

Wpływ chryzyny na parametry histomorfometryczne kości owariektomizowanych szczurów

Effect of chrysin on histomorphometrical parameters of bones in ovariectomized rats

Maria Zych, Weronika Wojnar, Anna Bońska, Ilona Kaczmarczyk-Sedlak

Katedra i Zakład Farmakognozji i Fitochemii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, e-mail: farmafit@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: osteoporoza, szczury, owariektomia, chryzyna, fitoestrogeny, parametry histomorfometryczne

Key words: osteoporosis, rats, ovariectomy, chrysin, phytoestrogens, histomorphometric parameters

Streszczenie

Osteoporoza jest schorzeniem wynikającym między innymi z niedoboru estrogenów u kobiet w okresie menopauzalnym. Choroba ta charakteryzuje się zmniejszoną wytrzymałością kości na uszkodzenia mechaniczne. Osłabienie układu szkieletowego wynika z zaburzeń na poziomie mikroarchitektury tkanki kostnej. Aby zapobiec rozwojowi osteoporozy pomenopauzalnej, można stosować terapię hormonalną, która jednak niesie za sobą wiele działań niepożądanych. W związku z tym poszukuje się bezpiecznej alternatywy dla hormonalnej terapii zastępczej. W tym celu wykorzystywane są związki pochodzenia roślinnego, w tym substancje o charakterze flawonoidów, nazywane fitoestrogenami. Celem pracy było zbadanie, czy związek o strukturze flawonoidu – chryzyna – może wykazywać ochronne działanie na tkankę kostną na poziomie mikroarchitektury u szczurów z eksperymentalnie wywołaną osteoporozą. Badania prowadzono na samicach szczurów szczepu Wistar podzielonych na grupy: SHAM – pozornie operowane, OVX – owariektomizowane i OVX+CHR – owariektomizowane, którym podawano doustnie chryzynę w dawce 50 mg/kg przez 4 tygodnie. Po izolacji kości zanalizowano parametry makrometryczne oraz wykonano preparaty histologiczne i oznaczono szereg parametrów histomorfometrycznych. Uzyskane wyniki wskazują, że chryzyna podawana szczurom owariektomizowanym powoduje nieznaczną poprawę badanych parametrów.

Summary

Osteoporosis is a disease caused by many factors, for example by estrogens deficiency in menopausal women. It is characterized by decreased mechanical strength of the bones resulting from alterations in bone microarchitecture. To prevent postmenopausal osteoporosis development, hormonal replacement therapy can be used. There are however many side effects of such therapy, thus safe alternative is needed. Scientific reports indicate that plant

-derived substances, including flavonoids, may be helpful in postmenopausal osteoporosis prevention or treatment. These substances are called 'phytoestrogens'. The aim of the study was to examine if chrysin – a plant-derived flavonoid – reveals protective effect on bone tissue microarchitecture in rats with experimental osteoporosis. The study was conducted on female Wistar rats divided into groups: SHAM – sham operated, OVX – ovariectomized rats and OVX+CHR – ovariectomized rats treated with chrysin at a dose of 50 mg/kg. Tested flavonoid was administered orally for 4 weeks. Obtained bones were weighted and measured, then histological specimens were prepared and histomorphometric parameters were analyzed. The results indicate, that chrysin administered to ovariectomized rats leads to meager improvement of analyzed parameters.

Wstęp

Osteoporoza jest schorzeniem szkieletu, które charakteryzuje się zmniejszoną masą kości, jak również uszkodzeniem tkanki kostnej na poziomie mikroarchitektury. Jednym z poważniejszych powikłań osteoporozy jest obniżona wytrzymałość kości, a co za tym idzie, zwiększona podatność na złamania [1]. Odpowiedź tkanki kostnej na naprężenia mechaniczne związana jest z jej budową, która pozwala na właściwą ochronę przed złamaniami przy wykorzystaniu jak najmniejszej ilości materiału budulcowego. Proces adaptacji kości możliwy jest dzięki obecności wyspecjalizowanych komórek, osteocytów, które przekształcają sygnał mechaniczny w odpowiedź chemiczną. Osteocyty uwalniają cząsteczki sygnałowe inicjujące aktywność formujących kości osteoblastów i/lub resorbujących kość osteoklastów [2].

Spośród wielu przyczyn leżących u podstaw rozwoju osteoporozy u kobiet wymienia się menopauzę i związany z nią niedobór estrogenów [3]. Dowiedziono, że obniżony poziom tych hormonów płciowych może prowadzić do wzmożonej apoptozy osteocytów, jak również do zwiększonej aktywności osteoklastów. Osteoklasty na swojej powierzchni posiadają receptor estrogenowy (RE), poprzez który estrogeny przyłączają się do komórek, indukując ich apoptozę. W związku z powyższym, niedobór estrogenów prowadzi do zaburzeń w równowadze procesów zachodzących w tkance kostnej, a resorpcja kości przeważa nad ich tworzeniem [4].

