3.4 Mjerenje mineralne gustoće kostiju .....	11
2.3.5 Udio kalcija i fosfora .....	12
2.3.6 Hematološka i biokemijska analiza krvi.....	12
2.3.7 Određivanje ukupnih proteina po Lowry-ju.....	13
2.3.8 Mjerenje lipidne peroksidacije.....	14
2.3.9 Mjerenje glutaciona .....	14
2.3.10 Statistička obrada podataka.....	14
3. REZULTATI.....	15
3.1 Promjena tjelesne mase .....	15

3.3 Utjecaj proantocijanidina na gustoću kostiju.....	18
3.4 Vrijednosti koštanog kalcija i fosfora.....	21
3.5 Fitoestrogeni utjecaj proantocijanidina .....	22
3.6 Relativna masa jetre i bubrega.....	23
3.7 Biokemijski pokazatelji u serumu .....	24
3.8 Hematološki pokazatelji u krvi.....	26
3.9 Vrijednosti lipidne peroksidacije bubrega, jetre i jajnika.....	28
3.10 Vrijednosti ukupnog glutaciona bubrega, jetre i jajnika .....	31
4. RASPRAVA.....	34
5. ZAKLJUČAK .....	38
6. LITERATURA.....	39
7. ŽIVOTOPIS .....	44



# 1. UVOD

## 1.1 Osteoporoza

Osteoporoza je kronični poremećaj kostiju karakteriziran smanjenom snagom kostiju i povećanom vjerojatnošću loma (Cortet *i sur*, 2013). Osim smanjenja koštane mase, osteoporoza može biti posljedica nedostizanja optimalne (maksimalne) koštane mase tijekom razvoja što uzrokuje brži gubitak koštane mase tijekom života (Cortet *i sur*, 2013). Prema uzroku, osteoporozi dijelimo na primarnu osteoporozi i sekundarnu osteoporozi. Primarna osteoporoza nije povezana s nikakvim drugim poremećajima i najčešće je posljedica smanjene aktivnosti spolnih stanica (primjerice gubitak estrogena) i starenja. Suprotno tome, sekundarna osteoporoza je posljedica poremećaja koji direktno ili indirektno utječu na ravnotežu razgradnje i izgradnje kostiju. Neki od poremećaja koji mogu dovesti do razvoja sekundarne osteoporoze su: nuspojave lijekova, poremećaji endokrinog sustava, poremećaji u hranjenju, gastrointestinalne bolesti, dugoročna imobilizacija, bolesti bubrega, rak ili transplantacija organa (Fitzpatrick, 2002; Cortet *i sur*, 2013).

Razvoj tehnologije i medicine je doveo do produljenja životnog vijeka što je uzrokovalo povećanu stopu nastanka osteoporoze na globalnoj razini. Time je osteoporoza stekla ime „bolest starih“. S ekonomske strane osteoporoza stavlja veliki teret na svjetski proračun. Osteoporozne kosti su podložne prijelomima koji mogu uzrokovati smanjenje mobilnosti i kvalitete života osobe ili u krajnjem slučaju smrt. Prema istraživanju Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, *engl. World Health Organization*) iz 2004, osteoporoza uzrokuje preko 8,9 milijuna prijeloma kosti godišnje (WHO, 2004). Prijelomi kostiju teško zarastaju, a prvotni prijelom povećava vjerojatnost nastanka drugog prijeloma i često zahtijeva njegu osobe do kraja života. Najčešća mjesta lomova su: kralješci, kuk, podlaktica i proksimalni dio humerusa (WHO, 2004).

## 1.2 Čimbenici koji utječu na razvoj osteoporoze

Koštani sustav je vrlo važan dio organizma. Osim što podupire tijelo, daje mišićima uporište i funkcionalnost, koštani sustav služi kao skladište minerala kalcija i fosfora. Uz navedene funkcije, koštani sustav je izvor velikog dijela imunoloških stanica i mjesto hematopoeze. Kostiju su glavne funkcionalne jedinice koštanog sustava. Sastoje se od organskog i anorganskog dijela. Organski dio je građen prvenstveno od proteina (većinom kolagen tipa I), a anorganski dio od kristala hidroksiapatita. Stanice organskog dijela kosti prema funkciji dijelimo na osteoblaste, osteocite i osteoklaste.

Osteoblasti čine oko 4-6% koštanih stanica te vrše funkciju izgradnje koštanog tkiva (Capulli *i sur*, 2014). Izgradnju kostiju vrše lučenjem osteokalcina, osteopontina i osteonektina čime formiraju koštani matriks (Katagiri i Takahashi, 2002). Nastali koštani matriks se mineralizira i stvara gotovo koštano tkivo. Osim uloge u izgradnji, osteoblasti, vrše regulaciju te inicijaciju resorpcije kosti lučenjem čimbenika stimulacije kolonije makrofaga (M-CSF, *engl. Macrophage colony-stimulating factor*). M-CSF privlači prekursore osteoklasta koji se u doticaju s osteoblastima diferenciraju u osteoklaste (osteoklastogeneza) (Boyle *i sur*, 2003; Capulli *i sur*, 2014). Nakon formiranja i mineralizacije koštanog matriksa, osteoblasti prelaze u osteocite koji zauzimaju mjesto u sredini strukture koju nazivamo lakunom matriksa i svojim metabolizmom održavaju okolno koštano tkivo (Capulli *i sur*, 2014).

Osteoklasti su stanice nastale diferencijacijom koštanih makrofaga čija je uloga razgradnja koštanog matriksa (resorpcija). Resorpcija kreće kada se osteoklast „usidri“ na ciljano mjesto u kosti. Resorptivni dio membrane osteoklasta se polarizira na barem dvije nove domene: nazubljenu kontaktnu membranu (koja vrši resorpciju) i membranu koja ima ulogu brtve između prostora resorpcije i ostatka kosti (Väänänen i Horton, 1995). Prije razgradnje organskog dijela kosti dolazi do razgradnje anorganskog izvanstaničnog matriksa. Anorganski matriks se razgrađuje snižavanjem pH vrijednosti matriksa na ~4,5 (Teitelbaum, 2000). Takav pH se postiže pumpanjem  $H^+$  iona pomoću  $H^+$  adenozin trifosfataze ( $H^+$ -ATPaza) i  $Cl^-/HCO_3^-$  izmjene (Teti *i sur*, 1989; Rousselle i Heymann, 2002). Organski dio (kolagen tipa I) se razgrađuje lizosomnom proteazom i katepsinom K, a krajnji produkt se egzocitozom izbacuje van osteoklasta na antiresorptivnom dijelu stanice (Teitelbaum, 2000).

### 1.2.1 Metabolizam kalcija

Neravnoteža u razgradnji i izgradnji ili nedovoljna akumulacija koštane mase tijekom života dovodi do stanja primarne osteoporoze. Postizanje maksimalne koštane mase tijekom razvoja i smanjenje gubitka tijekom starenja su dva glavna načina za prevenciju osteoporoze (Weaver, 2000). Prehrana i nutrijenti koje unosimo te njihova apsorpcija su važan parametar koji utječe na optimalan razvoj kosti i homeostazu koštanog sustava tijekom života. Unos kalcija i njegova optimalna apsorpcija (vitamin D) su nužni za razvoj koštane mase. Vitamin D omogućuje apsorpciju kalcija u gastrointestinalnom sustavu i moderira koncentraciju kalcija u serumu kontrolom stope apsorpcije i otpuštanja kalcija uskladištenog u kostima. Nedostatak vitamina D ili poremećaj receptora za vitamin D u gastrointestinalnom sustavu značajno smanjuje stopu apsorpcije kalcija (Bouillon *i sur*, 2003). Hidroksiapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) čini većinu anorganskog dijela kosti (Florencio-Silva *i sur*, 2015). Stoga je unos kalcija u dovoljnoj količini i obliku koji je moguće apsorbirati uz dovoljne količine vitamina D važan za postizanje maksimalne, genetički uvjetovane, koštane mase tijekom razvoja koštanog sustava.

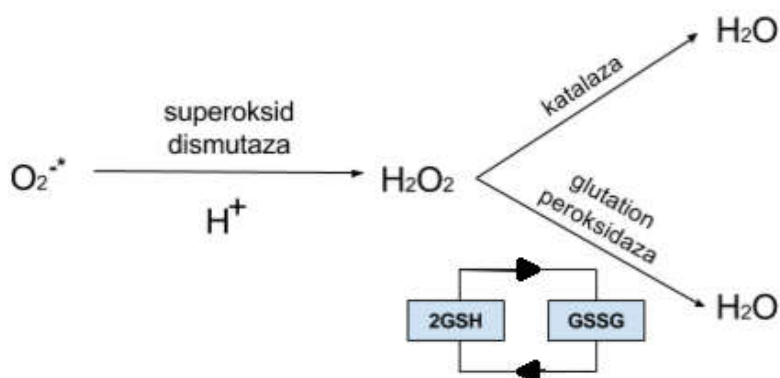
### 1.2.2 Estrogen i fitoestrogeni

Nedostatak estrogena se smatra važnim čimbenikom u razvoju osteoporoze. Nakon menopauze, u postmenopauzi, često dolazi do razvoja osteoporoze kod žena zbog izostanka proizvodnje estrogena (Al-Anazi *i sur*, 2011). Fitoestrogeni su molekule biljnog podrijetla koje zbog svoje sličnosti estrogenu pokazuju sličnu funkcionalnost kao estrogen unutar organizma (Nanashima *i sur*, 2015). Stoga se fitoestrogeni intenzivno istražuju kao potencijalna sigurna alternativa za terapiju osteoporoze uzrokovane nedostatkom estrogena (Mishima *i sur*, 2005; Narita *i sur*, 2006; Al-Anazi *i sur*, 2011).

### 1.2.3 Oksidativni stres

Oksidativni stres se definira kao poremećaj ravnoteže između prooksidativnih i antioksidativnih procesa u korist prooksidativnih procesa (Sies, 1991). Prooksidativni proces koji se konstantno događa u velikim količinama u organizmu je oksidativna fosforilacija u mitohondrijima. Redukcijom kisika dolazi do stvaranja neželjenih slobodnih radikala koji imaju jedan nesporeni elektron u vanjskoj ljusci. Nesporeni elektron slobodne radikale čini izuzetno reaktivnim što dovodi do oštećenja biomolekula u stanicama i poremećaja funkcije stanice. Slobodni radikali se sastoje od reaktivnih radikala kisika (ROS, *engl. Reactive Oxygen Species*), reaktivnih radikala dušika (RNS, *engl. Reactive Nitrogen Species*) te drugih molekula. U normalnim fiziološkim uvjetima slobodni radikali imaju pozitivnu ulogu te mogu služiti kao signalne molekule (Zhao *i sur*, 2015) no fiziološki i okolišni čimbenici mogu povećati njihovu proizvodnju te dovesti do oksidativnog stresa. Disfunkcije mitohondrija, za koje se nagađa da su jedan od uzroka starenja (Payne i Chinnery, 2015), dovode do „curenja“ slobodnih radikala u citoplazmu, a vanjski čimbenici (toksini, zračenje) mogu ubrzati i potaknuti stvaranje slobodnih radikala.

U stanicama postoje mehanizmi čija je svrha uklanjanje slobodnih radikala i održavanje njihove homeostatske koncentracije. U principu, mehanizme možemo podijeliti u dvije kategorije: autooksidacija malih molekula i aktivnost antioksidativnih enzima (Slika 1.). Molekule s antioksidativnim svojstvima kao vitamini A, C i E služe kao zamke za slobodne radikale i svojom aktivnošću potpomažu uklanjanje slobodnih radikala. Pod antioksidativne enzime ubrajamo: superoksid dismutaze (SOD), katalazu (CAT) i glutation peroksidazu (GPx), glutation reduktazu (GR). Superoksid dismutaze (SOD) spadaju u porodicu metaloenzima te kataliziraju pretvorbu superoksidnog aniona ( $O_2^-$ ) u vodikov peroksid i kisik. SOD su početni enzimi u neutralizaciji slobodnih radikala i jedni od aktivnijih enzima radi velike brzine reakcije. Vodikov peroksid nastao u reakciji sa SOD se dalje obrađuje pomoću CAT i GPx. Katalaza (CAT) pretvara vodikov peroksid u neradikalne proizvode – vodu i molekularni kisik. Glutation peroksidaza (GPx) je enzim na bazi selena. GPx koristi dvije molekule glutaciona (nativni tripeptid s antioksidativnom aktivnošću) u reakciji s vodikovim peroksidom te stvara glutation disulfid i vodu. Glutation reduktaza (GR) uz utrošak NADPH obnavlja utrošeni glutation i time završava antioksidativni ciklus.



