

UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET

MOLEKULSKA MEDICINA



Slobodan Gigov

**UTICAJ APIGENINA I NATRIJUM-DEOKSIHOLATA NA BIOLOŠKU
RASPOLOŽIVOST RALOKSIFENA**

Doktorska disertacija

Mentori:

Prof. dr Aleksandar Rašković

Prof. dr Jelena Hogervorst

Novi Sad, 2017.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ključna dokumentacijska informacija

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska publikacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani materijal
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Slobodan Gigov
AU

Mentor/Ko-mentor: Prof. dr Aleksandar Rašković
MN Prof. dr Jelena Hogervorst

Naslov rada: Uticaj apigenina i natrijum-deoksiholata na biološku
NS raspoloživost raloksifena

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JZ

Jezik izvoda: Srpski/engleski
JI

Zemlja publikovanja: Republika Srbija
ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2017.
GO

Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MS	21000 Novi Sad, Srbija, Hajduk Veljkova 3
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja 8/ broj strana 104/ broj slika 17/ broj tabela 15/ broj grafikona 10/ broj citata 151
Naučna oblast: OB	Medicina
Naučna disciplina: ND	Farmakologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	raloksifen; biološka raspoloživost; farmakokinetika; apigenin; deoksiholna kiselina; testovi funkcije jetre; testovi funkcije bubrega; oksidativni stres; pacovi soja Wistar
UDK:	615.2.015.4:547.93]:612.085 615.2.015.4:547.973.2]:612.085
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu 21000 Novi Sad, Srbija, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	Nema

Izvod:
IZ

Raloksifen je predstavnik selektivnih modulatora estrogenih receptora koji se koristi u terapiji osteoporoze i invazivnog oblika raka dojke u postmenopauzi. Raloksifen se relativno dobro resorbuje iz gastrointestinalnog trakta, ali pri prvom prolasku kroz jetru podleže biotransformaciji u značajnom procentu, što je uzrok njegove niske biološke raspoloživosti. Bioraspoloživost kod ljudi iznosi 2%, a kod Wistar pacova 39%. Različite supstance se koriste da bi se poboljšala bioraspoloživost lekova. Žučne kiseline, kao što je deoksiholna kiselina, omogućavaju bolji prolazak kroz biološke membrane drugim supstancama, te mogu povećati bioraspoloživost lekova. Apigenin je široko rasprostranjeni flavonoid koji inhibiše različite metaboličke puteve i na taj način može usporiti metabolizam i eliminaciju i povećati koncentraciju lekova u krvi. Ciljevi ovog istraživanja su bili da se ispita da li apigenin i natrijum-deoksiholat mogu povećati bioraspoloživost raloksifena, njihov uticaj na biohemijske parametre i parametre hemostaze, kao i da se ispita antioksidativni potencijal apigenina. Ispitan je i uticaj apigenina na akutno oštećenje jetre usled primene toksične doze paracetamola.

U istraživanju su korišćeni zdravi, beli pacovi muškog roda, soja *Wistar*. U ogledu su ukupno korišćene 84 eksperimentalne životinje. Sva ispitivanja na životinjama je odobrila Etička komisija Univerziteta u Novom Sadu. Raloksifen je primenjen intravenski i *per os*, dok su natrijum-deoksiholat i apigenin aplikovani peroralno. Uzorci krvi, urina i fecesa su korišćeni za određivanje farmakokinetičkih parametara, dok su za određivanje biohemijskih, hemostatskih i parametara oksidativnog stresa korišćeni serum i uzorci jetre laboratorijskih životinja.

Pretretman natrijum-deoksiholatom je doveo do smanjenja koncentracije raloksifena u krvi zbog olakšanog i brzog prodora raloksifena u periferne kompartmane. Time je značajno produženo poluvreme eliminacije i srednje vreme zadržavanja raloksifena i značajno je povećan volumen distribucije raloksifena. Apigenin je doveo do manjeg pada koncentracije raloksifena u prvim satima nakon intravenske primene raloksifena, dok su koncentracije raloksifena bile značajno više nakon osmog časa od primene leka.

Uticaj raloksifena na biohemijske parametre je bio značajno veći nakon intravenske nego nakon peroralne primene. Nakon intravenske primene raloksifena je značajno povećana aktivnost enzima jetre, ALP, ALT, AST i GGT, dok su pokazatelji funkcije bubrega, urea, mokraćna kiselina i kreatinin bili sniženi. U grupama koje su pretretirane natrijum-deoksiholatom i apigeninom vrednosti ovih parametara bile su niže u odnosu na grupu tretiranu samo raloksifenom. Statistički najznačajniji uticaj je imala primena trojne kombinacije, raloksifena, natrijum-deoksiholata i apigenina, koja je dovela do značajnog pada aktivnosti enzima jetre, i u odnosu na grupu tretiranu raloksifenom i u odnosu na kontrolnu grupu.

Kod životinja tretiranih kombinacijom apigenina i paracetamola pokazatelji toksičnosti su bili značajno niži, naročito vrednosti ALT i ALP, u odnosu na grupu koja je dobijala samo paracetamol. Hepatotoksičnost izazvana toksičnom dozom paracetamola je potvrđena i histopatološkim promenama na jetri, koje nisu primećene u grupi životinja tretiranih kombinacijom apigenina i paracetamola. Ispitivanjem je utvrđeno da apigenin može da spreči paracetamolom indukovano povećanje nivoa MDA, što ukazuje da apigenin pozitivno utiče na očuvanje integriteta ćelije. Aktivnost enzima CAT i GR u homogenatima jetre je bila značajno povećana nakon primene toksične doze paracetamola u odnosu na kontrolnu grupu. Aktivnost enzima CAT i GR u grupi tretiranoj kombinacijom apigenina i paracetamola je bila približna vrednostima u kontrolnoj grupi.

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da natrijum-deoksiholat i apigenin značajno utiču na farmakokinetiku raloksifena. Primena natrijum-deoksiholata dovela je do pada koncentracije raloksifena u krvi, značajnog prelaska raloksifena iz krvi u periferne kompartmane i povećanja njegovog volumena distribucije, dok je apigenin značajno usporio metabolizam i eliminaciju raloksifena i doveo do njegovog produženog zadržavanja u krvi.

Natrijum-deoksiholat i apigenin su pokazali pozitivan uticaj na biohemijske parametre, parametre hemostaze i smanjenje nivoa oksidativnog stresa. Kombinacija natrijum-deoksiholata i apigenina je pokazala sinergistički uticaj na navedene parametre, odnosno dovela je do značajnih promena u odnosu na pojedinačnu primenu ovih supstanci.

Rezultati ispitivanja ukazuju na to da apigenin smanjuje stepen lipidne peroksidacije i da dovodi do značajnog povećanja enzimskih antioksidantnih mehanizama odbrane kod pacova kod kojih je hepatotoksičnost indukovana paracetamolom.

Datum prihvatanja teme od strane Senata: 24.10.2013.

DP

Datum odbrane:
DO

Članovi komisije:
ČK

Predsednik: Prof.dr Momir Mikov, Medicinski fakultet Novi Sad
Univerzitet u Novom Sadu

Član: Prof.dr Ljiljana Suvajdžić, Medicinski fakultet Novi Sad
Univerzitet u Novom Sadu

Član: Prof.dr Silva Dobrić, Medicinski fakultet Vojnomedicinske
akademije, Univerzitet odbrane u Beogradu

Član: Prof.dr Aleksandar Rašković, Medicinski fakultet Novi Sad
Univerzitet u Novom Sadu

Član: Doc.dr Svetlana Goločorbin-Kon, Medicinski fakultet Novi Sad
Univerzitet u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
MEDICAL FACULTY OF NOVI SAD**

Key word documentation

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph documentation
DT

Type of record: Textual printed material
TR

Concets code: PhD thesis
CC

Author: Slobodan Gigov
AU

Mentor/Co-Mentor: Associate Professor Aleksandar Rasković, MD, PhD/
MN Associate Professor Jelena Hogervorst, MD, PhD

Title: Influence of apigenin and sodium deoxycholate on
TI biological availability of raloxifene