Ze względu na zwiększone ryzyko wystąpienia osteoporozy i związanych z nią złamań u kobiet w okresie pomenopauzalnym, poszukuje się sposobów, dzięki którym możliwe będzie zapobieganie lub opóźnienie rozwoju tego schorzenia. U kobiet z niedoborem estrogenów jednym ze sposobów profilaktyki osteoporozy może być hormonalna terapia zastępcza (HTZ), gdyż jak dowiedziono, suplementacja estrogenów może zmniejszyć ryzyko wystą-

pienia złamań nawet o 30–40% [5, 6]. Istnieje jednak wiele dowodów wskazujących na niekorzystne efekty uboczne związane ze stosowaniem HTZ, w tym choroby układu krążenia, takie jak zakrzepica czy wyższe prawdopodobieństwo wystąpienia zawału serca, jak również zwiększone ryzyko rozwoju nowotworów hormonozależnych [7]. Aby uniknąć działań niepożądanych, związanych z HTZ, poszukuje się bezpiecznej alternatywy dla związków steroidowych. Do związków o niesteroidowej budowie, które mogą wpływać na receptory estrogenowe, są zaliczane substancje pochodzenia roślinnego nazywane ogólnie fitoestrogenami. Wśród fitoestrogenów można wymienić flawonoidy, lignany, kumestany oraz mykoestrogeny. Dzięki strukturalnemu podobieństwu do 17- β -estradiolu mogą pobudzać RE, jednak ich aktywność jest 10^{-2} - 10^{-3} razy mniejsza niż endogennego estradiolu [8, 9].

Dużą grupę związków o charakterze fitoestrogenów stanowią flawonoidy, a w szczególności izoflawony, takie jak genisteina, formononetyna czy biochanina A [10, 11]. Obok izoflawonów znajdują się również inne związki zaliczane do flawonoidów, które mogą wykazywać działanie estrogenopodobne – flawonole, flawanony, flawony oraz izoflawany [12, 13].

Chryzyna, związek o strukturze flawonu, występuje w wielu naturalnych źródłach roślinnych. Zidentyfikowano ją między innymi w męczennicy cielistej (*Passiflora incarnata*), męczennicy błękitnej (*Passiflora caerulea*), ostropeście plamistym (*Silybum marianum*) i indyjskiej roślinie z rodzaju *Oroxylum* (*Oroxylum indicum*). Chryzyna obecna jest również w miodach i propolisie oraz niektórych grzybach jadalnych, takich jak boczniak ostrogowaty (*Pleurotus ostreatus*) [14, 15, 16, 17, 18]. Flawon ten posiada wiele udokumentowanych korzystnych działań farmakologicznych. Wykazuje działanie przeciwlękowe, uspokajające, przeciwutleniające, antyhepatotoksyczne, jak również przeciwnowotworowe [19, 20, 21]. Istnieją również doniesienia, że chryzyna może przeciwdziałać utracie masy kostnej u szczurów, którym podawano kwas retinowy jako czynnik powodujący osteoporozę [22]. Brak jest jednak badań wskazujących na wpływ tego flawonu na zmiany w tkance kostnej wynikające z niedoboru estrogenów.

Celem niniejszej pracy było zbadanie oddziaływania chryzyny na parametry histomorfometryczne kości szczurów z osteoporozą wywołaną poprzez owariektomię.

Materiał i metody

Eksperyment przeprowadzono na 21 dojrzałych płciowo, 3-miesięcznych samicach szczurów szczepu Wistar. Zwierzęta do badań zostały dostarczo-

ne przez Centrum Medycyny Doświadczalnej SUM w Katowicach-Ligocie. Zezwolenie na przeprowadzenie doświadczenia wydała Lokalna Komisja Etyczna w Katowicach (numer zgody 74/2011). Zwierzęta do badań podzielono na 3 grupy (n=7):

- SHAM – grupa kontrolna, u której przeprowadzono zabieg pozorny,
- OVX – grupa owariektomizowana, poddana zabiegowi obustronnego wycięcia jajników,
- OVX+CHR – grupa owariektomizowana, której podawano chryzynę w dawce 50 mg/kg.

Grupy SHAM i OVX stanowiły również grupy kontrolne dla eksperymentu prowadzonego nad badaniami wpływu naryngeniny na układ kostny w warunkach niedoboru estrogenów [23].

Podczas trwania całego eksperymentu szczury były karmione pełnowartościową granulowaną paszą laboratoryjną Labofeed B bez zawartości soi i miały nieograniczony dostęp do wody pitnej.

24 godziny przed rozpoczęciem podawania wody i chryzyny oraz 24 godziny przed zakończeniem eksperymentu, szczurom zaaplikowano dootrzewnowo tetracyklinę w dawce 20 mg/kg w objętości 1 ml/kg masy ciała zwierzęcia.

Chryzynę do podawania zwierzętom przygotowano w moździerzku poprzez zawieszenie związku w wodzie w proporcji 50 mg na każde 2 ml wody bez dodatków innych rozpuszczalników lub emulgatorów. Zwierzętom podawano zawiesinę raz dziennie o tej samej porze dnia, przez 28 dni doustnie za pomocą sondy dożołądkowej (*per os – p.o.*) w objętości zależnej od masy ciała – na każdy 1 kg masy ciała szczura podawano 2 ml zawiesiny, dzięki czemu podawana dawka wynosiła dokładnie 50 mg chryzyny/kg masy ciała. Przed pobraniem do sondy zawiesinę każdorazowo dokładnie mieszano, aby uzyskać jej homogeniczność. Szczury z grup SHAM i OVX dostawały wodę destylowaną *p.o.* Podawanie chryzyny rozpoczęto tydzień po zabiegu owariektomii.