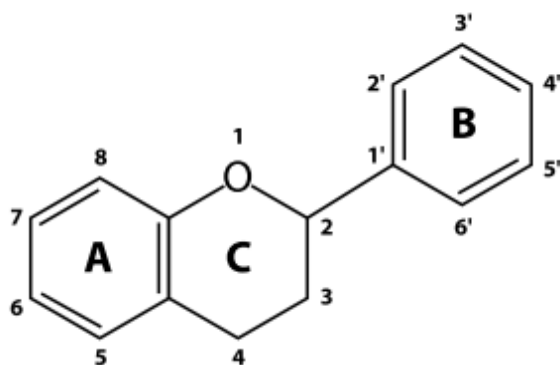
Slika 1. Proces neutralizacije superoksidnog aniona ( $O_2^{\bullet -}$ ) pomoću antioksidativnih enzima. Superoksid dismutaza pretvara  $O_2^{\bullet -}$  u vodikov peroksid koji se potom pomoću katalaze ili glutation peroksidaze pretvara u vodu. Glutation peroksidaza koristi dvije molekule glutationa (GSH) koji se oksidira u glutation disulfid (GSSG). Glutation reduktaza obnavlja GSH iz GSSG.

Jedno od oštećenja uzrokovanih slobodnim radikalima je i oksidacija nezasićenih masnih kiselina (lipidna peroksidacija). Lipidna peroksidacija je naziv skupine kaskadnih reakcija slobodnih radikala sa staničnom membranom te krajnji proizvod je malondialdehid (MDA). Malondialdehid može reagirati s 2-tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i formirati spojeve (reaktivni spojevi tiobarbiturne kiseline; *engl. TBARS, Thiobarbituric acid reactiv substances*) koje je moguće kvantificirati fotometrijski (Mihara i Uchiyama, 1978). Reakcija MDA i TBA je korištena kao relativno jednostavan biljeg za mjerenje oksidativnog oštećenja, ali zbog nespecifičnosti se radi na razvoju novih metoda i biljega (Czerska *i sur*, 2015).

### 1.3 Proantocijanidini

Proantocijanidini su polimeri katehinskih i/ili epikatehinskih monomernih prekursora (Slika 2.) (Xie *i sur*, 2003). Prema sastavu, spadaju u skupinu oligomernih flavonoida. Kao glavni prirodni izvori proantocijanidina se navode crno grožđe, brusnica, crno vino i aronija (Wu *i sur*, 2004). Flavonoide i proantocijanidine, se smatra vrlo korisnim za organizam zbog njihove modulatorne i antioksidativne aktivnosti. Velika količina današnjih istraživanja smatra da flavonoidi imaju veliki pozitivan utjecaj na razvoj i terapiju bolesti vezane uz oksidativni stres (Oršolić *i sur*, 2014), rak (Bagchi *i sur*, 2014), diabetes (Gonzalez-Abuin *i sur*, 2015), pa čak i bolesti kao Alzheimerova bolest (Apetz *i sur*, 2014) i starenje (Yokozawa *i sur*, 2014).





Slika 4. Osnovna struktura flavonoida. Slika prikazuje osnovnu strukturu flavonoida sastavljenu od dva benzenska prstena (A i B) povezanih piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik. (preuzeto od Horáková, 2011)

#### 1.4 Retinoični model osteoporoze

Retinoična kiselina pripada u skupinu nutrijenata topivih u mastima koji su nužni za kontrolu stanične proliferacije i diferencijacije pod zajedničkim imenom vitamin A. U oku derivati vitamina A imaju jedinstvenu ulogu kao jedan od prekursora rodopsina (Wright *i sur*, 2015). No, odmak od homeostatske ravnoteže vitamina A može imati negativne i opasne posljedice za organizam. Hipervitaminoza vitamina A ima izraziti utjecaj na koštani sustav. *In vivo* i *in vitro* je potvrđeno da višak vitamina A dovodi do izrazite koštane resorpcije, inhibicije koštane izgradnje i gubitka koštane mase (Johansson *i sur*, 2002). Na temelju tih saznanja, vitamin A (13-*cis*-retinoična kiselina) se počeo koristiti kao način za simuliranje stanja osteoporoze u štakora. Istraživanjima je pokazano da intragastrička primjena visokih doza retinoične kiseline u kratkom periodu (1-3 tjedna) dovodi do konstantnog gubitka koštane mase i izazivanja stanja osteoporoze (Fahmy i Soliman, 2009) kroz indukciju oksidativnog stresa te manjak estrogenske aktivnosti. Tradicionalni model osteoporoze se temeljio na odstranjivanju jajnika (ovarijektomija) što je uzrokovalo nedostatak estrogena i pojavu osteoporoze (Oheim *i sur*, 2016). U zadnjem desetljeću, retinoični model osteoporoze, se počeo primjenjivati puno više nego ovarijektomijski model jer je jednostavniji, brže izaziva osteoporozu te stvara manji stres i traumama kod modelnih organizama

## 1.5 Ciljevi istraživanja

Prema podacima iz 2004. godine, osteoporoza zahvaća više od 75 milijuna ljudi u SAD-u, Europi i Japanu (WHO, 2004). Prijelomi uzrokovani osteoporozom smanjuju kvalitetu života, često zahtijevaju njegu osobe do kraja života, a ponekad dovedu i do komplikacija koje rezultiraju smrću. Zbog navedenih razloga, razvijanje terapija i lijekova za osteoporozu je nužno za zdravlje, kvalitetu života i neovisan život starih osoba.

Cilj je istražiti učinkovitost proantocijanidina kao terapije osteoporoze uzrokovane retinoičnom kiselinom na modelu štakora. Učinkovitost je mjerena na temelju protuupalne, antioksidativne, fitoestrogenske i regenerativne aktivnosti proantocijanidina na osteoblaste i inhibiciju resorpcije koštanog tkiva. Također je napravljena poveznica između razine kalcija i fosfora, mineralne gustoće kostiju, biokemijskih i hematoloških parametara i oksidativnog oštećenja.

Za pozitivnu kontrolu i procjenu učinkovitosti proantocijanidina je korišten alendronat. Alendronat je komercijalno dostupni lijek koji se rabi u terapiji osteoporoze, a njegovo djelovanje se temelji na sprečavanju resorpcije koštanog tkiva.



## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1 Materijali

#### 2.1.1 Životinje

Kao modelni organizam, koristili smo ženke štakora visoko srodnog soja Y-59. Starost štakora je bila 3 mjeseca, a masa oko 150 g. Sve ženke smo dobili iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Životinje smo držali u kavezima dimenzija 20x32x20 cm s maksimalno 5 životinja po kavezu. Uvjeti su bili standardni (ciklus od 12 sati dana i 12 sati mraka, temperatura 24 °C uz kontroliranu vlažnost zraka). Životinje smo hranili komercijalnom hranom (4 RF 21, Mucedola S.R.L., Italija). Pristup vodi i hrani je bio *ad libitum*.

Istraživanje smo proveli u skladu sa etičkim načelima Republike Hrvatskoj, prema Zakon o zaštiti laboratorijskih životinja (NN 19, 1999.) i prema Vodiču za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, DHHS (NIH) Publ # 86-23).

#### 2.1.2 Reagensi

Fiziološku otopinu (Natrii chloridi infundibile, Pliva d.o.o, Hrvatska) smo koristili za obradu zdrave skupine i simulaciju stresa uzrokovanog obradom.

Isotreonin (13cRA; 13 *cis*-retinoična kiselina) (Accutane<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Švicarska) smo koristili intragastrički (*ig*) u dozi 80 mg kg<sup>-1</sup> u svrhu poticanja osteoporoze. Kapsule isoteronina otopili smo u ulju i koristili u obliku suspenzije.

Alendronat (Alendor<sup>®</sup> 70, Pliva d.o.o., Hrvatska) smo koristili intragastrički kao pozitivnu kontrolu u dozi od 40 mg kg<sup>-1</sup>. Alendronat smo otopili u destiliranoj vodi i koristili u obliku suspenzije.

Proantocijanidin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) smo koristili intragastrički u svrhu terapije osteoporoze u dozi od 100 mg kg<sup>-1</sup>.

Ketamin (Narektan<sup>®</sup>, Vtoquinol AG, Belp Bern, Švicarska) smo koristili kao anestetik tijekom obrade životinja.

## 2.2 Plan pokusa

Prvih 15 dana skupine 1-3 smo obrađivali 13cRA u dozi 80 mg kg<sup>-1</sup>. Narednih 15 dana skupinu 1 smo obrađivali proantocijanidinom u dozi 100 mg kg<sup>-1</sup>, skupinu 2 alendronatom u dozi 40 mg kg<sup>-1</sup>, skupinu 3 s 2 mL fiziološke otopine, a skupine 4, 5 i 6 su zdrave životinje obrađene s proantocijanidinom, alendronatom ili fiziološkom otopinom. Tijekom intragastričke primjene pripravaka, životinje smo anestetizirali ketaminom.

Tablica 1. Plan obrade životinja

Skupina	Obrada 0.-15. dan	Obrada 15.-30. dan
1.	13cRA – 80 mg kg <sup>-1</sup>	Proantocijanidin 100 mg kg <sup>-1</sup>
2.	13cRA - 80 mg kg <sup>-1</sup>	Alendronat 40 mg kg <sup>-1</sup>
3.	13cRA - 80 mg kg <sup>-1</sup>	Fiziološka otopina – 2 mL
4.	-	Proantocijanidin 100 mg kg <sup>-1</sup>
5.	-	Alendronat 40 mg kg <sup>-1</sup>
6.	-	Fiziološka otopina – 2 mL

## 2.3 Metode

### 2.3.1 Praćenje promjene mase životinja

U svrhu procjene toksičnosti korištenih pripravaka, životinje smo vagali na digitalnoj vagi svakih 7 dana. Praćen je gubitak i rast mase životinja. Gubljenje mase životinja je pokazatelj toksičnosti pripravka, a toksičnost je izražena za svaku životinju pomoću formule:

$$\%promjena\ mase = \frac{Masa\ tijekom\ obrade - Početna\ masa}{Masa\ tijekom\ obrade} \times 100$$

### 2.3.2 Uzimanje uzoraka

Nakon zadnje doze obrade svim životinjama smo uzeli serum nakon 24 sata. Serum smo koristili za određivanje parametara aspartat-aminotransferaze, alanin-aminotransferaze, alkalne fosfataze, laktat-dehidrogenaze, ukupnih proteina, glukoze i uree. Uz navedeno, napravili smo i kompletnu diferencijalnu krvnu sliku. Nakon uzimanja seruma, životinje smo žrtvovali i za daljnju obradu smo spremili uzorak krvi, obje bedrene kosti, maternice, jajnike, bubrege i jetra. Kostima smo izmjerili masu, duljinu i promjer. Nakon mjerenja izvadene uzorke smo izvagali i pohranili odvojeno na -20 °C.

### 2.3.3 Mjerenje mase maternice

Nakon što smo izvadili maternicu, očistili smo od masnoće te izvagali na digitalno vagi. Relativnu masu maternice izrazili smo kao masu maternice u gramima u odnosu na 100 grama tjelesne mase štakora (g/100) i izračunali prema formuli:

$$Relativna\ masa\ maternice \left( \frac{g}{100\ g} \right) = \frac{Ukupna\ masa\ maternice}{Završna\ tjelesna\ masa} \times 100$$

### 2.3.4 Mjerenje mineralne gustoće kostiju

Za mjerenje mineralne gustoće kostiju (BMD, *engl. Bone Mineral Density*) lijevih bedrenih kostiju smo koristili denzitometrijsku metodu dvoenergetske rendgenske apsorpciometrije. Analiza je provedena na uređaju Hologic QDR® 4000 (HologicInc., Zaventem, Belgium) s odgovarajućim softverom za male životinje 1.0 visoke razlučivosti prema uputama proizvođača. Za dobivanje vrijednosti BMD trebali smo mjeriti površinu koštanog područja (area – cm<sup>2</sup>) i mineralni sadržaj kostiju (BMC – g, *engl. Bone Mineral*

*Content*). Obje navedene vrijednosti smo mjerili na proksimalnim i distalnim dijelovima vrata bedrenih kostiju (metafize) i iz dobivenih podataka smo izračunali vrijednosti BMD ( $\text{g cm}^{-2}$ ). Koeficijent varijacije (QC, *engl. Coefficient of variation*) za BMD bedrenih kostiju iznosio je 1,15% odnosno 1,1% (0,61%).