Language of text: Serbian
LT

Language of abstract: Serbian/English
LA

Contry of publication: Republic of Serbia
CP

Locality od publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2017.
PY

Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	21000 Novi Sad, Srbija, Hajduk Veljkova 3
Physical description: PD	Number of chapters 8, pages 104, pictures 17, tables 15, charts 10, references 151
Scientific field: SF	Medicine
Scientific discipline: SD	Pharmacology
Subject, Key words: SKW	Raloxifene Hydrochloride; Biological Availability; Pharmacokinetics; Apigenin; Deoxycholic Acid; Liver Function Tests; Kidney Function Tests; Oxidative Stress; Rats, Wistar
UDC:	615.2.015.4:547.93]:612.085 615.2.015.4:547.973.2]:612.085
Holding data: HD	Library of Medical Faculty, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad
Note: N	None

Abstract:

AB

Raloxifene is selective estrogen receptor modulator used in treatment of osteoporosis and invasive breast cancer in postmenopausal women. Raloxifene is well absorbed from the gastrointestinal tract, but undergoes extensive first-pass metabolism, which results in very low bioavailability of raloxifene, 2% in humans, and 39% in Wistar rats. Various substances are used for increasing bioavailability of other drugs. Bile acids, such as deoxycholic acid, promote transport of other substances through biological membranes, and consequently, may increase their bioavailability. Apigenin is a widespread flavonoid, which inhibits different metabolic pathways. Thus, apigenin can slow down metabolism and elimination of drugs, and raise drug concentration in blood. Aims of this study were to investigate if apigenin and sodium deoxycholate could increase bioavailability of raloxifene, their influence on biochemical and hemostasis parameters, and to investigate antioxidative potential of apigenin.

Furthermore, influence of apigenin on acute liver damage after toxic dose of paracetamol was examined. *In vivo* experiments were performed on 84 laboratory healthy male Wistar rats. All experiments were approved by Ethics Committee of University of Novi Sad. Raloxifene was

applied intravenously and *per os*, while sodium deoxycholate and apigenin were given perorally. Blood, urine and feces samples were used for pharmacokinetic parameters measurement, whereas serum and liver samples were used for evaluation of biochemical, hemostasis and oxidative stress parameters.

Pretreatment of sodium deoxycholate led to raloxifene blood concentration decrease due to easier penetration of raloxifene in peripheral compartments. As a result, raloxifene half-life and mean residence time were significantly longer and volume of distribution was increased. Apigenin caused lower decrease in raloxifene concentration in first few hours after raloxifene intravenous application, while raloxifene concentrations after apigenin pretreatment were significantly higher 8 hours after raloxifene application.

Influence of raloxifene on biochemical parameters was more significant after intravenous than after *per os* application. Intravenous application of raloxifene led to increased activity of liver enzymes, ALP, ALT, AST and GGT, while parameters of kidney function, urea, uric acid and creatinine were decreased in comparison to the control group. In experimental groups pretreated with sodium deoxycholate and apigenin these parameters were lower than in the group treated only with raloxifene. Statistically the most significant effects were in the group treated with combination of raloxifene, sodium deoxycholate and apigenin, which caused significant decrease in activity of liver enzymes compared both with raloxifene and control group of animals.

In experimental animals treated with combination of apigenin and paracetamol bioindicators of paracetamol toxicity were significantly lower, especially activity of ALT and ALP, in comparison to the group treated only with paracetamol. Hepatotoxicity induced by toxic dose of paracetamol was also confirmed by histopathological alterations in liver, which were not observed in the experimental group treated with combination of apigenin and paracetamol. In this study it was confirmed that apigenin could prevent paracetamol-induced MDA level increase, which suggests that apigenin have positive effects on cell integrity. Activity of CAT and GR in liver homogenates was significantly increased after toxic dose of paracetamol in comparison to the control group, while activity of these enzymes in the group treated with apigenin and paracetamol was similar to values in the control group.

Results of this study showed that sodium deoxycholate and apigenin can significantly change pharmacokinetic parameters of raloxifene. Sodium deoxycholate caused significant decrease in raloxifene blood concentration, extensive distribution from blood to peripheral compartments and increase of raloxifene volume of distribution. Apigenin inhibited metabolism and elimination of raloxifene and thus prolonged half-life and mean residence time of raloxifene.

Sodium deoxycholate and apigenin showed positive effects on biochemical and hemostasis parameters and decreased the level oxidative stress. Combination of sodium deoxycholate and apigenin showed synergistic effects on these parameters in comparison to effects of separate application of sodium deoxycholate and apigenin.

The result of our study indicates that apigenin inhibits the level of lipid peroxidation and significantly increase the enzyme antioxidant defence mechanisms in paracetamol induced hepatotoxicity in rats.

Accepted on Senate on: 24.10.2013.
AS

Defended:
DE

Thesis Defend Board:
DB

President: Full Professor Momir Mikov, MD, PhD, Faculty of Medicine Novi Sad, University of Novi Sad

Member: Associate Professor Ljiljana Suvajdžić, MD, PhD, Faculty of Medicine Novi Sad, University of Novi Sad

Member: Full professor Silva Dobrić, MPharm, PhD, Faculty of Medicine of the Military Medical Academy, University of Defence in Belgrade

Member: Associate professor Aleksandar Rašković, MD, PhD, Faculty of Medicine Novi Sad, University of Novi Sad

Member: Assistant professor Svetlana Goločorbin-Kon, MPharm, PhD, Faculty of Medicine Novi Sad, University of Novi Sad

Zahvaljujem mentorima prof. dr Aleksandru Raškoviću i prof. dr Jeleni Hogervosrt na stručnoj pomoći, sugestijama i savetima tokom rada na doktorskoj disertaciji.

Veliku zahvalnost dugujem prof. dr Momiru Mikovu na neizmernoj pomoći tokom pripreme i izrade ovog rada, uz čiju su pomoć napravljeni planovi eksperimenata i urađena farmakokinetička obrada podataka.

Posebnu zahvalnost dugujem i prof. dr Ljiljani Suvajdžić i doc. dr Svetlani Goločorbin-Kon koje su mi tokom celokupnog studiranja pružale ogromnu podršku.

Zahvaljujem se doc. dr Mladeni Lalić Popović i doc. dr Saši Vukmiroviću na pomoći prilikom farmakokinetičke obrade podataka.

Zahvaljujem se doc. dr Borisu Milijaševiću, doc. dr Nebojši Stilinoviću i Slavenu Šuputu na pomoći tokom eksperimentalnog rada sa životinjama i kolektivu Katedre za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju jer su mi omogućili rad u njihovim laboratorijama.

Najveću podršku i pomoć prilikom izrade disertacije pružila mi je porodica.

Ova disertacija je urađena u okviru projekta Ministarstva za prosvetu i nauku Republike Srbije broj 41012. i projekta Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj broj 451-2458/2011.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	- 1 -
1.1. Osteoporoza.....	- 1 -
1.2. Raloksifen.....	- 3 -
1.3. Apigenin.....	- 5 -
1.4. Žučne kiseline	- 8 -
1.5. Oksidativni stres.....	- 9 -
1.6. Značaj ispitivanja	- 10 -
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	- 12 -
3. RADNE HIPOTEZE	- 13 -
4. MATERIJAL I METODE.....	- 14 -
4.1. Eksperimentalne životinje.....	- 14 -
4.2. Supstance korišćene u eksperimentima.....	- 15 -
4.3. Tretman i podela eksperimentalnih grupa.....	- 16 -
4.4. Farmakokinetička ispitivanja	- 18 -
4.4.1. Prikupljanje uzoraka krvi.....	- 18 -
4.4.2. Prikupljanje uzoraka urina	- 21 -
4.4.3. Prikupljanje uzoraka fecesa	- 22 -
4.4.4. Određivanje farmakokinetičkih parametara.....	- 23 -
4.4.5. Metoda za određivanje koncentracije raloksifena.....	- 23 -
4.4.6. Farmakokinetička analiza	- 32 -
4.5. Biohemijska i toksikološka ispitivanja.....	- 34 -
4.5.1. Određivanje koncentracije aspartat aminotransferaze (AST).....	- 34 -
4.5.2. Određivanje koncentracije alanin aminotransferaze (ALT)	- 35 -