W trakcie trwania podawania wody i badanego związku kontrolowano przyrost masy ciała szczurów za pomocą wagi Radwag WLY 0,6/1,2/D2 z dokładnością do 0,1 g.

Po 28 dniach podawania owariektomizowanym szczurom chryzyny zwierzęta uśmiercono (zgodnie z wytycznymi Lokalnej Komisji Etyki w Katowicach) poprzez jednokrotne podanie dootrzewnowo mieszaniny ketaminy z ksylazyną. Po stwierdzeniu zgonu zwierzęcia dokonano izolacji narządów wewnętrznych: macicy, grasicy i wątroby, a także kości: udowej, piszczelowej oraz kręgu L-4. Po wyizolowaniu narządy i kości zważono na wadze A&D HR-200 o dokładności do 0,1 mg. Dodatkowo dokonano pomiaru

parametrów makrometrycznych kości, takich jak długość kości udowej i piszczelowej oraz średnica kości udowej i piszczelowej (pomiaru dokonywano w połowie długości kości w płaszczyźnie czołowej i strzałkowej). Wyznaczono także stosunek masy kości do masy ciała szczurów określonej po 4 tygodniach doświadczenia tuż przed uśmierceniem. Stosunek masy kości do masy ciała zwierząt wyrażono w gramach na 100 gram masy ciała.

Z prawej kości udowej przygotowano preparaty histologiczne według wcześniej opisywanych procedur [24, 25]. Z kości udowej sporządzono skrawek przekroju poprzecznego poprzez cięcie tej kości w połowie długości przy użyciu piły diamentowej. Z tej kości przygotowano także skrawek przekroju podłużnego nasady dalszej poprzez cięcie w płaszczyźnie strzałkowej. Otrzymane skrawki płukano w wodzie destylowanej, a następnie utrwalono w alkoholu etylowym absolutnym. Preparaty przekroju podłużnego kości udowej wybarwiono metodą Trippa i Mackaya [26], które następnie posłużyły do badania szerokości beleczek kostnych oraz chrząstki nasadowej. Niewybarwione skrawki przekrojów poprzecznych wykorzystano do pomiarów pola powierzchni korowej trzonu, powierzchni jamy szpikowej kości oraz całej powierzchni trzonu według metody Baylinka z wykorzystaniem lanometru [27]. W preparatach przekroju poprzecznego z kości udowej oznaczono także przyrost kości na grubość zewnętrzną (od strony *periosteum*) i wewnętrzną (od strony *endosteum*) z wykorzystaniem metody tetracyklinowej [28]. Analizy parametrów histomorfometrycznych dokonano używając mikroskopu Optiphot 2 połączonego z kamerą RGB oraz oprogramowania Lucia 4.51 (Laboratory Imaging).

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, wykorzystując test t-Studenta. Za wyniki istotne statystycznie uznano te, których $p < 0,05$. Wyniki przedstawiono w postaci średnich arytmetycznych \pm SEM. Do analizy statystycznej użyto oprogramowania Microsoft Excel 2010.

Wyniki

Konsekwencje niedoboru estrogenów u szczurów

U szczurów owariektomizowanych (OVX) po 4 tygodniach eksperymentu wystąpiło statystycznie istotne zwiększenie przyrostu masy ciała o 127,5% ($p < 0,001$), zmniejszenie masy macicy o 83,9% ($p < 0,001$) oraz zwiększenie masy grasicy o 62,4% ($p < 0,01$) w porównaniu z grupą kontrolną szczurów operowanych pozornie (SHAM) (Tabela 1). Niedobór estrogenów nie wpłynął na masę wątro-

by, ale spowodował wzrost masy ciała zwierząt (o 6,9%) w porównaniu z grupą SHAM.

Tabela 1. Wpływ chryzyny na masę ciała, przyrost masy ciała i masę macicy, grasicy oraz wątroby u szczurów owariotomizowanych

Parametr/Grupa	SHAM	OVX	OVX+CHR
Masa ciała po 4 tygodniach [g]	235,8±4,9	252,1±4,7	245,1± 3,8
Przyrost masy ciała po 4 tygodniach [g]	13,5±0,8	30,7±2,3 ^{AAA}	31,9±2,8
Masa macicy [g]	0,643±0,096	0,104±0,004 ^{AAA}	0,103±0,004
Masa grasicy [g]	0,313±0,021	0,508±0,051 ^{AA}	0,515±0,038
Masa wątroby [g]	6,270±0,225	5,965±0,163	6,186±0,195

Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna ± SEM (n=7). ^{AA} - p<0,01, ^{AAA} - p<0,001 – różnice istotne statystycznie między grupą OVX a grupą SHAM.