### **2.3.5 Udio kalcija i fosfora**

Udio kalcija i fosfora u kostima smo mjerili spaljivanjem desnih bedrenih kostiju. Kosti smo izvadili iz otopine formaldehida i isprali deioniziranom vodom te ostavili da se osuše na filter papiru. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, kosti smo sušili 24 sata u sušioniku (ST 01/02, Instrumentarija, Zagreb) na  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  u porculanskim lončićima. Suhe kosti smo izvagali i potom grijali u mufolnoj peći (Gallenkamp, Engleska). Temperatura u mufolnoj peći smo postepeno dizali do  $450\text{ }^{\circ}\text{C}$  kroz 24 h. Pepeeo nakon spaljivanja u muflon peći smo izvagali i otopljen u 3 mL koncentrirane dušične kiseline ( $\text{HNO}_3$  65% p.a.) te dopunili s 3 mL deionizirane vode. Pripremljene uzorke smo dodatno razorili u visokotlačnom mikrovalnom uređaju UltraCLAVE IV (Milestone, Italija) te nadopunili deioniziranom vodom na određeni volumen. Udio kalcija smo mjerili plamenom tehnikom atomske apsorpcije uz lantan ( $\text{Cl}_3\text{La}$ ) kao modifikator matrice u plamenu mješavine zraka i acetilena na instrumentu SpectrAA-300 (Varian, Australija). Dobivene podatke smo izrazili kao miligrami kalcija po gramu uzorka. Udio fosfora smo mjerili spektrofotometrijski prema modifikaciji metode po Goldenberg i Fernandez (1966). Reakcijom fosfora s molibdatom smo dobili fosfo-molibdat. Uzorcima kostiju smo dodali reducirajući spoj (Mohrova sol s trikloroocetnom kiselinom uz tioureu kao stabilizator), a potom molibdatni reagens (amonijev molibdat otopljen u sumpornoj kiselini). Nakon 20 minuta, dobiveno plavo obojenje (nastali fosfo-molibdat) smo mjerili na spektrometru Cary 50 (Varian, Australija) pri valnoj duljini od 660 nm. Udio fosfora smo izrazili kao miligrami fosfora po gramu uzorka.

### **2.3.6 Hematološka i biokemijska analiza krvi**

Prilikom žrtvovanja životinja, uzeli smo uzorke krvi koje smo pohranili u vacuutainere s heparinom. Na uzorcima smo proveli standardne laboratorijske metode za analizu krvi. Od hematoloških odrednica, odredili smo ukupan broj leukocita, eritrocita i trombocita, vrijednosti hematokrita, koncentracije hemoglobina, prosječnog staničnog volumena eritrocita, prosječne stanične koncentracije hemoglobina te diferencijalnu krvnu sliku. Za analizu krvi i dobivanje

hematoloških odrednica smo koristili automatski hematološki analizator SysmexKX 4500 (Sysmex, Japan).

Od biokemijskih odrednica smo analizirali: aspartat aminotransferazu (AST), alanin aminotransferazu (ALT), alkalnu fosfatazu (ALP), laktat dehidrogenazu (LDH), ureu, ukupne proteine i razinu glukoze u krvi. Za analizu AST i ALT smo koristili UV metodu – supstrat L-aspartat uz piridoksal-fosfat na 37 °C. Za analizu ALP smo koristili kontinuiranu fotometrijsku metodu (p-nitrofenil, AMP pufer, 37 °C). Ureu smo analizirali pomoću enzimatske metode sa ureazom i glutamat dehidrogenazom. Analizu ukupnih proteina smo proveli fotometrijskom metodom s biruet reagensom bez slijepe probe.

### **2.3.7 Određivanje ukupnih proteina po Lowry-ju**

Za određivanje ukupnih proteina smo koristili metodu prema Lowry *i sur* (1951). Metoda se temelji na reakciji bakrovih iona ( $\text{Cu}^{2+}$ ) i peptidnih veza u lužnatom mediju. Vezanjem se  $\text{Cu}^{2+}$  reducira u  $\text{Cu}^+$  te se formira kompleks  $\text{Cu}^+$ -protein. Nakon toga slijedi reakcija bakar-protein kompleksa s Folin reagensom (komercijalni reagens koji sadrži fosfovolframsku i fosfomolibdensku kiselinu) pri čemu nastaje plavo obojenje.

Uzorke jajnika, jetre i bubrega smo homogenizirali na ultrazvučnom homogenizatoru i potom razrijedili fosfatnim puferom (PBS) u masenom omjeru 1:10. Pripremljene uzorke smo centrifugirali 10 minuta na 5000 okr/min. Dobiveni nadtalog smo sačuvali, a talog je odbačen. Neposredno prije provedbe reakcije smo priredili 3 potrebne otopine (A, B i C):

- A) 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 1M NaOH;
- B) 1% natrij kalij tartarat u destiliranoj vodi;
- C) 0,5 %  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  u destiliranoj vodi.

Miješanjem 480 mL otopine A, 10 mL otopine B i 10 mL otopine C smo dobili radnu otopinu D. Komercijalni Folin reagens smo razrijedili destiliranom vodom u omjeru 1:1. 100  $\mu\text{L}$  nadtaloga uzorka i 2 mL radne otopine D smo temeljito promiješali u staklenoj epruveti vorteksiranjem i inkubirali na sobnoj temperaturi. Nakon 10 minuta inkubacije smo dodali 0,2 mL razrijeđenog Folinovog reagensa, ponovno vorteksirali i inkubirali na sobnoj temperaturi narednih 30 minuta. Dobiveni produkt smo prebacili u kivete i mjerili apsorbanciju na spektrofotometru pri valnoj duljini od 600 nm. Količine proteina smo dobili korištenjem baždarnog pravca s otopinama poznatih koncentracija albumina iz govedeg seruma (BSA) i izrazili kao miligram proteina po mililitru ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

### 2.3.8 Mjerenje lipidne peroksidacije

Kao indikator lipidne peroksidacije koristili smo malondialdehid (MDA) koji je završni produkt oksidacije lipida. Za analizu smo koristili modificiranu metodu koju su opisali Ohkawa *i sur.* (1979). Uzorke za mjerenje lipidne peroksidacije smo pripremili isto kao i za mjerenje ukupnih proteina po Lowry-ju. Prethodno smo pripremili reagense koji su se sastojali od: 100  $\mu\text{L}$  SDS (8,1% Na-dodecil sulfat), 750  $\mu\text{L}$  HCl (20%, pH= 3,5) i 750  $\mu\text{L}$  TBA (0,8% tiobarbiturna kiselina). Za lakše otapanje tiobarbiturne kiseline smo koristili vrlo malo (~10-15  $\mu\text{L}$ ) dimetil sulfoksida (DMSO). Smjesu nadtaloga (1 mL) smo temeljito pomiješali vorteksiranjem te proveli reakciju između MDA i tiobarbiturne kiseline u kupelji na 95 °C kroz 1 sat. Nakon završene inkubacije u kupelji, uzorke smo pustili da se ohlade, centrifugirali 15 min na 5000 okr/min i nadtalog prebacili u kivete. Absorbanciju smo mjerili na spektrofotometru pri valnoj duljini od 532 nm. Iz dobivenih absorbancija smo izračunali količinu MDA korištenjem ekstinkcijskog koeficijenta za MDA ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) te prikazali u nanomolima MDA po miligramu proteina ( $\text{nmol mg}^{-1}$  proteina).

### 2.3.9 Mjerenje glutaciona

Uzorke tkiva smo pripremili kao i za mjerenje lipidne peroksidacije homogeniziranjem u PBS i centrifugiranjem (10 min na 5000 okr/min). Dobiveni nadtaloga (100  $\mu\text{L}$ ) smo pomiješali u staklenoj kiveti s 5  $\mu\text{L}$  HCl, 700  $\mu\text{L}$  Na-pufera i 50  $\mu\text{L}$  Ellmanova reagensa (5,5-ditiobis-2-nitrobenzoične kiseline, DTNB). Na-pufer smo priredili miješanjem 0,3 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  i 0,3 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$  (pH=7,4). U reakciji s Ellmanovim reagensom, reducirani glutation (GSH) stvara kromofor – 5-tionitrobenzoničnu kiselinu (TNB) čiju koncentraciju smo pratili spektrofotometrijski na 412 nm. Dobivene rezultate smo izrazili u nanomolima reduciranog GSH po miligramu proteina ( $\text{nmol mg}^{-1}$  proteina).

### 2.3.10 Statistička obrada podataka

Podatke smo iskazali kao srednje vrijednosti (SV)  $\pm$  standardna devijacija (SD).

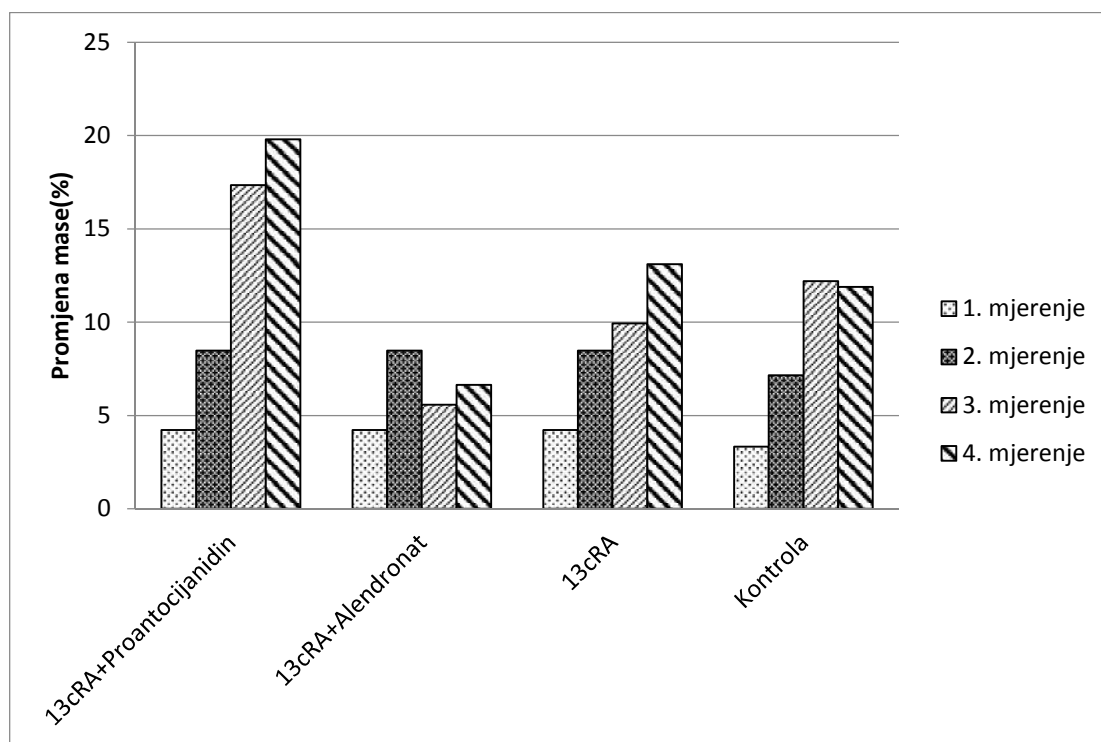
Obradu podataka smo vršili u računalnom programu Microsoft Excel 2013, a za statističku analizu podataka smo koristili statistički program STATISTICA 7.0 (StatSoft, Tulsa, SAD), primjenom analize varijance (ANOVA) i Studentovog *t*-testa. Statistička točnost određena je sa  $P < 0,05$ .

### 3. REZULTATI

Izvršene analize na skupinama koje su primale samo proantocijanidin (skupina 4) ili samo alendronat (skupina 5) (vidi Tablicu 1.) nisu pokazale nikakve statistički značajne razlike i ponašale su se kao zdrava kontrola (skupina 6) te su stoga izostavljene iz daljnjih rezultata.

#### 3.1 Promjena tjelesne mase

Analiza nije pokazala značajnu statističku razliku u promjeni tjelesne mase unutar skupina tijekom obrade. Slika 5. prikazuje promjenu mase svake skupine gdje je vidljiv prirast mase u svim skupinama osim u skupini obrađenoj alendronatom. Proantocijanidini su pokazali najveći prirast mase (19,8%), a alendronat je pokazao negativan utjecaj na porast mase u odnosu na kontrolnu skupinu. Životinje obrađene samo alendronatom ili samo proantocijanidinima su imale vrijednosti kao zdrava kontrola.



Slika 5. Učinak proantocijanida ili alendronata na promjenu tjelesne mase u štakora s osteoprozom izazvanom retinoičnom kiselinom. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10. Mjerenja: 7. dan, 14. dan, 21. dan i 30. dan.

### **.3.2 Fizikalne značajke kostiju štakora**

Mjerene fizikalne značajke kosti su prikazane u Tablici 2. Zapažene su značajno niže vrijednosti u masi femura 1 ( $m_{\text{femur-1}}$ ) i masi femura 2 ( $m_{\text{femur-2}}$ ) kod svih skupina obrađenih retinoičnom kiselinom u odnosu na zdravu kontrolu. Također se vidi i povećanje u masi oba femura kod štakora iz skupine obrađene proantocijanidinima (13cRA+Proantocijanidini) u odnosu na skupinu obrađenu alendronatom (13cRA+Alendronat) i model osteoporoze (13cRA), ali između skupina nema statistički značajne razlike.