4.5.3.	Određivanje koncentracije alkalne fosfataze (ALP)	- 35 -
4.5.4.	Određivanje gama-glutamil transferaze (GGT)	- 35 -
4.5.5.	Određivanje direktnog bilirubina	- 36 -
4.5.6.	Određivanje koncentracije uree	- 36 -
4.5.7.	Određivanje koncentracije mokraćne kiseline	- 37 -
4.5.8.	Određivanje koncentracije kreatinina	- 37 -
4.6.	Određivanje uticaja natrijum-deoksiholata i apigenina na parametre hemostaze kod eksperimentalnih životinja tretiranih terapijskom dozom raloksifena	- 37 -
4.6.1.	Određivanje aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTT)	- 37 -
4.6.2.	Određivanje protrombinskog vremena (PT)	- 38 -
4.6.3.	Određivanje fibrinogena	- 38 -
4.6.4.	Određivanje fibrin degradacionih produkata u plazmi	- 39 -
4.7.	<i>In vivo</i> ispitivanje antioksidativne aktivnosti apigenina	- 40 -
4.7.1.	Određivanje koncentracije proteina	- 41 -
4.7.2.	Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije	- 42 -
4.7.3.	Određivanje specifične aktivnosti katalaze (CAT)	- 43 -
4.7.4.	Određivanje specifične aktivnosti glutation reduktaze (GR)	- 44 -
4.7.5.	Određivanje specifične aktivnosti glutation peroksidaze (GPx)	- 45 -
4.8.	Patohistološka ispitivanja	- 46 -
4.9.	Statistička obrada podataka	- 46 -
5.	REZULTATI	- 48 -
5.1.	Farmakokinetička ispitivanja	- 48 -
5.1.1.	Određivanje koncentracije raloksifena u plazmi nakon intravenske primene	- 48 -
5.1.2.	Određivanje koncentracije raloksifena u plazmi nakon peroralne primene	- 51 -
5.1.3.	Određivanje količine raloksifena u urinu	- 53 -

5.1.4.	Određivanje količine raloksifena u fecesu	- 55 -
5.2.	Biohemijska i toksikološka ispitivanja.....	- 57 -
5.2.1.	Uticaj natrijum-deoksiholata i apigenina na biohemijske parametre u serumu nakon primene terapijske doze raloksifena	- 57 -
5.2.2.	Uticaj apigenina na biohemijske parametre seruma nakon primene toksične doze paracetamola.....	- 62 -
5.3.	Uticaj raloksifena, natrijum-deoksiholata i apigenina na parametre hemostaze	- 64 -
5.4.	Ispitivanje antioksidativne aktivnosti apigenina	- 67 -
5.5.	Patohistološka ispitivanja.....	- 69 -
6.	DISKUSIJA	- 71 -
6.1.	Farmakokinetička ispitivanja	- 71 -
6.2.	Biohemijska i toksikološka ispitivanja.....	- 75 -
6.2.1.	Uticaj natrijum-deoksiholata i apigenina na biohemijske parametre u serumu nakon primene terapijske doze raloksifena	- 75 -
6.2.2.	Uticaj apigenina na biohemijske parametre seruma nakon primene toksične doze paracetamola.....	- 78 -
6.3.	Ispitivanje uticaja na parametre hemostaze.....	- 80 -
6.4.	Ispitivanje antioksidativne aktivnosti apigenina	- 82 -
6.5.	Patohistološka ispitivanja.....	- 84 -
7.	ZAKLJUČCI	- 85 -
8.	LITERATURA	- 87 -

1. UVOD

1.1. Osteoporozna

Osteoporozna predstavlja oboljenje mišićno-koštanog sistema, koje se manifestuje poremećajem strukture kostiju. Smanjenje sadržaja minerala u kostima naziva se osteopenija. Doslovni prevod reči osteoporozna bi bio „porozna kost“ (Hernlund et al., 2013; Ugrešić i dr., 2011). Tokom razvoja bolesti dolazi do smanjenja koštane mase sa oštećenjem mikroarhitekture koštanog tkiva što rezultira povećanom sklonošću ka prelomima kostiju. Najčešći su prelomi kuka, pršljenova i ručnog zgloba. Često ne postoje bilo kakvi simptomi pre nego što se dogodi prvi prelom. Kvalitet života i dužina životnog veka nakon preloma drastično opadaju, naročito posle preloma kuka ili kičme. Samim tim, osteoporozna kao bolest ostavlja ozbiljne posledice ne samo na kvalitet života pojedinca, nego i na njegovu porodicu i širu društvenu zajednicu. Bol visokog intenziteta, nepokretljivost, invaliditet, pa čak i smrtni ishod su česte posledice preloma uzrokovanih osteoporozom. Stoga je primarni cilj medikamentne terapije osteoporozne smanjenje rizika od nastanka fraktura (Hernlund et al., 2013; Rang et al., 2005; Ugrešić i sar., 2011).

Starost, genetska predispozicija, hormonski status, rana menopauza, fizička neaktivnost, nedovoljan unos kalcijuma i deficit vitamina D, kao i pušenje i konzumiranje alkohola spadaju u najznačajnije faktore rizika za nastanak osteoporozne. Duža ili prekomerna upotreba glukokortikoida ili tiroksina takođe mogu dovesti do osteoporozne. Žene imaju veću sklonost da razviju osteoporoznu, naročito nakon menopauze, kada dolazi do naglog pada nivoa estrogena i narušavanja homeostaze kostiju, što je posebno izraženo kod žena fragilne građe, koje imaju mali procenat masnog tkiva u organizmu (Rang et al., 2005, Ugrešić i sar., 2011).

Inicijalna fraktura predstavlja glavni rizik za nastanak novog preloma. Osobe koje su prethodno doživele prelom imaju 86% povećan rizik od novog preloma (Kanis et al., 2004).

Pacijenti sa istorijom prethodne frakture pršljenova imaju 2,3 puta veći rizik od budućeg preloma kuka i 1,4 puta veći rizik od preloma podlaktice (Melton et al., 1999).

Dijagnoza osteoporoze se zasniva na merenju gustine koštane mase (bone mineral density – BMD) izražene kroz T-skor i Z-skor. T-skor predstavlja broj standardnih devijacija (SD) za koliko vrednost BMD ispitanika odstupa od vrednosti BMD kod zdrave mlade osobe, dok se kod Z-skora vrednost BMD kod ispitanika poredi sa vrednošću BMD kod zdrave osobe istog pola i starosti kao ispitanik. Vrednost T-skora koja je niža od -2,5 SD smatra se osteopozom (Cauley et al., 2011; Sheu and Diamond, 2016).

S obzirom da je globalno rasprostranjena, osteoporoza predstavlja ozbiljan zdravstveni problem. Postoje velike razlike u incidenci osteoporoze između različitih zemalja, pa i u okviru samih država. Smatra se da razlike u ekonomskom statusu mogu biti objašnjenje za ovakve razlike. Prevalenca osteoporoze u Svetu iznosi 8-10%. Preko 8,9 miliona preloma godišnje u Svetu je posledica osteoporoze. Od toga se više od jedne trećine dogodi u Evropi. Prema podacima iz 2010. godine u Evropskoj uniji (EU) 22 miliona žena i 5,5 miliona muškaraca boluje od osteoporoze (Hernlund et al., 2013; Ugrešić i sar., 2011).

U SAD i Evropi oko 30% žena u postmenopauzi boluje od osteoporoze. Očekuje se da preko 40% žena i 15-30% muškaraca sa osteoporozom doživi jedan ili više preloma do kraja života (Melton et al., 1992; Randell et al., 1995).

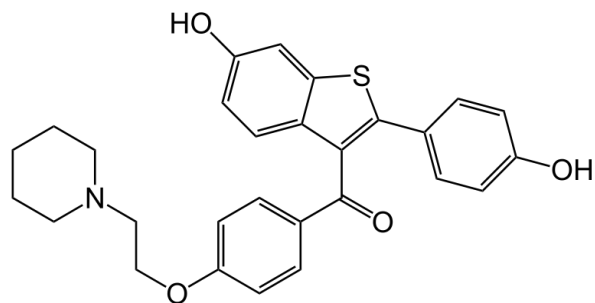
U zemljama EU se u narednih 25 godina očekuje porast broja osoba starijih od 65 godina za 50,6%. U istom periodu se očekuje povećanje broja muškaraca starijih od 85 godina za 129%, dok je očekivani porast broja žena starijih od 85 godina 73% (Hernlund et al., 2013). Produžen životni vek i način života sa nedostatkom fizičke aktivnosti dovode do stalnog povećanja broja

obolelih od osteoporoze poslednjih godina, te se očekuje da broj obolelih bude udvostručen u narednih 30-40 godina (Reginster and Burlet, 2006).