W grupie OVX zmniejszyła się: masa kości udowej (o 3,7%), kości piszczelowej (o 6,8%) i kręgu L-4 (o 5,4%) w porównaniu do grupy SHAM. Zmniejszeniu uległa masa wszystkich badanych kości w przeliczeniu na masę ciała szczurów, przy czym masa uda i masa piszczeli istotnie statystycznie (odpowiednio o 10% i 12,8%; p<0,01), natomiast masa kręgu nieistotnie statystycznie o 11,4%. Długość i średnica kości udowej i piszczelowej nie uległy zmianom w porównaniu do grupy SHAM (Tabela 2).

Tabela 2. Wpływ chryzyny na parametry makrometryczne kości u szczurów owariotomizowanych

Parametr/Grupa	SHAM	OVX	OVX+CHR
UDO			
Masa uda [g]	0,668±0,013	0,643±0,016	0,650±0,010
Masa uda/masa ciała [g/100g]	0,327±0,008	0,267±0,004 ^{AA}	0,278±0,004
Długość [mm]	33,37±0,31	33,97±0,51	33,5±0,21
Średnica [mm]	3,25±0,02	3,25±0,04	3,25±0,03
PISZCZEL			
Masa piszczeli [g]	0,521±0,008	0,485±0,015	0,488±0,010
Masa piszczeli/masa ciała [g/100g]	0,221±0,005	0,193±0,004 ^{AA}	0,199±0,002
Długość [mm]	37,31±0,29	37,94±0,49	37,0±0,40
Średnica [mm]	2,63±0,06	2,58±0,04	3,15±0,08
KRĘG L-4			
Masa kręgu L-4 [g]	0,172±0,005	0,162±0,007	0,159±0,006
Masa kręgu L-4/masa ciała [g/100g]	0,076±0,004	0,067±0,003	0,070±0,007

Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna ± SEM (n=7). ^{AA} - p<0,01 – różnice istotne statystycznie między grupą OVX a grupą SHAM.

Wpływ chryzyny na parametry histomorfometryczne kości...

W grupie OVX istotnie statystycznie zmniejszyła się szerokość beleczek kostnych nasady i przynasady kości udowej odpowiednio o 15,2% ($p < 0,001$) i 5,7% ($p < 0,05$), a nie zmieniła się szerokość chrząstki nasadowej w porównaniu do grupy SHAM. Pole powierzchni przekroju poprzecznego części korowej trzonu kości udowej uległo zmniejszeniu (o 5%), zaś wzrosło pole powierzchni przekroju poprzecznego jamy szpikowej (o 15,4%) i stosunek pola powierzchni jamy szpikowej do pola powierzchni całego trzonu kości udowej (istotnie statystycznie o 14,5%, $p < 0,05$). Zarówno przyrost kości udowej na grubość od strony okostnej, jak i od strony jamy szpikowej uległ zwiększeniu, odpowiednio o 34,8% (istotnie statystycznie, $p < 0,05$) i o 9,8% w porównaniu do grupy szczurów operowanych pozornie (Tabela 3).

Tabela 3. Wpływ chryzyny na parametry histomorfometryczne w kości udowej u owariektomizowanych szczurów

Parametr/Grupa	SHAM	OVX	OVX+CHR
Szerokość beleczek nasady kości udowej [μm]	63,36 \pm 1,2	53,70 \pm 0,77 ^{AAA}	57,07 \pm 0,84 ^B
Szerokość beleczek przynasady kości udowej [μm]	41,78 \pm 0,76	39,40 \pm 0,34 ^A	41,09 \pm 0,5 ^B
Szerokość chrząstki nasadowej [μm]	55,21 \pm 2,76	53,82 \pm 2,59	52,60 \pm 2,02
Pole powierzchni przekroju poprzecznego części korowej trzonu kości udowej [mm^2]	6,514 \pm 0,127	6,185 \pm 0,172	6,240 \pm 0,190
Pole powierzchni przekroju poprzecznego jamy szpikowej kości udowej [mm^2]	2,821 \pm 0,191	3,256 \pm 0,128	3,004 \pm 0,100
Stosunek pola powierzchni jamy szpikowej do pola powierzchni całego trzonu kości udowej	0,301 \pm 0,015	0,345 \pm 0,007 ^A	0,325 \pm 0,009
Przyrost kości udowej na grubość od strony okostnej [μm]	33,08 \pm 3,87	44,61 \pm 1,99 ^A	47,24 \pm 0,75
Przyrost kości udowej na grubość od strony jamy szpikowej [μm]	31,14 \pm 0,92	34,20 \pm 2,34	37,60 \pm 1,72

Wyniki zostały przedstawione jako średnia arytmetyczna \pm SEM ($n=7$). ^A - $p < 0,05$, ^{AAA} - $p < 0,001$ – różnice istotne statystycznie między grupą OVX a grupą SHAM; ^B - $p < 0,05$ – różnice istotne statystycznie między grupą OVX+ CHR a grupą OVX.

Efekty działania chryzyny u owariektomizowanych szczurów

Stosowanie chryzyny nie wywołało istotnych zmian w masie, macicy, grasicy, wątroby oraz w przyroście masy ciała w porównaniu do grupy OVX (Tabela 1).