Statistički značajna razlika nije zapažena niti u mjerenju lateralno/medijano i posteriorno/anteriorno radijusa femura između skupina.



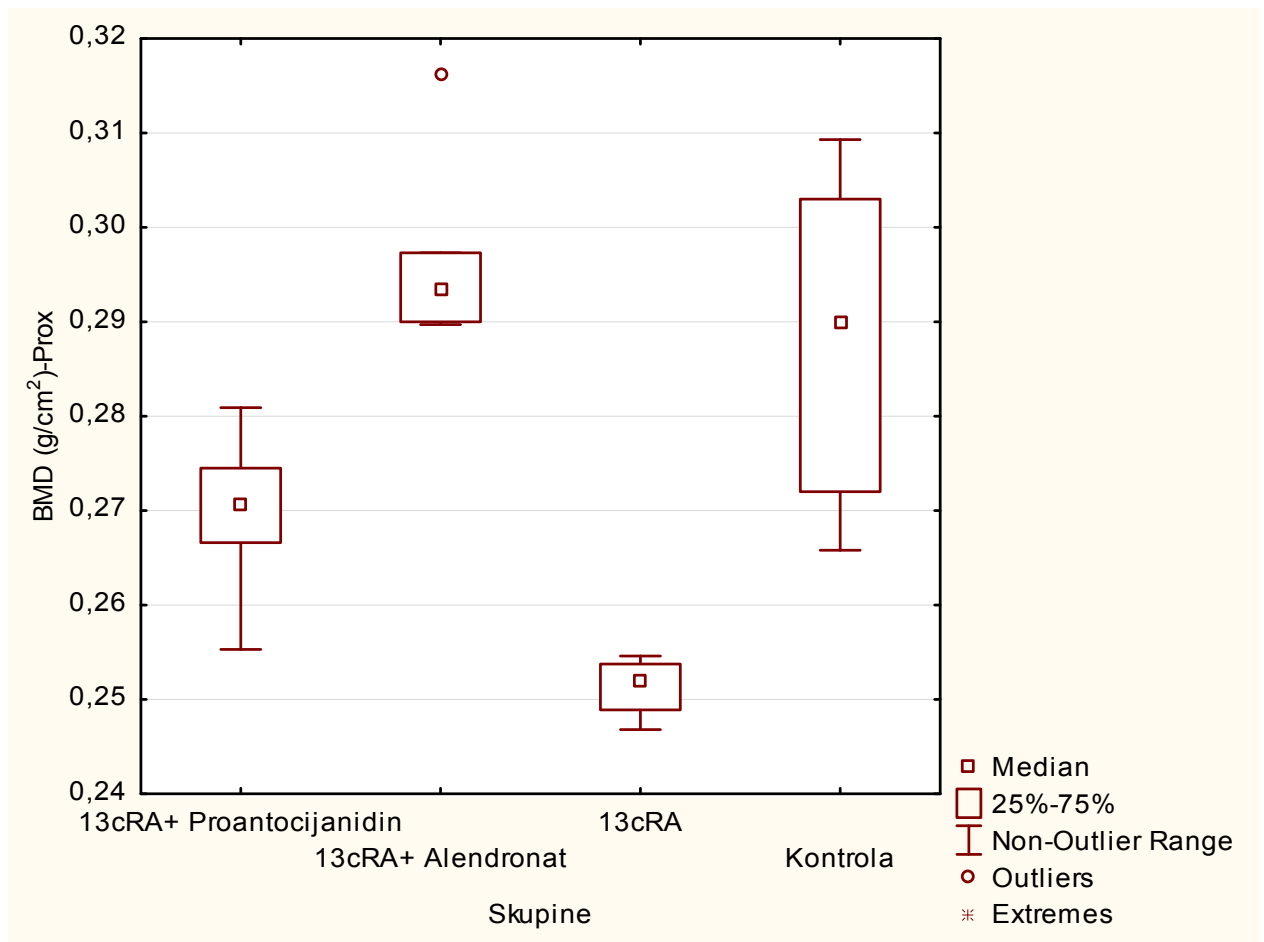
Tablica 2. Učinak proantocijanida i alendronata na fizikalne značajke femura u štakora s osteoporozom izazvanom retinoičnom kiselinom

<b>Obrada<sup>a</sup></b>	<b>m<sub>štakor</sub></b> <b>(g)</b>	<b>Duljina</b> <b>femura (cm)</b>	<b>m<sub>femur-1</sub></b> <b>(mg)</b>	<b>m<sub>femur-2</sub></b> <b>(mg)</b>	<b>R<sub>lat/med</sub></b> <b>(mm)</b>	<b>R<sub>post/ant</sub></b> <b>(mm)</b>
<b>13cRA+Proantocijanidin</b>	172,80±4,55	3,21±0,01	676,88±29,39	655,28±10,41	3,35±0,06	3,00±0,00
<b>13cRA+Alendronat</b>	125,60±14,60	3,28±0,08	651,96±24,06	645,98±17,78	3,45±0,18	3,27±0,27
<b>13cRA</b>	172,20±9,34	3,60±0,29	647,36±23,53	642,23±23,87	3,46±0,15	3,22±0,18
<b>Kontrola</b>	185,50±6,28	3,18±0,03	832,80±43,16	792,70±61,93	3,50±0,10	3,00±0,00

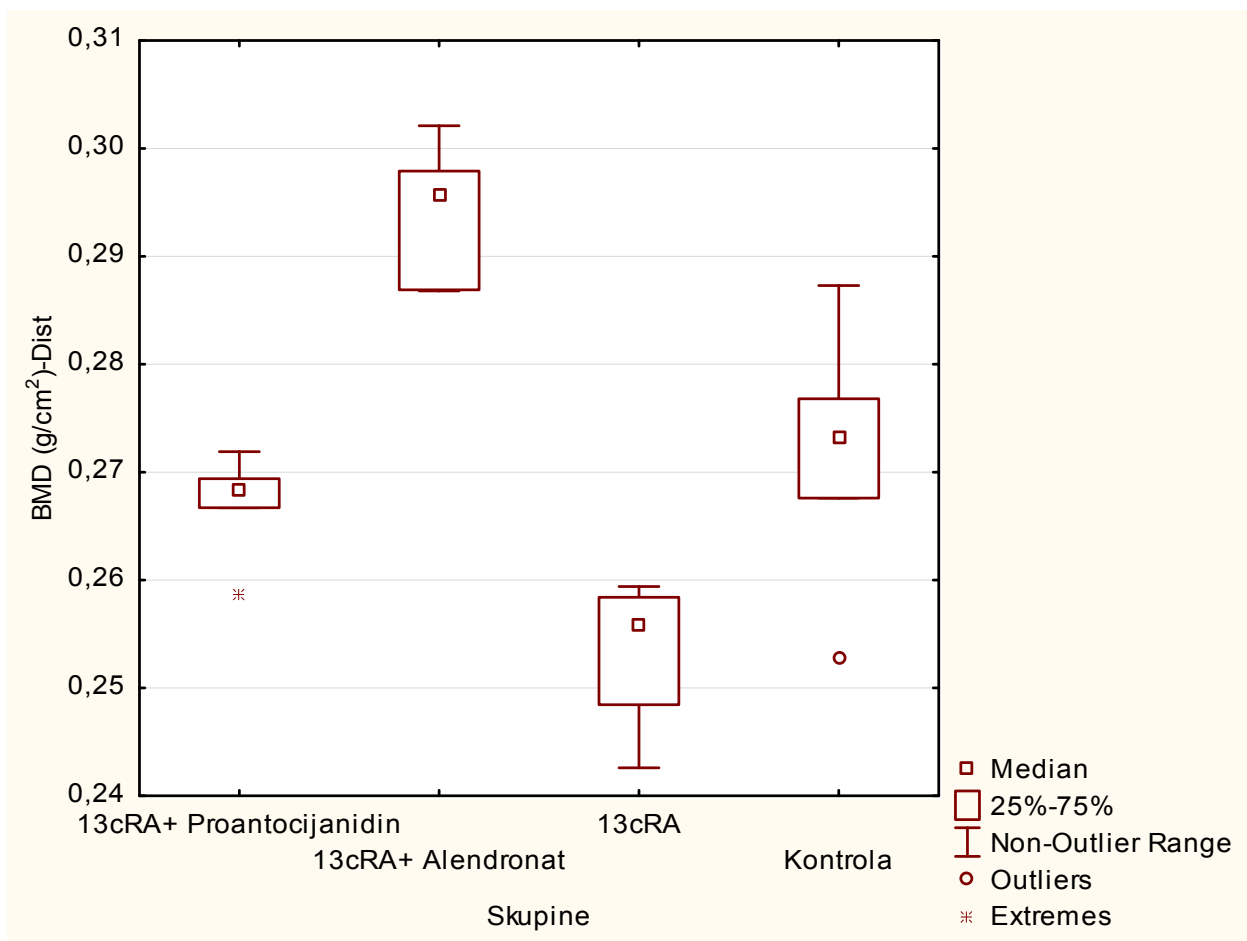
<sup>a</sup>Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10.

### **3.3 Utjecaj proantocijanidina na gustoću kostiju**

Analizom podataka utvrđena je statistički značajna razlika u BMD proksimalnog dijela metafize bedrene kosti između skupine obrađene proantocijanidinom i skupine obrađene alendronatom ( $P < 0,05$ ) kao i između skupine obrađene alendronatom i modela osteoporoze (13cRA,  $P < 0,01$ ) (Slika 6.). U distalnom dijelu metafize nije uočena statistički značajna razlika kod obrada proantocijanidinom i alendronatom, ali je uočena razlike između modela osteoporoze i alendronata ( $P < 0,01$ ) te modela osteoporoze i zdrave kontrole ( $P < 0,05$ ) (Slika 7.).



Slika 6. Učinak proantocijanida i alendronata na mineralnu gustoću proksimalnog dijela metafize bedrene kosti u štakora s osteoprozom izazvanom retinoičnom kiselinom. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporozе s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10. 13cRA vs 13cRA+alendronat ( $P<0,01$ ); 13cRA+alendronat vs 13cRA+proantocijanidin ( $P<0,05$ )



Slika 7. Učinak proantocijanida i alendronata na mineralnu gustoću distalnog dijela metafize bedrene kosti u štakora s osteoprozom izazvanom retinoičnom kiselinom. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10. 13cRA vs kontrola ( $P < 0,05$ ); 13cRA vs 13cRA+alendronat ( $P < 0,01$ )

### 3.4 Vrijednosti koštanog kalcija i fosfora

Rezultati dobiveni analizom udjela kalcija i fosfora su prikazani u Tablici 3. zajedno s indeksom mase femura. Statistička analiza je pokazala statistički značajne razlike ( $P<0,05$ ) u udjelu kalcija i fosfora kod skupine obrađene proantocijanidinima (13cRA+Proantocijanidin), skupine obrađene alendronatom (13cRA+Alendronat) i zdrave kontrole (Kontrola) u usporedbi s modelom osteoporoze (13cRA). Vrijednosti indeksa mase femura prate vrijednosti kalcija i fosfora.

Tablica 3. Učinak proantocijanida ili alendronata na sadržaj kalcija i fosfora i indeks mase bedrene kosti u štakora s osteopozom izazvanom retinoičnom kiselinom.