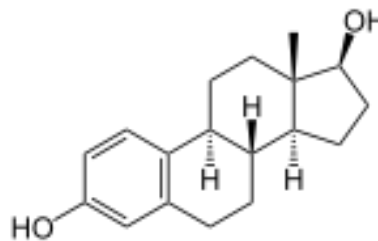
1.2. Raloksifen

Raloksifen je selektivni modulator estrogenih receptora (selective estrogen receptor modulators - SERM) koji se koristi u prevenciji i terapiji osteoporoze i za smanjenje rizika od invazivnog raka dojke u postmenopauzi (Rang i sar., 2005; Scott et al., 1999; Snyder et al., 2000). Zahvaljujući većoj selektivnosti za pojedina tkiva raloksifen ispoljava manje neželjenih dejstava od starijih predstavnika SERM, npr. tamoksifen (Chen et al., 2010).

Kao što se može videti na slikama 1. i 2. raloksifen nema osnovnu strukturu estrogenih hormona, ali na nekim tkivima, prvenstveno kostima, ispoljava estrogene efekte. Na taj način raloksifen izaziva dozno-zavisno povećanje aktivnosti osteoblasta i smanjenje aktivnosti osteoklasta i tako smanjuje gubitak koštane mase kod žena u menopauzi. Na nekim drugim tkivima (uterus i dojka) raloksifen blokira estrogene efekte i na taj način smanjuje rizik od nastanka invazivnog raka dojke. (Black et al., 1994; Bryant et al., 1999; Rang i sar., 2005). Studije su pokazale da raloksifen ispoljava pozitivne efekte na lipidni status snižavajući nivo ukupnog i LDL holesterola (Delmas et al., 1997; Scott et al., 1999).



Slika 1. Struktura raloksifena



Slika 2. Struktura estradiola

Od neželjenih dejstava raloksifena najčešće se javljaju naleti vrućine i grčevi u nogama. Najozbiljnije neželjeno dejstvo raloksifena je venska tromboembolija, te je raloksifen kontraindikovan kod već postojeće tromboembolijske bolesti (Azevedo et al., 2003; Rang i sar., 2005; Ugrešić i sar., 2011). Primena raloksifena se ne preporučuje ženama koje planiraju trudnoću (Eli Lilly and Company, 1997).

Farmakokinetika raloksifena

Resorpcija raloksifena kod ljudi iznosi 63%, međutim, zbog izraženog metabolizma, koji počinje već u crevima, biološka raspoloživost ovog leka posle *per os* primene je mala. Kod ljudi, bioraspoloživost raloksifena iznosi 2%, a kod Wistar pacova 39%. Dodatni problem predstavlja i značajna interindividualna varijabilnost farmakokinetike raloksifena (Kosaka et al., 2011; Lindstrom et al., 1984; Mizuma, 2009; Morello et al., 2003; Ram et al., 2011; Rang i sar., 2005; Snyder et al., 2000). Glavni metaboliti raloksifena su u formi glukuronida i sulfata (Jeong et al., 2004). Ipak, najveći deo *per os* unetog leka podleže glukuronidaciji pri čemu nastaju 6-β i 4'-β-glukuronid, metaboliti raloksifena koji nemaju farmakološko delovanje (Hochner-Celnikier, 1999; Kemp et al., 2002). Stvaranje glukuronida raloksifena odvija se posredstvom jetrenih i intestinalnih izoformi enzima uridil-difosfat-glukuroniltransferaze, UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9 i UGT1A10. U crevima se nalaze sve četiri izoforme enzima UGT, dok u jetri nedostaju UGT1A8 i UGT1A10, tako da veći procenat glukuronida raloksifena nastaje u crevima. UGT1A1 i UGT1A8 stimulišu formiranje i 6-β i 4'-β-glukuronida, dok posredstvom UGT1A10 nastaje samo 4'-β-glukuronid (Jeong et al., 2005; Mizuma, 2009; Trdan Lušin, 2011; Trdan Lušin, 2012).

Volumen distribucije raloksifena iznosi 2,348 L/kg (Heringa, 2003; Snyder et al., 2000). Preko 95% resorbovanog raloksifena i njegovih metabolita se vezuje za proteine plazme. Podaci

istraživanja ukazuju da, ukoliko se raloksifen primenjuje zajedno sa varfarinom, dolazi do skraćenja protrombinskog vremena za oko 10% (Eli Lilly and Company, 1997).

Poluvreme eliminacije raloksifena iznosi oko 32 sata. Najveći deo leka se eliminiše fecesom, a u urinu se mogu naći samo zanemarljive količine (Rang i sar., 2005; Scott et al., 2000).

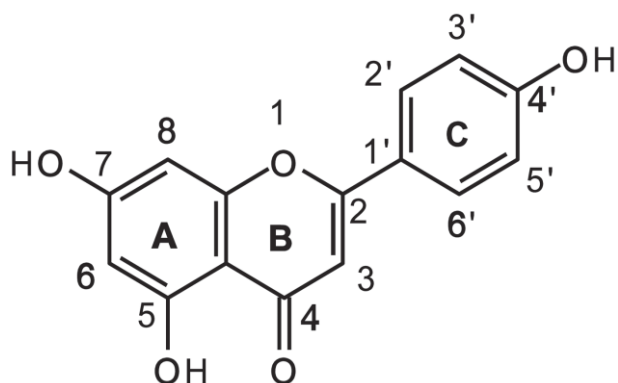
I kod ljudi i kod pacova glavni metabolički put raloksifena je glukuronidacija i zbog toga su pacovi dobar eksperimentalni model za ispitivanje farmakoloških i farmakokinetičkih osobina raloksifena (Dalvie et al., 2008). Razlika u metabolizmu raloksifena kod ljudi i pacova je što se u organizmu pacova raloksifen u najvećem procentu metaboliše do 6- β -glukuronida, dok je glavni metabolit kod ljudi 4'- β -glukuronid (Dodge et al., 1997; Jeong et al., 2005).

1.3. Apigenin

Flavonoidi spadaju u najveću grupu biljnih polifenola. Po hemijskoj strukturi to su difenil propanoidi. Flavonoidi se u voću i povrću najčešće nalaze vezani za šećere, u obliku glikozida. Veliki broj istraživanja je potvrdio antioksidantni potencijal flavonoida i njihovu sposobnost vezivanja slobodnih kiseoničnih radikala. Postoje podaci da flavonoidi ispoljavaju antiinflamatorno i antioksidativno dejstvo, kao i da imaju protektivan efekat u sprečavanju kardiovaskularnih bolesti i maligniteta, dok neke studije pokazuju odsustvo zaštitnog uticaja (Kumar and Pandey, 2013; Lefort and Blay, 2013; Patel D. et al., 2007; Ross and Kasum, 2002; Shukla and Gupta, 2010).

Svetsko tržište dijetetskih suplemenata je procenjeno na više od 151 milijardu dolara, stoga činjenica da su flavonoidi često zastupljeni u biljnim i dijetetskim suplementima ukazuje na ogroman finansijski značaj njihove primene (BBC research, 2011; Patel JMA, 2008).

Među flavonoidima, po farmakološkom potencijalu izdvaja se apigenin (slika 3). Apigenin je prirodni flavonoid, 4',5,7 trihidroksi flavon, prisutan u velikom broju biljaka, najčešće u formi glikozidnog konjugata. Nakon unošenja u organizam apigenin se u intestinalnom traktu čoveka hidrolizuje delovanjem bakterijskih enzima (El Dib et al., 2014; Hertog et al., 1995; Janssen et al., 1998; Patel D. et al., 2007).



Slika 3. Hemijska struktura apigenina

Biljke bogate apigeninom i drugim flavonoidima od davnina su korišćene u tradicionalnoj kineskoj medicini za lečenje različitih stanja, pa tako i oboljenja jetre. Rezultati različitih istraživanja potvrđuju hepatoprotektivno dejstvo apigenina. Kod eksperimentalnih životinja je utvrđeno sniženje aktivnosti serumskih transaminaza i sprečavanje smanjenja nivoa redukovano glutationa kada su pored hepatotoksičnog agensa primale apigenin (Zheng et al., 2005).

U ispitivanju na laboratorijskim životinjama ekstrakt biljke *Markhamia platycaly*, koja sadrži apigenin, pokazao je hepatoprotektivan efekat koji je uporediv sa efektima silimarina na sprečavanje porasta jetrenih transaminaza. U istom ispitivanju navedeni ekstrakt je pokazao antioksidativni efekat sličan delovanju L-askorbinske kiseline (El Dib et al., 2016).