Nie zaobserwowano istotnych zmian w masie kości udowej, kości piszczelowej i kręgu L-4, jak również w długości i szerokości badanych kości

w porównaniu z grupą OVX. Natomiast masa badanych kości w przeliczeniu na masę ciała uległa zwiększeniu: uda o 4,3%, piszczeli o 3,2% i kręgu o 3,7% (Tabela 2).

U szczurów, którym podawano chryzynę zwiększyła się istotnie statystycznie szerokość beleczek kostnych zarówno nasady, jak i przynasady kości udowej odpowiednio o 6,3% ($p < 0,05$) i 4,3% ($p < 0,05$), a szerokość chrząstki nasadowej pozostała bez istotnych zmian w porównaniu z grupą OVX.

Stosowanie chryzyny nie spowodowało zmian pola powierzchni przekroju poprzecznego części korowej trzonu kości udowej, ale nastąpiło zmniejszenie pola powierzchni jamy szpikowej (o 7,7%) oraz stosunku pola powierzchni jamy szpikowej do pola powierzchni całego trzonu kości udowej (o 5,6%) w porównaniu do grupy OVX. Przyrost kości udowej na grubość od strony okostnej oraz od strony jamy szpikowej uległ zwiększeniu (odpowiednio o 5,9% i 9,9% (Tabela 3.).

Dyskusja

Osteoporoza pomenopauzalna jest chorobą zanikową układu szkieletowego, w której dochodzi do stopniowego zmniejszania masy kostnej w wyniku zaburzeń w procesach przebudowy kości. Prowadzą one do nieprawidłowości w mikroarchitekturze tkanki kostnej i w efekcie do zwiększonego narażenia na urazy i złamania. Bezpośrednią przyczyną osteoporozy pomenopauzalnej jest niedobór estrogenów. Podobne zmiany w tkance kostnej, jakie obserwuje się u kobiet z niedostatecznym stężeniem hormonów płciowych, występują u dojrzałych samic zwierząt laboratoryjnych po usunięciu jajników. W niniejszej pracy osteoporozę wywołano u 3-miesięcznych samic szczurów szczepu Wistar poprzez wykonanie zabiegu owariektomii [29].

Szczury owariektomizowane charakteryzowały się zwiększonym przyrostem masy ciała i masy grasicy oraz bardzo znacznym zmniejszeniem masy macicy w porównaniu ze szczurami operowanymi pozornie. Zaobserwowane zmiany ogólnoustrojowe spowodowane są niedoborem estrogenów i świadczą o prawidłowo przeprowadzonym zabiegu wycięcia jajników. Powyższe spostrzeżenia są zgodne z danymi literaturowymi [10, 11, 13].

Niedobór estrogenów ma również negatywny wpływ na układ kostny i prowadzi do nasilenia procesów przebudowy kości z przesunięciem równowagi w kierunku resorpcji. U szczurów owariektomizowanych obniżony poziom estrogenów doprowadził do nieznacznego zmniejszenia masy kości

piszczelowej, udowej i kręgu L-4 oraz znaczącego zmniejszenia masy badanych kości w przeliczeniu na masę ciała. Spowodowało to pogorszenie funkcji podporowej kości, gdyż ze względu na przyrost masy ciała były one poddawane większym obciążeniom.

U szczurów z niedoborem estrogenów zaobserwowano także zmiany w parametrach histomorfometrycznych zarówno kości zbitej (przyrost trzonu kości udowej na grubość, powierzchnia przekroju poprzecznego części korowej i jamy szpikowej kości udowej), jak i beleczkowatej (szerokość beleczek kostnych, nasady i przynasady kości udowej) w porównaniu do szczurów operowanych pozornie.

Tkanka kostna zbita zlokalizowana jest w trzonach kości długich, w tym kości udowej i piszczelowej, natomiast nasady i przynasady tych kości wypełnione są tkanką kostną beleczkowatą. Oba typy tkanki kostnej różnią się nie tylko rozmieszczeniem w układzie kostnym, ale również układem przestrzennym i pełnioną funkcją. W układzie szkieletowym dominuje tkanka kostna zbita, stanowi 80% całkowitej masy kości. Jest ona silnie uwapniona i dlatego warunkuje odporność mechaniczną. Pozostała część układu kostnego zbudowana jest z tkanki kostnej beleczkowatej o nieregularnej budowie przestrzennej. Powierzchnia kości beleczkowatej jest 4 razy większa od powierzchni kości zbitej [30]. Procesy przebudowy tkanki kostnej najszybciej przebiegają na powierzchni kości, dlatego kość beleczkowatą charakteryzuje większa aktywność metaboliczna.

Niedobór estrogenów doprowadził w kości o utkaniu zbitym do powiększenia jamy szpikowej kości udowej oraz towarzyszącemu temu zwiększeniu stosunku powierzchni jamy szpikowej do powierzchni całego trzonu, co świadczy o nasilonych procesach resorpcji. Natomiast zaobserwowany istotny wzrost przyrostu kości na grubość od strony okostnej kości udowej świadczy o nasileniu procesów kościotworzenia. Podobne obserwacje poczyniono wcześniej w wielu publikacjach naukowych [31, 32].