Obrada <sup>a</sup>	Masa suhog pepela kosti (g)	Ca mg g <sup>-1</sup>	P mg g <sup>-1</sup>	Indeks mase femura
<b>13cRA</b>				
<b>+Proantocijanidin</b>	0,65±0,12	147,20±2,15*	58,80±0,86*	0,392 ± 0,021*
<b>13cRA+ Alendronat</b>	0,65±0,05	136,00±5,17*	61,00±2,30*	0,400 ± 0,021*
<b>13cRA</b>	0,64±0,06	121,00±3,25♦	49,29±2,15♦	0,359 ± 0,023♦
<b>Kontrola</b>	0,7±0,09	134,50±3,59*	57,25±1,25*	0,395 ± 0,052*

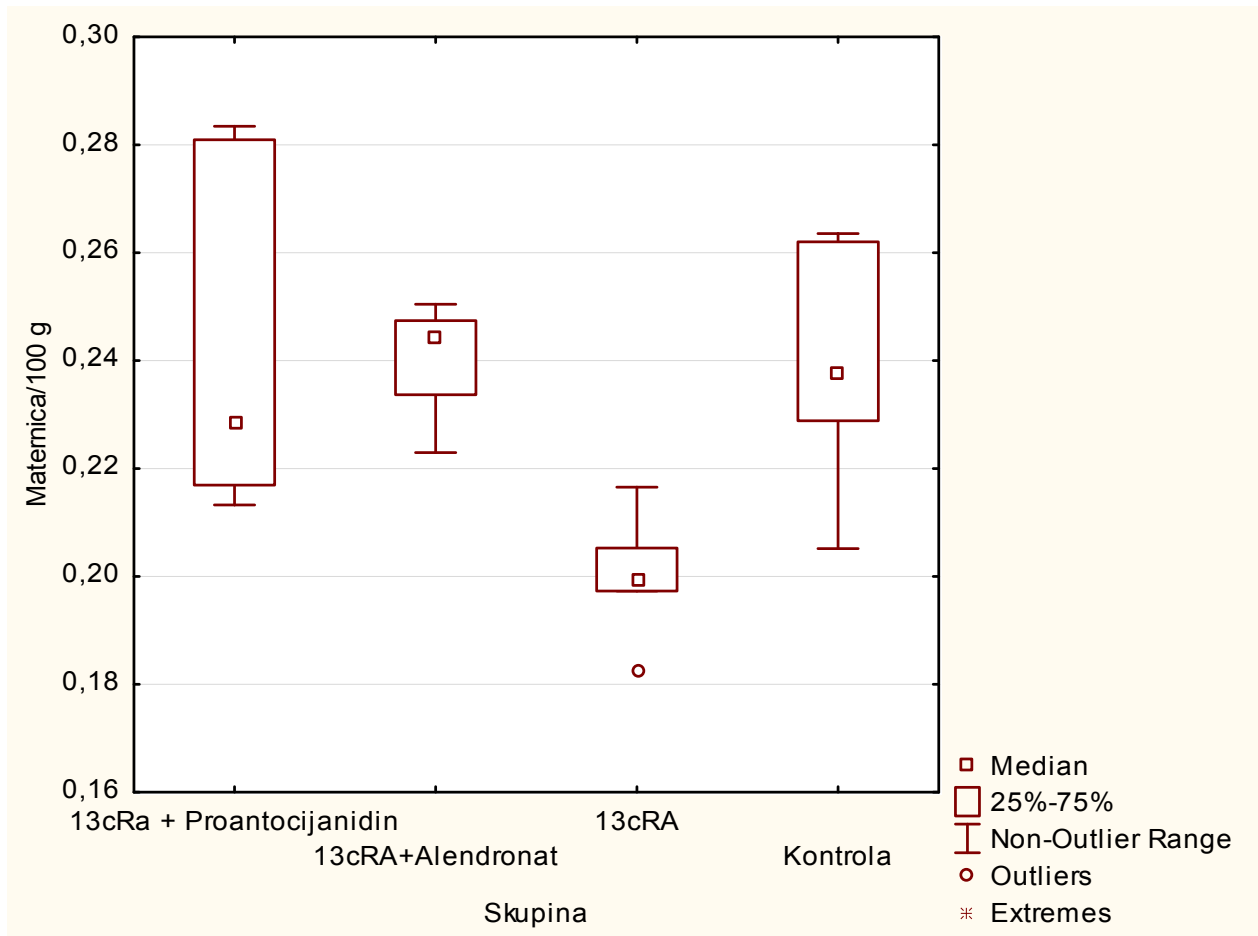
<sup>a</sup>Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10.

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

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

### 3.5 Fitoestrogeni utjecaj proantocijanidina

Analizom relativne mase maternice (Slika 8.) je zapažen porast u relativnoj masi maternice kod skupine obrađene alendronatom (13cRA+Alendronat) i zdrave kontrole (Kontrola) u odnosu na model osteoporoze (13cRA) ali vrijednosti su bile na granici statističke značajnosti ( $P=0,063$ ,  $P=0,065$ ).



Slika 8. Učinak proantocijanida i alendronata na relativnu masu maternice u štakora s osteopozom izazvanom retinoičnom kiselinom. 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<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10.

### 3.6 Relativna masa jetre i bubrega

Analiza relativne mase organa (Tablica 4.) nije pokazala nikakvu statistički značajnu razliku između skupina osim blagog porasta u masi jetre i bubrega kod skupine obrađene proantocijanidinima (13cRA+Proantocijanidini).

Tablica 4. Učinak proantocijanida ili alendronata na relativnu masu jetre i bubrega u štakora s osteoprozom izazvanom retinoičnom kiselinom

Obrada	Relativna masa jetre % <sup>b</sup>		Relativna masa bubrega % <sup>b</sup>	
	Jetra/ 100 g	Medijan	Bubreg/ 100 g	Medijan
<b>13cRA+ Proantocijanidini</b>	3,681±0,082	3,695	0,783±0,023	0,769
<b>13cRA + Alendronat</b>	3,421±0,333	3,323	0,678±0,017	0,694
<b>13cRA</b>	3,322±0,036	3,341	0,689±0,011	0,689
<b>Kontrola</b>	3,410±0,048	3,453	0,6972±0,014	0,689

<sup>a</sup>Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10. Relativna masa organa je izračunata prema formuli: Relativna masa organa (g/100 g) = Ukupna masa organa x 100 / Završna tjelesna masa

### 3.7 Biokemijski pokazatelji u serumu

Rezultati analiziranih biokemijskih pokazatelja su prikazani u Tablici 5. Zapažena je statistički niža vrijednost alkalne fosfataze (ALP) kod skupine obrađene alendronatom (13cRA + Alendronat) u odnosu na model osteoporoze (13cRA,  $P < 0,001$ ) i u odnosu na zdravu kontrolu (Kontrola,  $P < 0,01$ ). Također, postoji statistički značajna razlika ( $P < 0,001$ ) u razini ALP između modela osteoporoze i kontrolne skupine.

Zapažena je i statistički značajna niža vrijednost laktat dehidrogenaze (LDH) u skupini obrađenoj proantocijanidinima (13cRA + Proantocijanidin,  $P < 0,01$ ) i skupini obrađenoj alendronatom ( $P < 0,01$ ) u usporedbi s zdravom kontrolom. Također, postoji statistički značajna razlika između skupine obrađene proantocijanidinima ( $P < 0,01$ ) i skupine obrađene alendronatom ( $P < 0,05$ ) u odnosu na model osteoporoze.

Ostali pokazatelji nisu pokazali značajne statističke razlike.



Tablica 5. Učinak proantocijanida ili alendronata na biokemijske pokazatelje u serumu štakora s osteoprozom izazvanom retinoičnom kiselinom

Obrada <sup>a</sup>	Biokemijski pokazatelji (X±SD)						
	ALP(U L <sup>-1</sup> )	AST(U L <sup>-1</sup> )	ALT(U L <sup>-1</sup> )	LDH(U L <sup>-1</sup> )	TP(g L <sup>-1</sup> )	GLU(mmol L <sup>-1</sup> )	UREA (mmol L <sup>-1</sup> )
<b>13cRA +Proantocijanidin</b>	186,66±10,61	85,16±3,47	46,66±5,12	315,83±43,15 <sup>**♦♦</sup>	56,66±0,71	6,56±0,64	6,01±0,24
<b>13cRA+Alendronat</b>	102,66± 14,14 <sup>***♦♦</sup>	87,66±4,33	42,00 ±1,52	402,00±70,86 <sup>*♦♦</sup>	51,66±2,33	6,23±0,54	6,76±0,21
<b>13cRA</b>	206,3±7,97 <sup>♦♦♦</sup>	89,66±5,54	43,16±1,90	571,83±11,31	56,00±0,57	7,29±0,37	5,65±0,32
<b>Kontrola</b>	168,25±3,91 <sup>***</sup>	89,00±8,15	46,4±4,76	611,00±21,17	53,06±0,67	6,46±0,13	6,26±0,41

**Legenda:** ALP - alkalna fosfataza; AST - aspartat aminotransferaza; ALT - alanin aminotransferaza; LDH - laktat dehidrogenaza; TP- ukupni proteini

<sup>a</sup>Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10.

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

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

### 3.8 Hematološki pokazatelji u krvi

Učinak proantocijanidina ili alendronata na diferencijalnu krvnu sliku štakora s osteoporozom prikazan je u Tablici 6a. Iz rezultata je vidljivo da postoji statistički značajna ( $P<0,05$ ) razlika u % limfocita i neutrofila u skupini obrađenoj alendronatom (13cRA+Alendronat) u odnosu na zdravu kontrolu.

Rezultati analiziranih hematoloških pokazatelja prikazani su u Tablici 6b. Jedina statistički značajna razlika zapažena je u broju leukocita (L). U odnosu na zdravu kontrolu (Kontrola), broj leukocita je povišen u ostalim skupinama (13cRA, 13cRA+Alendronat, 13cRA+Proantocijanidin,  $P<0,05$ ). Također, zapažena je statistički viša vrijednost leukocita u skupini obrađenoj proantocijanidinima (13cRA + Proantocijanidin,  $P<0,05$ ) u odnosu na model osteoporoze (13cRA).

Tablica 6a. Učinak proantocijanidina na diferencijalnu krvnu sliku štakora s osteoporozom izazvanom retinoičnom kiselinom

Obrada <sup>a</sup>	Eozinofilni granulociti %	Bazofilni granulociti %	Neutrofilni granulociti %	Limfociti %	Monociti %
<b>13cRA+ Proantocijanidin</b>	0,717±0,25	0,667±0,33	24,4±4,89	73,9±4,81	0,35±0,12
<b>13cRA+ Alendronat</b>	0,5±0,1	1,13±0,51	25,47±0,11 <sup>♦</sup>	72±0,46 <sup>♦</sup>	0,767±0,058
<b>13cRA</b>	0,733±0,36	0,55±0,18	17,48±6,69	80,77±6,52	0,45±0,16
<b>Kontrola</b>	0,85±0,66	0,425±0,21	13,25±3,79	85,1±4,44	0,425±0,27

<sup>a</sup>Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10.

<sup>♦</sup> Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu ( $^*P<0,05$ )

Tablica 6b. Učinak proantocijanida ili alendronata na hematološke pokazatelje u krvi štakora s osteoprozom izazvanom retinoičnom kiselinom

Obrada <sup>a</sup>	Hematološki pokazatelji (X±SD)							
	L (10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	E (10 <sup>12</sup> L <sup>-1</sup> )	Hgb (g L <sup>-1</sup> )	Hct	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g L <sup>-1</sup> )	Plt (10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )
<b>13cRA+ Proantocijanidin</b>	5,35±0,55 <sup>♦*</sup>	6,74±0,14	133,33±2,51	0,40±0,007	60,03±0,67	19,8±0,16	330±2,36	752,00±28,99
<b>13cRA + Alendronat</b>	4,7±0,43 <sup>♦</sup>	6,57±0,20	127,8±3,78	0,38±0,007	58,86±0,71	19,26±0,13	328,±3,46	749,33±16,29
<b>13cRA</b>	3,88±0,46 <sup>♦</sup>	6,88±0,12	132,33±2,07	0,40±0,005	56,75±1,41	19,23±0,12	329,16±2,30	722,00±22,61
<b>Kontrola</b>	2,7±0,59 <sup>*</sup>	7,29±0,23	145,4±6,49	0,44±0,01	60,1±0,78	19,96±0,45	332,5±4,65	729,25±38,55

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

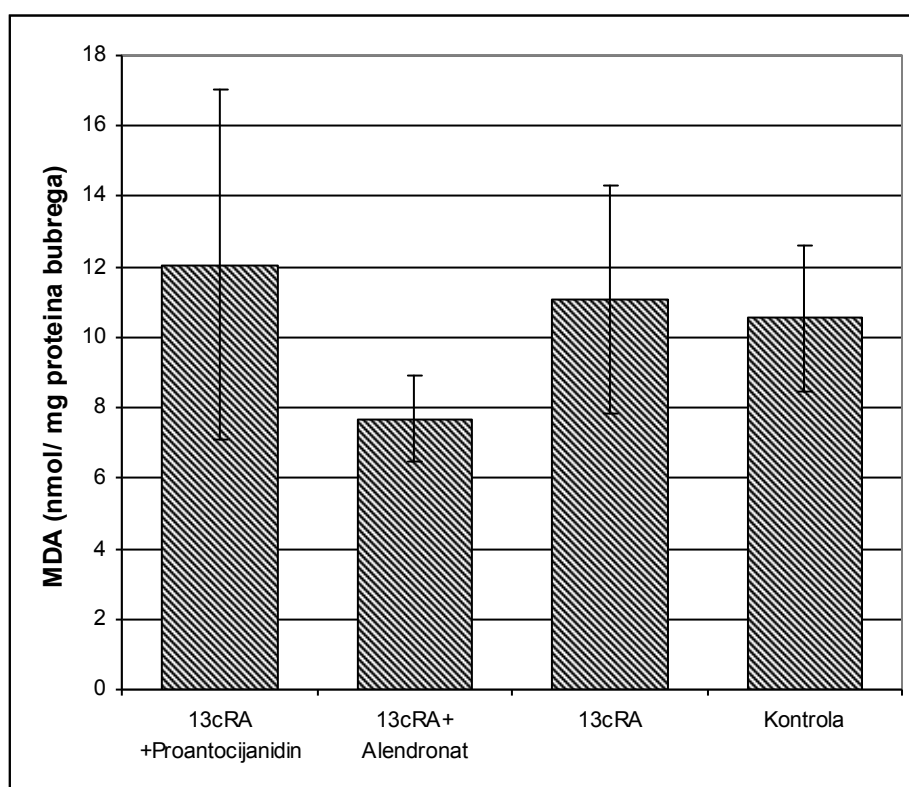
<sup>a</sup>Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10.