Dosadašnje studije ukazuju da postoje značajne razlike u dnevnom unosu flavonoida u različitim delovima Sveta. Tako stanovnici Zapadne Evrope i SAD unose oko 13 mg flavonoida dnevno, dok u pojedinim azijskim zemljama taj unos iznosi i do 64 mg/dan. Prema rezultatima tih istraživanja, ishrana bogata antioksidantnim flavonoidima u značajnoj meri smanjuje rizik od nastanka ishemijske bolesti srca i njenih komplikacija (Hertog et al., 1995).

Apigenin podleže fazi II metabolizma u crevima i tako može stupiti u klinički značajnu interakciju sa raloksifenom, koji takođe podleže konjugaciji u crevima (Liu and Hu, 2002; Setchell et al., 2003). *In vitro* ispitivanja su pokazala da apigenin može povećati biološku raspoloživost raloksifena ukoliko se apigenin i raloksifen primenjuju istovremeno (Jeong et al., 2004). Dalja ispitivanja su pokazala da apigenin može povećati bioraspoloživost raloksifena i *in vivo* (Chen et al., 2010). To može biti korisno ukoliko bi se ovakav efekat iskoristio za nove formulacije raloksifena koje bi pokazale veću bioraspoloživost i veću efikasnost raloksifena. Sa druge strane, ukoliko slučajno dođe do interakcije apigenina i raloksifena kao posledica redovne terapije raloksifenom i suplementacije apigeninom, može doći i do potencijalno toksičnih efekata raloksifena (Leszek et al., 2005).

S obzirom da je potencijal korisnih dejstava apigenina visok i da se radi o flavonoidu koji je prisutan u svakodnevnoj ishrani u našoj sredini, a da još uvek nedostaje dovoljan broj kvalitetnih prekliničkih i kliničkih studija, u ovom radu je ispitan uticaj apigenina na bioraspoloživost raloksifena, uticaj na parametre hemostaze, kao i zaštitni uticaj apigenina na funkciju jetre i bubrega životinja izloženih terapijskoj dozi raloksifena i toksičnoj dozi paracetamola.

1.4. Žučne kiseline

Žučne kiseline i njihovi derivati promovišu prolazak lekova kroz biološke membrane i tako utiču na farmakokinetičke osobine tih lekova (Stojančević et al., 2013). One mogu poboljšati resorpciju lekova u tankom crevu, kroz kožu, pluća, nazalnu i bukalnu sluzokožu (Mikov et al., 2003). Sintetski derivati žučnih kiselina mogu olakšati prolazak lekova kroz krvno-moždanu barijeru (Mikov et al., 2004; Vasović et al., 2014; Lalić-Popović et al., 2013).

Mehanizmi delovanja žučnih kiselina nisu u potpunosti utvrđeni, ali se smatra da one svoj efekat ispoljavaju menjajući mehaničke karakteristike same membrane, a da je solubilizirajući efekat manje značajan (Yang et al., 2009). One povećavaju permeabilnost mukozne membrane slabljenjem međucelijskih veza, čime se potencira prolazak lekova paracelularnim putem. Formiranjem micela sa hidrosolubilnim i slabo rastvorljivim lekovima žučne kiseline povećavaju njihovu rastvorljivost i transcelularni transport. Interakcijom sa membranskim lipidima i proteinima žučne kiseline mogu dodatno uticati na resorpciju lekova (Samstein et al., 2008; Sayani and Chien, 1996). Žučne kiseline, snižavanjem površinskog napona bioloških membrana i stimulacijom paracelularnog prolaza supstanci koje se nepotpuno resorbuju, takođe mogu značajno uticati na biološku raspoloživost lekova (Sayani and Chien, 1996).

Pored uticaja na farmakokinetiku lekova, žučne kiseline imaju određene farmakodinamske osobine, zbog čega prekliničke i kliničke studije ispituju bezbednost i efikasnost njihove farmakoterapijske primene. Ovim studijama je potvrđen hipoglikemijski i hipolipidemijski efekat žučnih kiselina, a ursodeoksiholna kiselina se koristi u lečenju oboljenja jetre i žučnih puteva (Lefebvre et al., 2009; Stiehl et al., 1994).

U nekoliko *in vivo* studija potvrđeno je da soli žučnih kiselina mogu da povećaju resorpciju i bioraspoloživost antibiotika kada su primenjeni zajedno u kombinaciji. Zahvaljujući ovom efektu antibiotici u kombinaciji sa žučnim kiselinama uzrokuju manji poremećaj normalne

crevne flore nego kada su sami primenjeni (Golocorbin-Kon et al., 2009; Mrestani et al., 2003; Suvajdzic et al., 2015).

Natrijumova so deoksiholne kiseline (natrijum-deoksiholat) je izabrana za ovo ispitivanje jer se ova žučna kiselina često koristi u različitim formulacijama u kojima se pokazala kao dobar promoter resorpcije (Samstein et al., 2008).

1.5. Oksidativni stres

Jetra je najveći organ u ljudskom organizmu, čija je glavna uloga metabolizam hrane i lekova. Poremećaji funkcije jetre mogu biti uzrokovani autoimunim bolestima, virusnim infekcijama, toksičnim supstancama, kao i značajnim promenama u ishrani. Teži oblici oštećenja jetre mogu biti izazvani lekovima (paracetamol, doksorubicin, ciklosporin, izoniazid, rifampicin), ali i drugim ksenobioticima, kao što su etanol i ugljen tetrahlorid (Bhakuni et al., 2016; Ingawale et al., 2014; Singh et al., 2015). Najveći broj lekova u Sjedinjenim američkim državama nije dobio dozvolu za puštanje u promet, ili je povučen sa tržišta od strane Američke agencija za hranu i lekove (Food and Drug Administration – FDA) upravo zbog utvrđene hepatotoksičnosti tih lekova (Ostapowicz et al., 2002; Pandit et al., 2012).

Patofiziološka osnova hepatotoksičnosti izazvane lekovima nije do kraja razjašnjena, ali je poznato da je najčešće inicirana hepatotoksičnim metabolitima, koji nastaju u prvoj fazi metabolizma lekova. Ovi metaboliti često uzrokuju inhibiciju mitohondrija i nagomilavanje reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) koje indukuju nastanak oksidativnog stresa. Oksidativni stres predstavlja neravnotežu između toksičnih efekata koje uzrokuju reaktivne kiseonične vrste i odbrambene sposobnosti organizma da neutrališe reaktivne intermedijere ili popravi/ukloni nastala oštećenja. Oksidativni stres dovodi do oštećenja i smrti ćelija što može uzrokovati različita oboljenja jetre i bubrega (Gu and Manautou, 2012; Corsini and Bortolini, 2013).

S obzirom da neki lekovi mogu biti hepatotoksični i kada se primenjuju u terapijskim dozama neophodno je ispitati mogućnost smanjenja njihovog hepatotoksičnog potencijala ako bi se primenjivali u formulacijama sa hepatoprotektivnim supstancama (Madrigal-Santillan et al., 2014; Singh et al., 2015). Danas su to najčešće prirodni antioksidansi, naročito fitopreparati, koji se sve više koriste za prevenciju i terapiju oboljenja jetre. Gotovo polovina svih proizvoda koji se koriste za terapiju oboljenja jetre su biljnog porekla, ili su derivati dobijeni iz biljaka (Rašković et al., 2014; Rašković et al., 2015; Zhang et al., 2013). Značajno mesto u fitoterapiji oboljenja jetre zauzimaju flavonoidi, koji se nalaze u velikom broju biljaka i čine značajne sastojke svakodnevne ljudske ishrane. (Kumar and Pandey, 2013; Yao et al., 2004). Među flavonoidima se izdvaja apigenin, 4',5,7-trihidroksi flavon, koji ima brojna farmakološka svojstva, a pritom ne ispoljava klinički značajnu toksičnost. Apigenin, koji je u značajnom procentu prisutan u mnogobrojnim biljkama našeg podneblja, ima različit terapijski potencijal kao antiinflamatorni, antioksidantni i antikancerski agens (Lefort and Blay, 2013; Nabavi et al., 2015; Patel D. et al., 2007). Smatra se da apigenin može imati protektivnu ulogu i kod drugih bolesti uzrokovanih oksidativnim procesima, kao što su kardiovaskuarne i neurodegenerativne bolesti (Shukla and Gupta, 2010). Međutim, hepatoprotektivna uloga apigenina nije dovoljno ispitana. Stoga je cilj ovog istraživanja da se utvrdi efikasnost apigenina u smanjenju oštećenja jetre izazvanog toksičnom dozom paracetamola.