W kości o strukturze beleczkowatej pod wpływem niedoboru estrogenów doszło do istotnego statystycznie zmniejszenia szerokości beleczek kostnych. Takie zmiany mogą świadczyć o nasileniu procesów resorpcji lub zahamowaniu procesu kościotworzenia. Zmniejszenie szerokości beleczek kostnych odnotowano również w innych badaniach prowadzonych nad układem kostnym szczurów owariotomizowanych, co potwierdza negatywny wpływ niedostatecznej ilości żeńskich hormonów płciowych na układ szkieletowy [13, 31, 32].

Wiele doniesień naukowych wskazuje na estrogenopodobne działanie związków roślinnych, w tym flawonoidów. Ze względu na strukturalne

podobieństwo do endogennego estradiolu flawonoidy mają zdolność oddziaływania z receptorami estrogenowymi, dzięki czemu mogą wywoływać w organizmie odpowiedź podobną do tego hormonu [33]. Jednym z najlepiej poznanych fitoestrogenów jest występująca w soi genisteina. Izoflawon ten ma dobrze udokumentowane działanie antyosteoporotyczne oraz zapobiegające występowaniu związanych z menopauzą symptomów. W badaniach dowiedziono, że genisteina hamuje rozwój osteoporozy pomenopauzalnej u kobiet i zapobiega utracie minerału kostnego, jak również powoduje wzrost gęstości mineralnej kości (ang. *bone mineral density*, BMD) w kości udowej i kręgach lędźwiowych, co potwierdzono analizą markerów metabolizmu kostnego [34, 35]. Udowodniono również, że nie tylko izoflawony mogą wykazywać korzystne działanie na tkankę kostną zmienioną osteoporotycznie. Dużą grupą związków o działaniu estrogenopodobnym są również flawony, do których zaliczana jest chryzyna.

W przedstawianej pracy chryzyna podawana w dawce 50 mg/kg szczurom po zabiegu owariektomii spowodowała poprawę niektórych analizowanych parametrów – nastąpiło zwiększenie średnicy beleczek kostnych nasady i przynasady kości udowej. Ponadto zaobserwowano również zmniejszenie pola powierzchni przekroju poprzecznego jamy szpikowej oraz zmniejszenie stosunku pola powierzchni jamy szpikowej do pola powierzchni całego trzonu. Zastosowanie tego flawonu zapobiegło również pogłębieniu się zmian osteoporotycznych, gdyż nie zaobserwowano pogorszenia żadnego z pozostałych parametrów w porównaniu do szczurów z grupy owariektomizowanej. Do tej pory nie przedstawiono w literaturze naukowej wyników badań nad wpływem chryzyny na układ szkieletowy szczurów owariektomizowanych, jednak istnieją doniesienia wskazujące, że flawon ten może mieć korzystne działanie na tkankę kostną zwierząt laboratoryjnych. W innych badaniach udowodniono, że chryzyna podawana w dawce 100 mg/kg przez 14 dni szczurom przed wywołaniem zmian osteoporotycznych za pomocą kwasu retinowego zadziałała ochronnie na tkankę kostną, zapobiegając wystąpieniu stresu oksydacyjnego w badanej tkance. Protekcyjne działanie chryzyny przejawiało się zwiększeniem zawartości wapnia i fosforu w tkance kostnej oraz większą wartością parametru BMD niż u szczurów kontrolnych z osteoporozą wywołaną kwasem retinowym [22]. Badania *in vitro* wykazały, że chryzyna może wpływać na różnicowanie się komórek kostnych poprzez estrogeno-zależną aktywację szlaku sygnałowego kinaz aktywowanych mitogenem (ERK/MAPK), dzięki czemu może mieć zastosowanie w zapobieganiu rozwoju osteoporozy [36].

Mimo iż brak jest doniesień dotyczących wpływu chryzyny na tkankę kostną w modelu zwierzęcym z niedoborem estrogenów wywołanym usunięciem jajników, istnieją prace traktujące o działaniu innych flawonów na układ szkieletowy zwierząt owariektomizowanych. Badania wykazują, że luteolina, flawon występujący w wielu roślinach, takich jak seler, zielona papryka, rumianek czy pietruszka, wykazuje ochronne działanie na kości. Kim i współpracownicy wykazali, że luteolina podawana w dawce 20 mg/kg myszom owariektomizowanym zapobiegała niekorzystnym zmianom osteoporotycznym – nastąpiło zwiększenie parametru BMD, jak również zawartości minerałów kostnych oraz objętości frakcji kostnej w porównaniu do kości zwierząt owariektomizowanych kontrolnych [37]. Innym flawonem, który ma udowodnione ochronne działanie na tkankę kostną u owariektomizowanych zwierząt jest apigenina, związek występujący między innymi w owocach, warzywach, kiełkach i surowcach zielarskich. Apigenina podawana szczurom po zabiegu owariektomii w dawce 10 mg/kg powodowała poprawę parametrów histomorfometrycznych kości, w tym zwiększenie szerokości beleczek kostnych, jak również wpłynęła korzystnie na wartości parametrów makrometrycznych badanych kości [38].