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

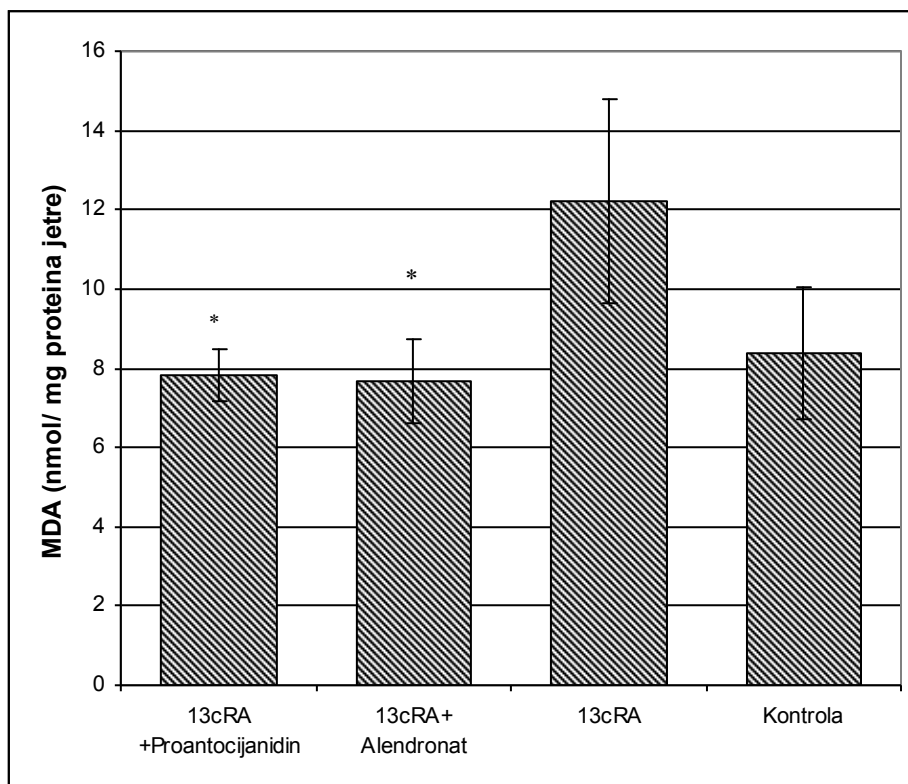
♦ Statistički značajno različito u odnosu na kontrolu (♦*P*<0,05).

### 3.9 Vrijednosti lipidne peroksidacije bubrega, jetre i jajnika

Analizom podataka zapažena je snižena koncentracija malondialdehida (MDA) u bubrezima kod skupine obrađene alendronatom (13cRA+ Alendronat) u odnosu na ostale skupine, dok su vrijednosti MDA između ostalih skupina podjednake (Slika 9.). U jetri (Slika 10.) obrađenih životinja zapažena je povećana vrijednost MDA kod modela osteoporoze (13cRA) u odnosu na skupine obrađene alendronatom i proantocijanidinom ( $P<0,05$ ). Analizom koncentracije MDA u jajniku zapažena je statistički niža vrijednost kod skupine obrađene proantocijanidinom u odnosu na model osteoporoze ( $P<0,05$ ), dok su vrijednosti MDA za skupinu obrađenu alendronatom i model osteoporoze pokazale statistički višu ( $P<0,01$ ) vrijednost u odnosu na zdravu kontrolu (Slika 11.).

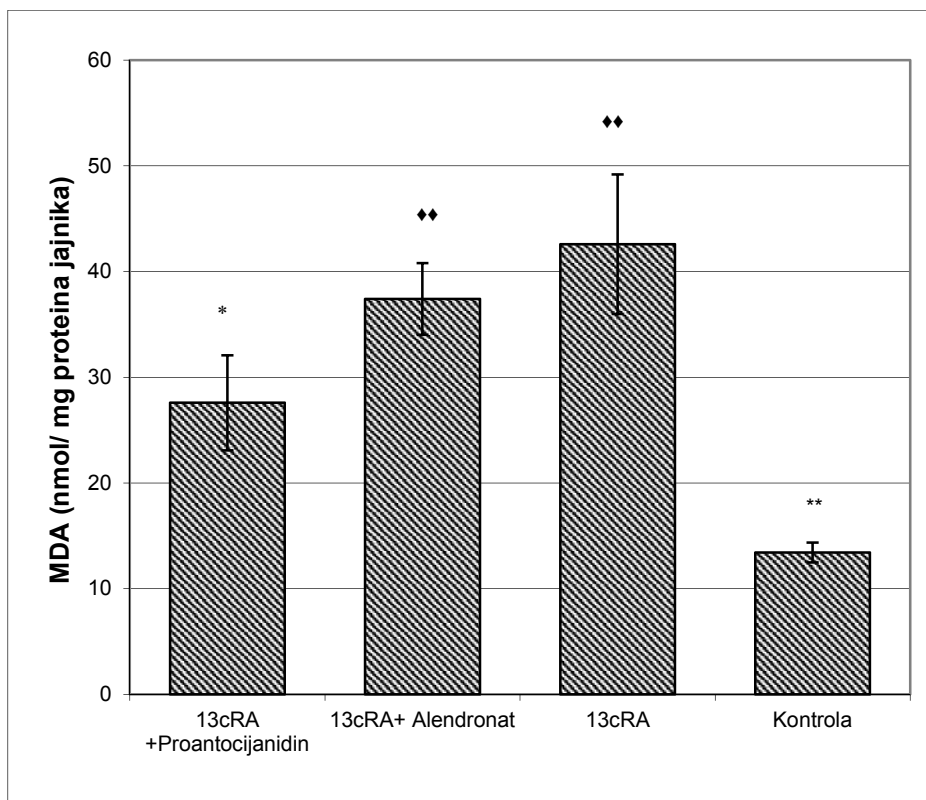


Slika 9. Učinak proantocijanida ili alendronata na koncentraciju malondialdehida (MDA) u bubregu štakora s osteopozom izazvanom retinoičnom kiselinom. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10.



Slika 10. Učinak proantocijanida ili alendronata na koncentraciju malondialdehida (MDA) u jetri štakora s osteoprozom izazvanom retinoičnom kiselinom. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA ( $80 \text{ mg kg}^{-1}$ ) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ili alendronatom ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10.

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



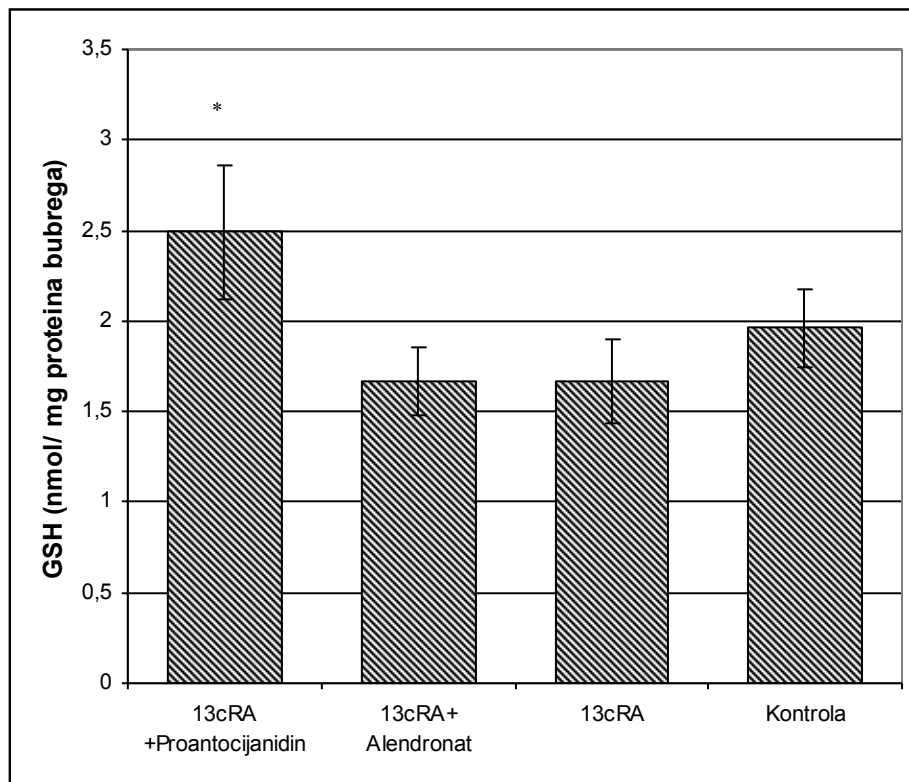
Slika 11. Učinak proantocijanida ili alendronata na koncentraciju malondialdehida (MDA) u jajnicima štakora s osteoprozom izazvanom retinoičnom kiselinom. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10.

\* Statistički značajno različito u odnosu na 13cRA (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ).

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

### 3.10 Vrijednosti ukupnog glutationa bubrega, jetre i jajnika

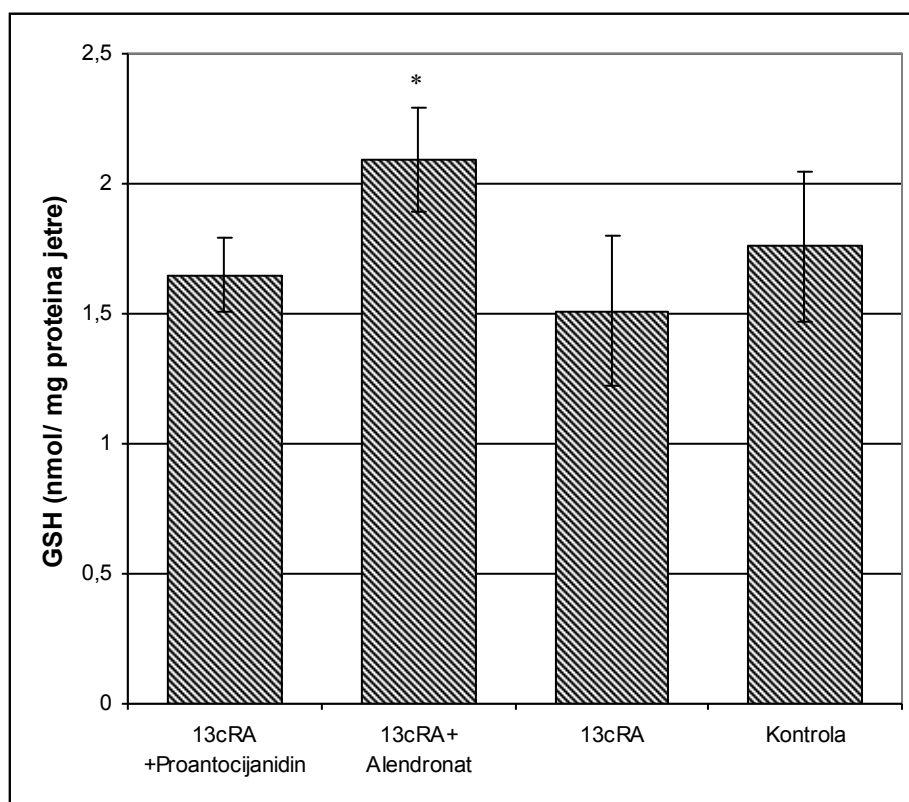
Analizom podataka koncentracije glutationa (GSH) u bubrezima obrađenih životinja zapažena je povećana vrijednost GSH kod skupine obrađene proantocijanidinima (13cRA+ Proantocijanidin) u odnosu na ostale skupine (13cRA+ Alendronat, 13cRA, kontrola) (Slika 12.). Podatci dobiveni analizom jetre pokazuju višu ( $P<0,05$ ) koncentraciju GSH kod skupine obrađene alendronatom u odnosu na model osteoporoze (Slika 13.) Analizom jajnika zapažene su niže vrijednosti GSH u modelu osteoporoze i skupini obrađenoj alendronatom ( $P<0,01$ ) dok je vrijednost GSH u jajniku kod skupine obrađene proantocijanidinom bila značajno viša ( $P<0,01$ ) u odnosu na model osteoporoze (Slika 14.).



Slika 12. Učinak proantocijanida ili alendronata na koncentraciju glutationa (GSH) u bubregu štakora s osteopozom izazvanom retinoičnom kiselinom. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana.

Broj životinja po skupini: 7-10.