1.6. Značaj ispitivanja

Osteoporoza je bolest mišićno-koštanog sistema koja se danas leči različitim grupama lekova, među kojima je i raloksifen. S obzirom na nisku biorasploživost raloksifena (2%) i individualne razlike u biorasploživosti ovog leka, postoji potreba za novim formulacijama raloksifena za peroralnu primenu. *In vitro* studije pokazuju da raloksifen i apigenin podležu fazi

II metabolizma u crevima i da apigenin može dovesti do smanjene konjugacije raloksifena *in vitro*. Međutim, ne postoje podaci o interakciji između raloksifena i apigenina *in vivo*. Takođe, prema dostupnoj literaturi, ne postoje podaci o interakciji između raloksifena i žučnih kiselina, koje su poznate kao promoteri resorpcije lekova.

Stoga bi nova formulacija raloksifena u kombinaciji sa apigeninom i natrijum – deoksiholnom kiselinom mogla doprineti većoj bioraspoloživosti raloksifena i efikasnosti terapije osteoporoze.

Veliki broj ispitivanja je potvrdio antiinflamatorno, antioksidantno i antikancersko delovanje apigenina, ali nema dovoljno podataka o njegovim hepatoprotektivnim efektima. Iako se apigenin u visokom procentu nalazi u voću, začinskom i lekovitom bilju koje svakodnevno unosimo, apigenin se ne nalazi u doziranim farmaceutskim oblicima (npr. kapsulama) niti su zdravstveni radnici dovoljno upoznati sa farmakološkim potencijalom ovog flavonoida. Potvrda hepatoprotektivnog dejstva apigenina bi mogla dovesti do njegove racionalnije upotrebe u prevenciji i terapiji oboljenja jetre.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je bio da se primenom odgovarajućih metoda ispita:

1. Uticaj apigenina i natrijum-deoksiholata na biološku raspoloživost raloksifena kod pacova
2. Uticaj apigenina i natrijum-deoksiholata na hematološke i parametre pokazatelje funkcije jetre i bubrega u serumu eksperimentalnih životinja tretiranih terapijskom dozom raloksifena
3. Uticaj apigenina na vrednosti parametara oksidativnog stresa u homogenatu jetre i na histološke promene u jetri eksperimentalnih životinja izloženih oksidativnom stresu primenom paracetamola

3. RADNE HIPOTEZE

Na osnovu prethodno definisanih ciljeva istraživanja postavljene su sledeće hipoteze:

1. Primena apigenina i natrijum-deoksiholata u kombinaciji sa raloksifenom značajno povećava biološku raspoloživost raloksifena
2. Apigenin i natrijum-deoksiholat u kombinaciji sa raloksifenom ne dovode do poremećaja hemostaze, kao ni pokazatelja funkcije jetre i bubrega u serumu eksperimentalnih životinja
3. Apigenin sprečava poremećaje izazvane oksidativnim stresom indukovanim toksičnom dozom paracetamola.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Eksperimentalne životinje

Ispitivanje je rađeno u junu i septembru 2014. godine, na Katedri za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Ispitivanje je sprovedeno na polno zrelim, belim laboratorijskim pacovima soja Wistar, muškog pola, telesne mase 200-350 grama, odgajanih na farmi za eksperimentalne životinje Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Laboratorijske životinje su boravile u Ehret Uni-Protect ormanima za čuvanje laboratorijskih životinja, pod standardnim uslovima na Katedri za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu (slike 4 i 5). Životinje su čuvane na prosečnoj temperaturi 20-25°C, bile su izložene smeni dana i noći u trajanju od po 12 časova i bio im je omogućen slobodan pristup vodi i hrani. Briga o životinjama i sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu sa etičkim načelima rada sa laboratorijskim životinjama. Izvođenje oglada je odobrila Etička komisija Univerziteta u Novom Sadu dajući svoju saglasnost za plan ovog ispitivanja.



Slike 4. i 5. Ehret Uni-Protect ormani za čuvanje laboratorijskih životinja na Katedri za farmakologiju, toksikologiju i kliničku farmakologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu

4.2. Supstance korišćene u eksperimentima

U eksperimentima su korišćene sledeće supstance:

- raloksifen (*Raloxifene hydrochloride*, Sigma-Aldrich, Nemačka)
- deoksiholna kiselina (*Deoxycholic acid*, Sigma Chemicals Co, St Louis, SAD)
- apigenin (*4',5,7-trihydroxyflavone*, Alfa Aesar GmbH&Co.KG, Nemačka)
- paracetamol (*Acetaminophen*, Sigma-Aldrich, Nemačka)
- fiziološki rastvor (*Natrii chloridi infundibile 0,9% 500 ml*, Hemofarm, Srbija)
- uretan (*Urethan*, Sigma Chemicals Co, St Louis, SAD)

Pre primene, raloksifen, apigenin i natrijum-deoksiholat su prethodno rastvoreni u fiziološkom rastvoru na temperaturi 70°C u ultrazvučnom kupatilu i zatim rashlađeni na 37°C (Choi et al., 2013; Forouzandeha et al., 2013).

Doza raloksifena preračunata je iz terapijske dnevne doze za čoveka (60mg), pomoću Clarc-ove formule koja se koristi za određivanje doza za laboratorijsko-eksperimentalne životinje (Jakovljević, 2006). S obzirom da je na osnovu formule izračunata doza od 5,59 mg/kg, u eksperimentu je zbog potencijalnih gubitaka prilikom rastvaranja raloksifena korišćena doza od 6 mg/kg.

$$\text{Doza raloksifena za pacove (mg/kg)} = \frac{\text{ekvivalent na doza za čoveka (mg/kg)}}{\sqrt[3]{\text{masa životinje (kg)} / \text{masa čoveka (kg)}}} = 5,59 \text{ mg/kg}$$

(Formula 1)

Doza apigenina koja je primenjivana tokom 7 dana jednom dnevno iznosila je 10 mg/kg (Chen et al., 2010).

Doza deoksiholne kiseline koja je primenjivana tokom 7 dana jednom dnevno iznosila je 4 mg/kg.

4.3. Tretman i podela eksperimentalnih grupa

Za ispitivanje uticaja apigenina i natrijum-deoksiholata na bioraspoloživost raloksifena u krvi pacova, određivanje količine raloksifena u urinu i fecesu, kao i na ispitivanje uticaja na bihemijske parametre i hemostazu, životinje su metodom slučajnog izbora podeljene u sledeće grupe:

1. Kontrolna (K), koja je tokom 7 dana *per os*, pomoću gastrične sonde, tretirana fiziološkim rastvorom, 10 ml/kg
2. Eksperimentalna (RAL p.o.), pretretirana tokom 7 dana fiziološkim rastvorom, a potom, 24 sata pre žrtvovanja, gastričnom sondom tretirana *per os* raloksifenom, u dozi od 6 mg/kg telesne mase (terapijska doza raloksifena)
3. Eksperimentalna (RAL i.v.), pretretirana tokom 7 dana fiziološkim rastvorom, a potom 24 sata pre žrtvovanja, tretirana intravenski raloksifenom, u dozi od 6 mg/kg telesne mase
4. Eksperimentalna (RAL p.o. + ŽK), pretretirana tokom 7 dana natrijum-deoksiholatom (4 mg/kg), a potom, 24 sata pre žrtvovanja, pomoću gastrične sonde tretirana *per os* raloksifenom, u dozi od 6 mg/kg telesne mase
5. Eksperimentalna (RAL i.v. + ŽK), pretretirana tokom 7 dana natrijum-deoksiholatom (4 mg/kg), a potom, 24 sata pre žrtvovanja, tretirana intravenski raloksifenom, u dozi od 6 mg/kg telesne mase
6. Eksperimentalna, (RAL p.o. + ŽK + API), pretretirana tokom 7 dana natrijum-deoksiholatom (4 mg/kg) i apigeninom (10 mg/kg) *per os*, a potom, 24 sata pre

žrtvovanja, pomoću gastične sonde tretirana *per os* raloksifenom, u dozi od 6 mg/kg telesne mase

7. Eksperimentalna, (RAL i.v. + ŽK + API), pretretirana tokom 7 dana natrijum-deoksiholatom (4 mg/kg) i apigeninom (10 mg/kg) *per os*, a potom, 24 sata pre žrtvovanja, tretirana intravenski raloksifenom, u dozi od 6 mg/kg telesne mase
8. Eksperimentalna, (RAL p.o. + API), pretretirana tokom 7 dana apigeninom (10 mg/kg) *per os*, a potom, 24 sata pre žrtvovanja, gastičnom sondom tretirana *per os* raloksifenom, u dozi od 6 mg/kg telesne mase
9. Eksperimentalna, (RAL i.v. + API), pretretirana tokom 7 dana apigeninom (10 mg/kg) *per os*, a potom, 24 sata pre žrtvovanja, tretirana intravenski raloksifenom, u dozi od 6 mg/kg telesne mase
10. Eksperimentalna (RAL_{HRON}), grupa životinja koja je tokom 14 dana tretirana raloksifenom *per os*, u dnevnoj dozi od 6 mg/kg telesne mase, kojom je ispitivan uticaja hronične primene raloksifena na biohemijske parametre i parametre hemostaze.