W niniejszym badaniu nie zaobserwowano silnego korzystnego działania chryzyny na tkankę kostną szczurów owariektomizowanych. Nieznaczne poprawienie pogorszonych niedoborem estrogenów parametrów histomorfometrycznych, w porównaniu do danych literaturowych dla innych flawonów można tłumaczyć między innymi słabszym powinowactwem badanego związku do receptorów estrogenowych niż izoflawonów czy choćby apigeniny [12]. Jednak mniejsze powinowactwo do receptorów estrogenowych może być kompensowane poprzez właściwości antyoksydacyjne tego flawonu, co – jak sugeruje Oršolić i wsp. – również ma duże znaczenie w zapobieganiu rozwojowi osteoporozy [22].

Podsumowanie

Pomimo jedynie delikatnej poprawy wybranych parametrów histomorfometrycznych kości zmienionych osteoporotycznie w wyniku niedoboru estrogenów, można wnioskować, że chryzyna podawana w dawce 50 mg/kg wykazuje działanie ochronne na tkankę kostną badanych zwierząt, przez co może przyczynić się do prewencji osteoporozy. Jednak, aby potwierdzić korzystne działanie tego flawonu na osłabiony układ szkieletowy konieczne są dalsze testy obejmujące analizę składu chemicznego kości oraz ich właściwości mechanicznych.

Badania zostały sfinansowane ze środków przeznaczonych na utrzymanie potencjału badawczego – numer umowy KNW-1-038/K/5/0.

Literatura

- [1] Holroyd C., Cooper C., Dennison E., Epidemiology of osteoporosis, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2008, 22(5), s. 671–685.
- [2] Klein-Nulend J., Oers R.F. van, Bacabac R.G., Bone cell mechanosensitivity, estrogen deficiency, and osteoporosis *Journal of Biomechanics*, 2015, 48(5), s. 855–865.
- [3] Raisz L.G., Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects, *Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115(12), s. 3318–3325.
- [4] Khosla S., Oursler M.J., Monroe D.G., Estrogen and the skeleton, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2012, 23(11), s. 576–581.
- [5] Gambacciani M., Levancini M., Management of postmenopausal osteoporosis and the prevention of fractures, *Panminerva Medica*, 2014, 56(2), s. 115–131.
- [6] Cauley J.A., Estrogen and bone health in men and women, *Steroids*, 2015, 99(Pt A), s. 11–15.
- [7] Beral V., Banks E., Reeves G., Evidence from randomised trials on the long-term effects of hormone replacement therapy, *Lancet*, 2002, 360(9337), s. 942–944.
- [8] Cederroth C.R., Nef S., Soy, phytoestrogens and metabolism: A review, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 304(1–2), s. 30–42.
- [9] Kuhnle G. G. C., Vogiatzoglou A., Ward H.A., Khaw K.-T., Dietary phytoestrogens and health – a population study, *Proceedings of the Nutrition Society*, 2011, 70, (OCE4), article E254.
- [10] Kaczmarczyk-Sedlak I., Wojnar W., Zych M., Ozimina-Kamińska E., Taranowicz J., Agata Siwek A., A Effect of formononetin on mechanical properties and chemical composition of bones in rats with ovariectomy-induced osteoporosis, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 457052, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/457052>
- [11] Kaczmarczyk-Sedlak I., Zych M., Wojnar W., Ozimina-Kamińska E., Dudek S., Chadała N., Kachel A., Biochanin a shows no effect on skeletal system in ovariectomized rats, when administered in moderate dose, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2015, 72(3), s. 587–596.
- [12] Kuiper G.G., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., Saag P.T. van der, van der Burg B. van der, Gustafsson J.A., Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta, *Endocrinology*, 1998, 139(10), s. 4252–4263.
- [13] Klasik-Ciszewska S. Kaczmarczyk-Sedlak I., Wojnar W., Effect of glabridin and glycyrrhizic acid on histomorphometric parameters of bones in ovariectomized rats, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2016, 73(2), s. 517–527, Erratum in: *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2016, 73(3), s. 808.
- [14] Harminder, Singh V., Chaudhary A.K., A review on the taxonomy, ethnobotany, chemistry and pharmacology of *Oroxylum indicum* Vent, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 73(5), s.483–490.
- [15] Dhawan K., Dhawan S., Sharma A., Passiflora: a review update, *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 94(1), s. 1–23.