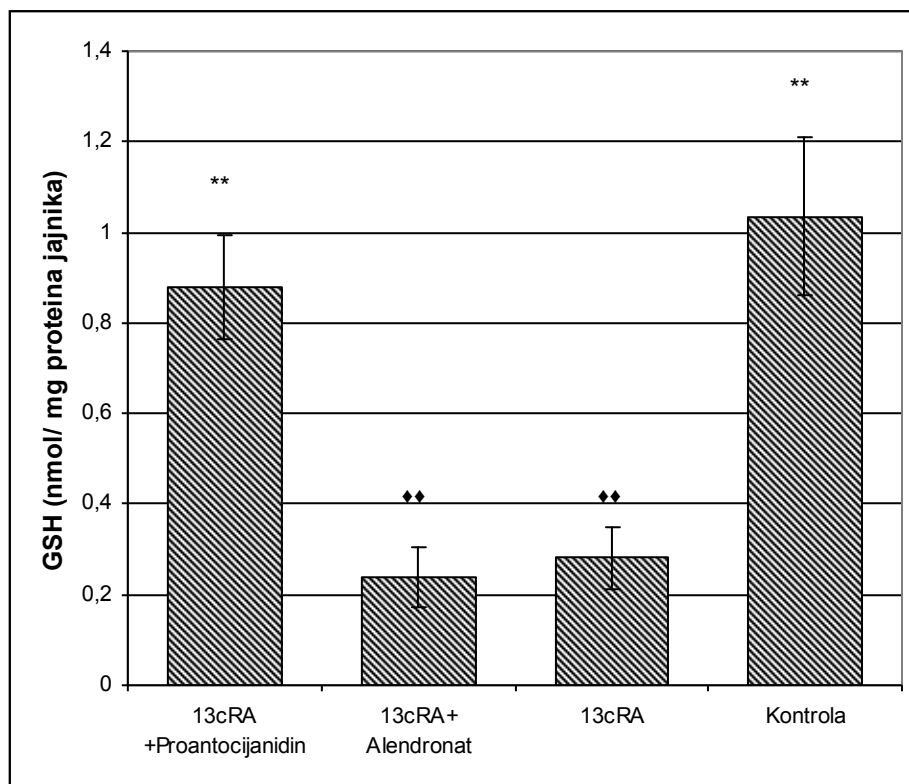
\* Statistički značajno različito u odnosu na 13cRA ( $*P<0,05$ ).



Slika 13. Učinak proantocijanida ili alendronata na koncentraciju glutationa (GSH) u jetri štakora s osteoprozom izazvanom retinoičnom kiselinom. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10.

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





Slika 14. Učinak proantocijanida ili alendronata na koncentraciju glutationa (GSH) u jajniku štakora s osteoprozom izazvanom retinoičnom kiselinom. Štakori su obrađeni *ig* s 13cRA (80 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Nakon izazivanja osteoporoze s 13cRA štakori su obrađeni *ig* s proantocijanidinom (100 mg kg<sup>-1</sup>) ili alendronatom (40 mg kg<sup>-1</sup>) jednom dnevno tijekom 15 dana. Broj životinja po skupini: 7-10.

\* Statistički značajno različito u odnosu na 13cRA (\*\* $P < 0,01$ ).

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

#### 4. RASPRAVA

U radu smo pokazali rezultate istraživanja koje smo proveli na životinjskom modelu osteoporoze uzrokovane primjenom retinoične kiseline u svrhu procjene učinkovitosti proantocijanidina na liječenje osteoporoze. Antiupalna, fitoestrogena i antioksidativna svojstva proantocijanidina smo istražili kroz više različitih metoda. Proveli smo mjerenja mineralne gustoće kostiju, dužine i promjera bedrene kosti, vrijednosti kalcija i fosfora u bedrenim kostima u svrhu procjene antiosteoporotskih svojstava proantocijanidina u odnosu na svojstva alendronata. Fitoestrogenska svojstva proantocijanidina pokazali smo usporedbom relativnih masa maternica. Za procjenu antiupalne učinkovitosti proantocijanidina koristili smo sljedeće metode: mjerenje relativne mase jetre i bubrega, biokemijske pokazatelje u serumu i hematološke pokazatelje u krvi. Analizom razine lipidne peroksidacije i ukupne koncentracije glutaciona u jetri, bubregu i jajnicima smo pokazali antioksidativna svojstva proantocijanidina.

Brojni podaci pokazuju da povećana razina slobodnih radikala (ROS) može dovesti do gubitka koštane mase, upale i gubitka strukture kostiju što kosti čini lako lomljivima te rezultira nastajanjem osteoporoze (Fahmy i Soliman, 2009; Hamada *i sur*, 2009; Oršolić *i sur*, 2014; Sánchez-Rodríguez *i sur*, 2007). Organizmi posjeduju prirodne antioksidativne mehanizme i njihova aktivnost održava fiziološke koncentracije reaktivnih radikala. U slučaju povećane proizvodnje slobodnih radikala ili izostanka antioksidativnih mehanizama dolazi do povećanja koncentracije radikala u organizmu koji su vrlo reaktivni i sposobni direktno ili indirektno oštetiti sve vrste biomolekula (Sánchez-Rodríguez *i sur*, 2007; Hamada *i sur*, 2009; Oršolić *i sur*, 2014).

Utvrđena je jasna poveznica između oksidativnog stresa (OS) i osteoporoze. ROS smanjuju diferencijaciju osteoblasta i povećavaju osteoklastičnu aktivnost (Mackinnon *i sur*, 2011; Nieves, 2013; Sheweita i Khoshhal, 2007; Zhang *i sur*, 2013). Tako nedostatan antioksidativni sustav tj. loša neutralizacija ROS-a doprinosi patogenezi osteoporoze, a antioksidansi mogu smanjiti resorpciju kosti (Oršolić *i sur*, 2014).

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 primjerice glukokortikoidi, antikonvulzivi, antiepileptici, inhibitori protonske pumpe, retinoidi i dr. (Davidge Pitts i Kearns, 2011).

Dokazano je kako intragastrična primjena visokih doza 13-cis retinoične kiseline (13cRA) u kratkom vremenskom razdoblju od 1-3 tjedna uspješno inducira osteoporozu 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 Soliman, 2009). Smatra se kako 13cRA uzrokuje OS i stvaranje ROS-a koji potiskuju osteoblastičnu aktivnost a povećavaju aktivnost osteoklasta, što ako prevlada prirodne antioksidativne mehanizme može dovesti do opsežnog gubitka koštane mase. 13cRA ima i druge mehanizme djelovanja na koštani metabolizam. Utvrđeno je djelovanje na smanjenje razine estrogena, što dovodi do pojave upalnih citokina koji potiču osteoklastičnu aktivnost, a osteoblaste uvode u apoptozu. Također, 13cRA smanjuje aktivnost vitamin D receptora što smanjuje apsorpciju kalcija u crijevima, djeluje na izlučivanje kalcija bubrezima i na lučenje paratiroidnog hormona (Fahmy i Soliman, 2009).

Sličnosti u patofiziološkom odgovoru koštanog sustava u ljudi i štakora u sposobnosti indukcije koštanog gubitka u kratkom vremenskom razdoblju čini model osteoporoze u štakora vrijednim i prihvatljivim predkliničkim modelom. Temeljem navedenog 13cRA je idealan model za proučavanje antioksidativnih, antiupalnih, fitoestrogenskih i regenerativnih značajki proantocijanidina na osteoblaste i inhibiciju osteoklasta.

Naši rezultati ukazuju da proantocijanidin utječe pozitivno na prirast mase životinja; promjena mase se kretala do 19,8% dok je alendronat pokazao smanjeni prirast mase od svega 8,47% u odnosu na ostale grupe (Slika 5.).

Nadalje, mineralna gustoća kostiju (BMD) u proksimalnim i distalnim dijelovima metafize bedrene kosti je podjednaka između skupina obrađenih proantocijanidinom i alendronatom ali značajno viša u odnosu na onu kod štakora s osteoporozom (Slika 6. i Slika 7.). Model štakora sa osteoporozom pokazuje smanjene vrijednosti BMD što je u skladu s prijašnjim istraživanjima utjecaja retinoične kiseline na koštani sustav (Wei *i sur*, 2007). Učinkovitost proantocijanida na BMD ukazuje da hrana bogata proantocijanidinima može biti jednako učinkovita kao i alendronat u smanjenju gubitka gustoće kostiju u osteoporozu. Navedene podatke potvrđuju i vrijednosti koštanog kalcija i fosfora koje pokazuju isti trend kao i rezultati mineralne gustoće kostiju. Obrada životinja s 13cRA (model osteoporoze) pokazuje značajno niže vrijednosti koštanog kalcija i fosfora u odnosu na zdravu kontrolu (Tablica 3.)

Temeljem da su razina kalcija i fosfora te BMD glavni dijagnostički pokazatelji osteoporoze (Lieberman *i sur*, 1996), naši rezultati potvrđuju antiosteoporotsku aktivnost proantocijanidina.

Hematološka analiza pokazala je povišene vrijednosti leukocita za sve skupine u odnosu na zdravu kontrolu (Tablica 6b.). Analizom diferencijalne krvne slike broj neutrofila je povišen u svim skupinama obrađenim s 13cRA dok statistički značajna razlika postoji u postotku neutrofila i limfocita samo u skupini obrađenoj s alendronatom u odnosu na zdravu kontrolu, što ukazuje na moguću upalnu reakciju. Proantocijanidini se smatraju pozitivnim stimulatorima imunskog sustava i antiupalnim spojevima (Huang *i sur*, 2013) što je u skladu s našim rezultatima. Također, relativne mase bubrega i jetre (Tablica 4.) nisu pokazale statistički značajne razlike što ukazuje da nije došlo do nakupljanja tekućine u organima i procesa upale. Biokemijski pokazatelji u serumu su pokazali niže vrijednosti alkalne fosfataze (ALP) i laktat dehidrogenaze (LDH) kod skupine obrađene alendronatom dok je LDH vrijednost bila niža kod skupine obrađene proantocijanidinom (Tablica 5.) što ukazuje na antiupalni učinak navedenih pripravaka.

Flavonoidi, uključujući i proantocijanidine, su u zadnjem desetljeću intenzivno istraživani zbog svojih antioksidativnih svojstava (Olas *i sur*, 2010; Ciocoiu *i sur*, 2013; Bagchi *i sur*, 2014; Oršolić *i sur*, 2014; Singh *i sur*, 2014; Yokozawa *i sur*, 2014; An *i sur*, 2015; Oikeh *i sur*, 2016). Zbog svoje lake dostupnosti i prisutnosti u većini biljaka i biljnih produkata, proantocijanidini i flavonoidi, su idealni dodaci prehrani ili potencijalni lijekovi. Antioksidativnu učinkovitost proantocijanida pokazana je smanjenom koncentracijom malondialdehida (MDA), biljega oksidativnog oštećenja lipida, u jetri (Slika 10.) i jajniku (Slika 11.) u odnosu na štakore sa osteoporozom. Ove vrijednosti se podudaraju s vrijednostima glutationa (GSH), glavnog staničnog antioksidativnog peptida, u bubregu (Slika 12.) i jajniku (Slika 14.) kod skupine obrađene proantocijanidinima u odnosu na obradu životinja s 13cRA. Prema Fahmy i Soliman (2009) jedan od mehanizama djelovanja 13cRA na povećanje resorpcije koštanog tkiva je kroz povećanje OS u organizmu. Povećanje razine OS je jedan od uzroka smanjene estrogenske aktivnosti u organizmu; smanjena estrogenska aktivnost izaziva gubitak koštane mase kroz povećanje osteoklastične i inhibiciju osteoblastične aktivnosti u primarnoj osteoporozi. Retinoična kiselina smanjuje razinu estrogena u krvi (Muthusami *i sur*, 2005) te vodi smanjenju mase maternice (Slika 8.). Budući da proantocijanidini povećavaju masu maternice, smatramo da potiču estrogensku aktivnost ili djeluju na receptor estrogena. Ovoj fitoestrogenskoj aktivnosti doprinose i antioksidativna svojstva proantocijanida kroz smanjenu razinu MDA u jajnicima.

Iz svih navedenih činjenica, možemo zaključiti da primjena proantocijanidina ima pozitivan utjecaj na organizam zahvaćen osteoporozom kroz smanjenje gubitka mineralne gustoće kostiju, povećavanje zadržavanja kalcija i fosfora u kostima, smanjenje oksidativnog stresa i povećanje sinteze i koncentracije glutaciona glavnog antioksidativnog peptida u organizmu. Povećanje antioksidativne sposobnosti posljedično vodi povećanju aktivnosti osteoblasta i estrogenske aktivnosti te inhibiciji osteoklasta. Alendronat je pokazao negativan utjecaj na prirast tjelesne mase tijekom istraživanja što je potencijalni pokazatelj moguće toksičnosti dok proantocijanidini nisu pokazali nikakve znakove toksičnosti. Nadalje, zbog svoje lake dostupnosti i jednostavne primjene, proantocijanidini imaju prednost nad alendronatom te bi mogli služiti kao alternativa alendronatu u terapiji osteoporoze.