U svakoj grupi je bilo po 6 životinja.

Za ispitivanje uticaja apigenina na biohemijske parametre u serumu pacova, uticaja na enzime oksidativnog stresa, kao i patohistološke promene u jetri pacova izazvane primenom toksične doze paracetamola, životinje su metodom slučajnog izbora podeljene u sledeće grupe:

1. Kontrola, koja je tokom 6 dana *per os*, pomoću gastične sonde, pretretirana fiziološkim rastvorom, 10 ml/kg, (K)

2. Eksperimentalna (PAR), pretretirana tokom 6 dana fiziološkim rastvorom rastvorom, a potom, 24 sata pre žrtvovanja, tretirana gastričnom sondom paracetamolom, *per os*, u dozi od 600 mg/kg telesne mase (toksična doza)
3. Eksperimentalna, (API), pretretirana tokom 6 dana apigeninom, 10 mg/kg telesne mase, *per os*
4. Eksperimentalna, (PAR + API), pretretirana tokom 6 dana apigeninom, 10 mg/kg, *per os*, a potom, 24 sata pre žrtvovanja, tretirana gastričnom sondom paracetamolom, *per os*, u dozi od 600 mg/kg telesne mase (toksična doza)

U svakoj grupi je bilo po 6 životinja.

Pacovima je neposredno pre žrtvovanja aplikovan uretan intraperitonealnom injekcijom, žrtvovanje je izvršeno kardiopunkcijom, dobijena krv je korišćena za određivanje biohemijskih parametara, a uzorci jetre su čuvani za kasnije određivanje enzima oksidativnog stresa i patohistološka ispitivanja.

4.4. Farmakokinetička ispitivanja

4.4.1. Prikupljanje uzoraka krvi

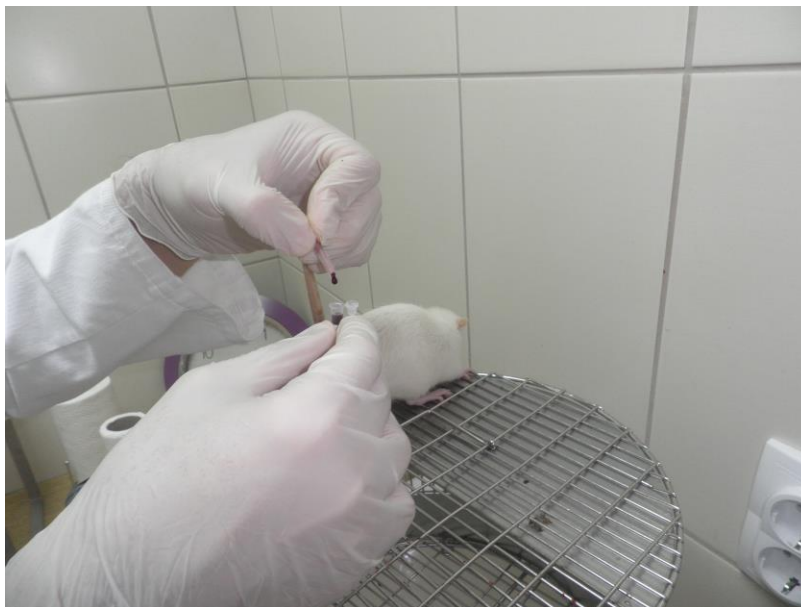
Uzorkovanje krvi kod životinja u svakoj grupi započeto je neposredno pre aplikacije raloksifena, bilo aplikovanog intravenski, bilo oralno. Prvi uzorak, koji je uzet neposredno pre aplikacije raloksifena bio je nulti uzorak krvi (0). Kod svake grupe vreme uzorkovanja krvi mereno je od momenta aplikacije raloksifena. Uzorkovano je ukupno 14 uzoraka krvi po životinji. Uzorci su uzimani u 0 (pre aplikacije raloksifena), 15, 30, 45, 60, 90, 120. minutu i

zatim nakon 3, 4, 6, 8, 10, 12 i 24 sata od početka uzorkovanja, zbog relativno dugog poluvremena eliminacije raloksifena kod pacova, koje iznosi 13,5 časova (Chen et al., 2010).



Slika 6. Imobilizacioni metabolički kavezi za pacove

Nakon aplikacije raloksifena životinje su bile stavljene u imobilizacione metaboličke kaveze za pacove (slika 6). Repovi su potopljeni u posudu sa toplom vodom kako bi se izazvala hiperemija. Zatim su repovi posušeni papirnim ubrusom, namazani vazelinom i masirani u svrhu izazivanja dodatne hiperemije. Potom je, na vrhu repa, lancetom napravljena perforaciju na koži i u adekvatno obeleženu mikroepruvetu iz repne vene pacova uzorkovano 200 μ L krvi (slika 7).



Slika 7. Uzorkovanje krvi iz repne vene pacova u mikroeprevetu

Uzorkovanje krvi kod kontrolnih grupa životinja izvršeno je kardiopunkcijom. Krv je uzorkovana u pravilno obeležene epruvete do iskrvarenja.



Slika 8. Centrifuga

Potom su uzorci krvi centrifugirani 10 minuta na 6000 obr/min (slika 8). Nakon centrifugiranja supernatant je pipetiran i prenet u nove, pravilno obeležene mikroeprovete. Do momenta analitičke obrade uzorci su odloženi i čuvani u obeleženim mikroeprovetama u zamrzivaču na temperaturi od -2°C .

4.4.2. Prikupljanje uzoraka urina

Uzorkovanje urina kod životinja u svim grupama započeto je neposredno nakon aplikacije raloksifena. Životinje od kojih je uzorkovan urin stavljene su u metaboličke kaveze sa separatorom za urin i feces u trajanju od 24 časa (slika 9). Za vreme boravka u metaboličkim kavezima životinje su imale slobodan pristup vodi i hrani (slika 10).



Slika 9. Separator za urin i feces



Slika 10. Posuda sa hranom i vodom

Nakon stavljanja eksperimentalne životinje u metabolički kavez, iz kiveta koje su namenjene za sakupljanje urina uzeta je celokupna količina urina u prvih 6 sati, između šestog i dvanaestog sata i između dvanaestog i dvadesetčetvrtog sata od početka sakupljanja urina i ostavljena u prethodno izmerene i adekvatno obeležene epruvete (slika 11). Vrednost mase prazne epruvete oduzeta je od vrednosti mase pune epruvete i na taj način dobijena ukupna količina urina koju je jedan pacov dao u šestom, dvanaestom i dvadestečetvrtom satu.

Do momenta analitičke obrade, urin je bio odložen u obeleženim epruvetama u zamrzivač i čuvan je na temperaturi od -2°C .



Slika 11. Izmerene i obeležene epruvete za sakupljanje urina i fecesa

4.4.3. Prikupljanje uzoraka fecesa

Uzorkovanje fecesa kod životinja u svim grupama započeto je neposredno nakon aplikacije raloksifena. Životinje od kojih je uzorkovan feces stavljene su u metaboličke kaveze sa separatorom za urin i feces u trajanju od 24 časa. Za vreme boravka u metaboličkim kavezima životinje su imale slobodan pristup vodi i hrani. Nakon stavljanja eksperimentalne životinje u metabolički kavez, iz kiveta koje su namenjene za sakupljanje fecesa uzeta je celokupna količina fecesa u prvih 6 sati, između šestog i dvanaestog sata i između dvanaestog i dvadesetčetvrtog sata od početka sakupljanja fecesa, izmerena njegova masa i ostavljena u adekvatno obeležene epruvete (slika 11).