- [16] Amor E.C., Bioflavonoids as bioactive natural products from plants, *Frontiers in Natural Product Chemistry*, 2005, 1, s. 189–192.
- [17] Kaškonienė V., Maruska A., Kornysova O., Buszewski B., Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds in honey, *Chemine Technologija*, 2009, 3(52), s. 74–80.
- [18] Anandhi R., Annadurai T., Anitha T.S., Muralidharan A.R., Najmunnisha K., Nachiappan V., Thomas P.A., Geraldine P., Antihypercholesterolemic and antioxidative effects of an extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*, and its major constituent, chrysin, in Triton WR-1339-induced hypercholesterolemic rats, *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2013, 69(2), s.313–23.
- [19] Khoo B.Y., Siang Ling Chua S.L., Balam P., Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines, *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11(5), s. 2188–2199.
- [20] Brown E., Hurd N.S., McCall S., Ceremuga T.E., Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a *Passiflora incarnata* extract, in the laboratory rat, *AANA Journal*, 2007, 75(5), s. 333–337.
- [21] Pushpavalli G., Kalaiarasi P., Veeramani Ch., Pugalendi K.V., Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatitis in rats, *European Journal of Pharmacology*, 2010, 631(1-3), s. 36–41.
- [22] Oršolić N., Goluža E., Dikić D., Lisičić D., Sašilo K., Rodak E., Jeleč Z., Lazarus M.V., Orct T., Role of flavonoids on oxidative stress and mineral contents in the retinoic acid-induced bone loss model of rat, *European Journal of Nutrition*, 2014, 53(5), s. 1217–1227.
- [23] Kaczmarczyk-Sedlak I., Wojnar W., Zych M., Ozimina-Kamińska E., Bońka A., Effect of dietary flavonoid naringenin on bones in rats with ovariectomy induced osteoporosis, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2016, 73(2), s. 1073–1081
- [24] Kaczmarczyk-Sedlak I., Zych M., Rotko K., Sedlak L., Effects of thalidomide on the development of bone damage caused by prednisolone in rats, *Pharmacological Reports*, 2012, 64(2), s. 386–395.
- [25] Folwarczna J., Janiec W., Gawor M., Pytlik M., Kaczmarczyk-Sedlak I., Nowińska B., Effects of enoxaparin on histomorphometric parameters of bones in rats, *Polish Journal of Pharmacology*, 2004, 56(4), 451–457.
- [26] Tripp E.J., MacKay E.H., Silver staining of bone prior to decalcification for quantitative determination of osteoid in sections, *Stain Technology*, 1972, 47(3), s. 129–136.
- [27] Baylink D., Wergedal J., Stauffer M., Formation, mineralization, and resorption of bone in hypophosphatemic rats, *Journal of Clinical Investigation*, 1971, 50(12), s. 2519–2530.
- [28] Frost H.M., Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling, *Calcified Tissue Research*, 1969, 3(3), s. 211–237.
- [29] Kalu D.N., The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss, *Bone and Mineral*, 1991, 15(3), s. 175–191.
- [30] Badurski J., Osteoporoza a złamania. Poradnik do zrozumienia, diagnostyki i leczenia, Polska Fundacja Osteoporozy, Białystok 2003.
- [31] Kaczmarczyk-Sedlak I., Folwarczna J., Trzeciak H.I., Thalidomide affects the skeletal system of ovariectomized rats, *Pharmacological Reports*, 2009, 61(3), s. 529–538.
- [32] Folwarczna J., Zych M., Nowińska B., Pytlik M., Bialik M., Jagusiak A., Lipecka-Karcz M., Matysiak M., Effect of diosgenin, a steroidal sapogenin, on the rat skeletal system, *Acta Biochimica Polonica*, 2016, 63(2), s. 287–295.

- [33] Usui T., Pharmaceutical prospects of phytoestrogens, *Endocrine Journal*, 2006, 53(1), s. 7–20.
- [34] Atteritano M., Mazzaferro S., Frisina A., Cannata M.L., Bitto A., Squadrito F., Macrì I., Frisina N., Buemi M., Genistein effects on quantitative ultrasound parameters and bone mineral density in osteopenic postmenopausal women, *Osteoporosis International*, 2009, 20(11), s. 1947–1954.
- [35] Marini H., Minutoli L., Polito F., Bitto A., Altavilla D., Atteritano M., Gaudio A., Mazzaferro S., Frisina A., Frisina N., Lubrano C., Bonaiuto M., D'Anna R., Cannata M.L., Corrado F., Adamo E.B., Wilson S., Squadrito F., Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women: a randomized trial, *Annals of Internal Medicine*, 2007, 146(12), s. 839–847.
- [36] Zeng W., Yan Y., Zhang F., Zhang C., Liang W., Chrysin promotes osteogenic differentiation via ERK/MAPK activation, *Protein & Cell*, 2013, 4(7), s. 539–547.
- [37] Kim T.H., Jung J.W., Ha B.G., Hong J.M., Park E.K., Kim H.J., Kim S.Y., The effects of luteolin on osteoclast differentiation, function in vitro and ovariectomy-induced bone loss, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2011, 22(1), s. 8–15.
- [38] Park J.A., Ha S.K., Kang T.H., Oh M.S., Cho M.H., Lee S.Y., Park J.H., Kim S.Y., Protective effect of apigenin on ovariectomy-induced bone loss in rats, *Life Science*, 2008, 82(25–26), s. 1217–1223.

Do cytowania:

Zych M., Wojnar W., Bońka A., Kaczmarczyk-Sedlak I., Wpływ chryzyny na parametry histomorfometryczne kości owariektomizowanych szczurów, *Herbalism*, 2017, 1(3), s. 41–54