## 5. ZAKLJUČAK

U skladu s dobivenim rezultatima i analizom utjecaja proantocijanidina na terapiju osteoporoze možemo zaključiti:

- Proantocijanidin je djelovao na povećanje prirasta tjelesne mase štakora tijekom istraživanja.
- Proantocijanidin je imao pozitivan utjecaj na vrijednosti mineralne gustoće proksimalnog i distalnog dijela metafize bedrene kosti kao i na cjelokupnu masu kosti kod štakora s obrađenih proantocijanidinom u odnosu na model štakora sa osteoporozom.
- Proantocijanidin je pozitivno utjecao na udio kalcija i fosfora u bedrenim kostima, vrijednosti kalcija i fosfora su bile značajno više u odnosu na model štakora sa osteoporozom osteoporoze.
- Proantocijanidin je utjecao na povećanje broja leukocita u krvi kod štakora obrađenih proantocijanidinom što pokazuje njegov imunostimulacijski utjecaj.
- Vrijednosti laktat dehidrogenaze u krvi su niže kod skupine sa osteoporozom obrađenom proantocijanidinom što pokazuje manje oštećenje organizma u odnosu na model štakora sa osteoporozom.
- Proantocijanidin je utjecao na smanje razine oksidativnog oštećenja u jetri i jajniku kod štakora koji su obrađeni s proantocijanidinom u odnosu na mode štakora sa osteoporozom što posljedično vodi povećanju njegove fitoestrogenske aktivnosti.
- Antioksidativna svojstva proantocijanidina potvrđena su povećanom koncentracijom glutationa u bubregu i jajniku.
- Proantocijanidin ima pozitivan utjecaj na organizam u stanju osteoporoze.
- Nedostatak toksičnosti i laka dostupnost proantocijanidina su prednost nad alendronatom.

## 6. LITERATURA

- Al-Anazi AF, Qureshi VF, Javaid K, Qureshi S (2011). Preventive effects of phytoestrogens against postmenopausal osteoporosis as compared to the available therapeutic choices: An overview. *J Nat Sci Biol Med* **2**: 154–63.
- An F, Cao X, Qu H, Wang S (2015). Attenuation of oxidative stress of erythrocytes by the plant-derived flavonoids vitexin and apigenin. *Pharmazie* **70**: 724–32.
- Apetz N, Munch G, Govindaraghavan S, Gyengesi E (2014). Natural compounds and plant extracts as therapeutics against chronic inflammation in Alzheimer's disease--a translational perspective. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **13**: 1175–91.
- Bagchi D, Swaroop A, Preuss HG, Bagchi M (2014). Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: an overview. *Mutat Res* **768**: 69–73.
- Bouillon R, Cromphaut S Van, Carmeliet G (2003). Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. *J Cell Biochem* **88**: 332–339.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* **423**: 337–42.
- Capulli M, Paone R, Rucci N (2014). Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* **561**: 3–12.
- Ciocioiu M, Badescu L, Miron A, Badescu M (2013). The involvement of a polyphenol-rich extract of black chokeberry in oxidative stress on experimental arterial hypertension. *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**: 912769.
- Cortet B, Blotman F, Debiais F, Huas D, Mercier F, Rousseaux C, *i sur* (2013). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *NIH Consens Statement* **17**: 1–45.
- Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W (2015). Today's oxidative stress markers. *Med Pr* **66**: 393–405.
- Davidge Pitts CJ, Kearns AE (2011). Update on medications with adverse skeletal effects. *Mayo Clin Proc* **86**: 338–43; quiz 343.

- Fahmy SR, Soliman AM (2009). Oxidative Stress as a Risk Factor of Osteoporotic Model Induced by Vitamin A in Rats. *Aust J Basic Appl Sci* **3**: .
- Ferreira D, Li XC (2000). Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. *Nat Prod Rep* **17**: 193–212.
- Fitzpatrick LA (2002). Secondary causes of osteoporosis. *Mayo Clin Proc* **77**: 453–68.
- Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* **2015**: 421746.
- Goldenberg H, Fernandez A (1966). Simplified method for the estimation of inorganic phosphorus in body fluids. *Clin Chem* **12**: 871–82.
- Gonzalez-Abuin N, Pinent M, Casanova-Martí A, Arola L, Blay M, Ardevol A (2015). Procyanidins and their healthy protective effects against type 2 diabetes. *Curr Med Chem* **22**: 39–50.
- Hamada Y, Fujii H, Fukagawa M (2009). Role of oxidative stress in diabetic bone disorder. *Bone* **45 Suppl 1**: S35–8.
- Horáková Ľ (2011). Flavonoids in prevention of diseases with respect to modulation of Ca-pump function. *Interdiscip Toxicol* **4**: 114–124.
- Huang G-C, Lee C-J, Wang K-T, Weng B-C, Chien T-Y, Tseng S-H, *i sur* (2013). Immunomodulatory effects of Hedysarum polybotrys extract in mice macrophages, splenocytes and leucopenia. *Molecules* **18**: 14862–75.
- Johansson S, Lind PM, Hakansson H, Oxlund H, Orberg J, Melhus H (2002). Subclinical hypervitaminosis A causes fragile bones in rats. *Bone* **31**: 685–9.
- Katagiri T, Takahashi N (2002). Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* **8**: 147–59.
- Kazazić SP (2004). Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol* **55**: 279–290.
- Liberman U a., Weiss SR, Broll J, Minne HW, Quan H, Bell NH, *i sur* (1996). Effect of Oral Alendronate on Bone Mineral Density and the Incidence of Fractures in Postmenopausal Osteoporosis. *Obstet Gynecol Surv* **51**: 238–241.



- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265–75.
- Mackinnon ES, Rao A V, 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**: 1091–101.
- Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* **86**: 271–8.
- Mishima S, Suzuki K-M, Isohama Y, Kuratsu N, Araki Y, Inoue M, *i sur* (2005). Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* **101**: 215–20.
- Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, Vasudevan G, Prabhu V, Subramaniam V, *i sur* (2005). Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clin Chim Acta* **360**: 81–6.
- Nanashima N, Horie K, Tomisawa T, Chiba M, Nakano M, Fujita T, *i sur* (2015). Phytoestrogenic activity of blackcurrant (*Ribes nigrum*) anthocyanins is mediated through estrogen receptor alpha. *Mol Nutr Food Res* doi:10.1002/mnfr.201500479.
- Narita Y, Nomura J, Ohta S, Inoh Y, Suzuki K-M, Araki Y, *i sur* (2006). Royal jelly stimulates bone formation: physiologic and nutrigenomic studies with mice and cell lines. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 2508–14.
- Nieves JW (2013). Skeletal effects of nutrients and nutraceuticals, beyond calcium and vitamin D. *Osteoporos Int* **24**: 771–86.
- Oheim R, Schinke T, Amling M, Pogoda P (2016). Can we induce osteoporosis in animals comparable to the human situation? *Injury* **47 Suppl 1**: S3–9.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**: 351–8.
- Oikeh EI, Omoregie ES, Oviasogie FE, Oriakhi K (2016). Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. *Food Sci Nutr* **4**: 103–9.

- Olas B, Kedzierska M, Wachowicz B, Stochmal A, Oleszek W (2010). Effects of polyphenol-rich extract from berries of *Aronia melanocarpa* on the markers of oxidative stress and blood platelet activation. *Platelets* **21**: 274–81.
- Oršolić N, Goluža E, Dikić D, Lisičić D, Sašilo K, Rođak E, *i sur* (2014). Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contents in the retinoic acid-induced bone loss model of rat. *Eur J Nutr* **53**: 1217–27.
- Payne BAI, Chinnery PF (2015). Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1847**: 1347–1353.
- Ramalho SA, Gualberto NC, Neta MTSL, Batista RA, Araújo SM, Moreira J de J da S, *i sur* (2014). Catechin and Epicatechin Contents in Wines Obtained from Brazilian Exotic Tropical Fruits. *Food Nutr Sci* **05**: 449–457.
- Rousselle A-V, Heymann D (2002). Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone* **30**: 533–540.
- Sánchez-Rodríguez M a, Ruiz-Ramos M, Correa-Muñoz E, Mendoza-Núñez VM (2007). Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly Mexicans as characterized by antioxidant enzymes. *BMC Musculoskelet Disord* **8**: 124.
- Sheweita SA, Khoshhal KI (2007). Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* **8**: 519–25.
- Sies H (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* **69**: 965–8.
- Singh P, Vishwakarma SP, Singh RL (2014). Antioxidant, oxidative DNA damage protective and antimicrobial activities of the plant *Trigonella foenum-graecum*. *J Sci Food Agric* **94**: 2497–504.
- Teitelbaum SL (2000). Bone resorption by osteoclasts. *Science* **289**: 1504–1508.
- Teti A., Blair HC, Teitelbaum SL, Kahn a. J, Koziol C, Konsek J, *i sur* (1989). Cytoplasmic pH regulation and chloride/bicarbonate exchange in avian osteoclasts. *J Clin Invest* **83**: 227–233.
- Väänänen HK, Horton M (1995). The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci* **108**: 2729–2732.

- Weaver CM (2000). The growing years and prevention of osteoporosis in later life. *Proc Nutr Soc* **59**: 303–306.
- Wei M, Yang Z, Li P, Zhang Y, Sse WC (2007). Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model. *Am J Chin Med* **35**: 663–7.
- WHO (2004). WHO scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level. *World Heal Organ May*: 5–7.
- Wright CB, Redmond TM, Nickerson JM (2015). A History of the Classical Visual Cycle. *Prog Mol Biol Transl Sci* **134**: 433–48.
- 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.
- Xie D-Y, Sharma SB, Paiva NL, Ferreira D, Dixon RA (2003). Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science* **299**: 396–9.
- Yokozawa T, Park CH, Noh JS, Roh SS (2014). Role of oligomeric proanthocyanidins derived from an extract of persimmon fruits in the oxidative stress-related aging process. *Molecules* **19**: 6707–26.
- Zhang J-K, Yang L, Meng G-L, Yuan Z, Fan J, Li D, *i sur* (2013). Protection by salidroside against bone loss via inhibition of oxidative stress and bone-resorbing mediators. *PLoS One* **8**: e57251.
- Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J Pharmacol Sci* **129**: 83–94.

## 7. ŽIVOTOPIS

### Edi Rođak

---

Datum rođenja: 20/11/1990

Adresa: Ferićeva 2, 31512 Feričanci, Hrvatska

Kontakt: ☎ +385 98 139 8718 ✉ edi.rodak@gmail.com

### Obrazovanje

---

2009 – 2013      **Prvostupnik molekularne biologije**  
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (Hrvatska)

### Znanstvene aktivnosti i usavršavanje

---

- 2015              Marina Kukulj, Martina Kunštić, Romana Gračan, Edi Rođak, Nada Oršolić (2015) The efficiency of caffeic acid on oxidative stress and angiogenesis i Ehrlich ascites tumor. 12. Hrvatski biološki kongres, od 18.-23. rujna 2015. Sveti Martin na Muri, Hrvatska.
- 2014              Oršolić N, Goluža E, Dikić D, Lisičić D, Sašilo K, Rođak E, *i sur* (2014). Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contents in the retinoic acid-induced bone loss model of rat. *Eur J Nutr* **53**: 1217–27.
- 2013              Laboratorijska stručna praksa – Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb
- 2012              Noć biologije - Odsjek za biologiju, PMF, Zagreb
- 2011              Noć biologije - Odsjek za biologiju, PMF, Zagreb
- 2010 / 2011      Laboratorijska stručna praksa – Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb
- 2010 / 2011      Demonstratura na praktikumu kolegija „Zoologija“ – Odsjek za biologiju, PMF, Zagreb
- 2010 / 2011      Vanjski suradnik – Edukator, Zoološki vrt grada Zagreba
- 2010              Noć biologije – Odsjek za biologiju, PMF, Zagreb

## **Osobne vještine**

---

- |                    |   |
|--------------------|---|
| Znanje jezika      | <ul style="list-style-type: none"><li>• Hrvatski – materinji</li><li>• Engleski – napredno</li><li>• Njemački – osnovno</li></ul>                           |
| Računalne vještine | <ul style="list-style-type: none"><li>• Microsoft Office™ uredski alati</li><li>• Operativni sustavi: Windows XP/7/8.1</li><li>• Joomla, Mendeley</li></ul> |

## **Ostalo**

---

- |          |   |
|----------|---|
| Članstva | <ul style="list-style-type: none"><li>• Udruga studenata biologije - BIUS, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb</li></ul> |
| Dozvole  | <ul style="list-style-type: none"><li>• Vozačka dozvola B kategorije</li></ul>  |