Do momenta analitičke obrade, feces je bio odložen u obeleženim epruvetama u

zamrzivač i čuvan na temperature od -2°C . Neposredno pre analitičke obrade celokupna masa fecesa je homogenizovana sa 4 puta većim volumenom destilovane vode i na taj način je dobijen 5 puta razblažen homogenat fecesa. Ova činjenica je uzeta u obzir kod tumačenja rezultata.

4.4.4. Određivanje farmakokinetičkih parametara

Određivani su sledeći farmakokinetički parametri:

- λ_z (1/min) – konstanta eliminacije
- $t_{1/2}$ (min) – poluvreme eliminacije
- C_{last} ($\mu\text{g/ml}$) – koncentracija ispitivane supstance u poslednjoj tački merenja
- AUC (min $\cdot\mu\text{g/ml}$) – površina ispod krive (PIK)
- V_d (ml/kg) – volumen distribucije
- CL (ml/min/kg) – klirens
- MRT (min) – srednje retenciono vreme

4.4.5. Metoda za određivanje koncentracije raloksifena

Određivanje koncentracije raloksifena je vršeno korišćenjem tečne hromatografije kuplovane sa masenim spektrometrom (LCQ Fleet, *Thermo Scientific*).

LC-MS metod za određivanje koncentracije raloksifena u uzorcima seruma, urina i fecesa

Određivanje koncentracije raloksifena vršeno je na LC-MS uređaju po ranije publikovanoj metodi (Kumar et al., 2009). Isti hromatografski uslovi su korišćeni za određivanje koncentracije leka u serumu, urinu i u fecesu. Hromatografsko razdvajanje je vršeno na temperaturi od 30°C na *Hypersil GOLD* koloni (100mm x 3mm i.d., 3 μm) sa odgovarajućom pretkolumnom (*Agilent Technologies*, USA). Rađena je gradijentna elucija gde je mobilnu fazu A činila voda LC-MS čistoće sa 0,1% formične kiseline, a mobilnu fazu B činio acetonitril sa 0,1%

formične kiseline. Udeo faza prema vremenskim intervalima se menjao kao što je prikazano u tabeli 1. Protok mobilne faze iznosio je 0.5 ml/min. Injekcioni volumen iznosio je 10 μ l.

Maseni spektri snimani su pomoću LCQ Fleet™ Ion Trap Mass Spectrometer (*Thermo Fischer Scientific, Germany*), sa ESI (electron spray ionization) izvorom, ion trap masenim detektorom u pozitivnom modu snimanja. Podaci su prikupljeni i obrađivani pomoću Xcalibur software (*ThermoFisher Scientific Corporation, ver 2.0.7., 2007*).

Parametri rada LCQ Fleet masenog spektrometra bili su:

- temperature ion transfer tube 350 °C,
- sheat gas flow (azot) of 32.00,
- auxilary gas flow (helium) of 8.0.

Joni koji su praćeni su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. Udeo faza u toku gradijentne elucije

Vreme [min]	Faza A	Faza B
0,0	80	20
6,0	20	80
6,2	80	20
7,5	80	20

Tabela 2. Mase jona koji su praćeni na detektoru

Jedinjenje	Raloksifen	Raloksifen-4-glukuronid*	Raloksifen-6-glukoronid*
Parent m/z	474,2	650,2	650,2
Produkt m/z	112,1	112,0	112,0
Energija sudara	28	40	40

*uređaj je bio podešen samo da prati ove jone, za njih nije rađena kalibracija

Kalibracija LC-MS uređaja za određivanje koncentracije raloksifena u serumu

Standardni osnovni rastvor raloksifena koncentracije 1 mg/ml dobijen je odmeravanjem 1 mg raloksifena u ependorfu i dodavanjem 1 ml metanola. Iz standardnog osnovnog rastvora je dobijena serija kontrolnih uzoraka u metanolu i serija spajkovanih uzoraka u serumu.

Serum pacova koji nije tretiran lekom je spajkovano pri čemu je rađena serija rastvora. Nakon mešanja standarda i seruma u svakoj tački je rađeno vorteksovanje 30 sekundi. Dobijena je kalibraciona kriva sa 6 tačaka.

Spajkovani uzorak u serumu je dalje tretiran kao i uzorci eksperimentalnih životinja, odnosno uzimano je 75 µl spajkovanog uzorka i prebacivano u mikroeprijetu. Potom je dodato 25 µl metanola i 150 µl acetonitrila i smeša je homogenizovana 30 sekundi na vorteksu. Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3500 obr/s. Na uređaj LC-MS je injektovano 10 µl supernatanta. Rađena je i serija rastvora u metanolu koja je služila kao kontrola spajkovanim uzorcima i pripremana je na isti način.

Pri navedenim uslovima metod je specifičan (poređenje blank plazme i spajkovanog uzorka), utvrđeno je retenciono vreme 5,1 minut.

Metod je linearan u rasponu od 0,07-6 µg/ml ($R^2=0,9722$).

Recovery je rađen poređenjem površine pika spajkovanih uzoraka sa površinama pika kontrolnih uzoraka iste koncentracije tretiranih na isti način. Dobijen je recovery od 95.33 ± 7.12 .

Tačnost (ACC) je određena kao bliskost između izmerene i stvarne vrednosti koncentracija koja je trebala biti postignuta. Ponavljano je injektovanje sa po tri merenja za koncentracije 0,075, 1,75 i 6 µg/ml (Tabela 3). Za svaki nivo koncentracije pripremana su po tri odvojena uzorka. Tačnost je računata pomoću Formule 2.

$$ACC(\%) = \frac{100 \times (C_{srednje} - C_{izmereno})}{C_{izmereno}} \quad (\text{Formula 2})$$

ACC (*accuracy*) predstavlja vrednost tačnosti, $C_{srednje}$ je srednja vrednost tri merenja za svaki nivo koncentracije i $C_{izmereno}$ je izmerena pojedinačna koncentracija za svaki nivo koncentracije.

Preciznost je računata kao procenat relativne standardne devijacije (RSD%) za koncentraciju 0,075 i 1,75 $\mu\text{g/ml}$ koje su injektovane 10 puta iz istog uzorka (Tabela 3), a za izračunavanje je korišćena Formula 3.

$$RSD(\%) = \frac{100 \times SD}{\bar{x}} \quad (\text{Formula 3})$$

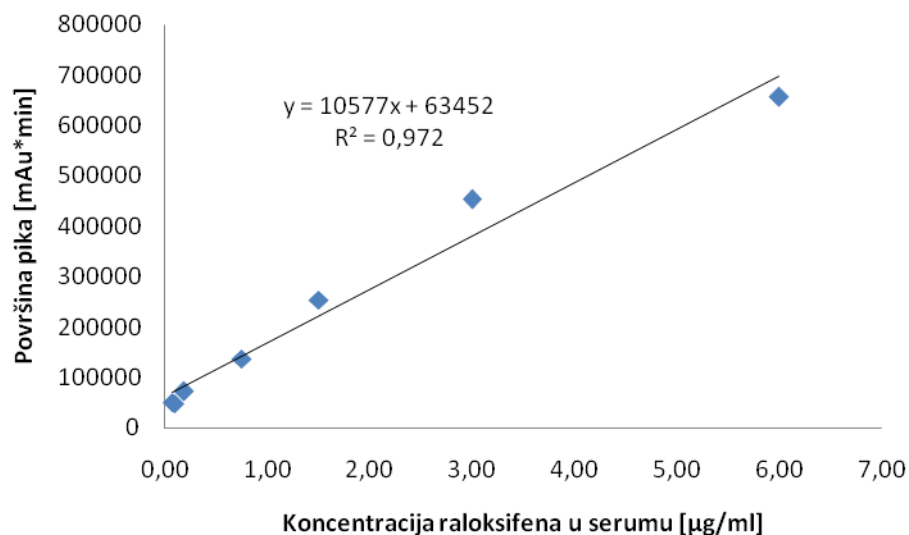
RSD je relativna standardna devijacija, SD je standardna devijacija i \bar{x} je srednja vrednost ponovljenih 10 merenja za jedan nivo koncentracije.

Standardi za određivanje preciznosti i tačnosti su praćeni u tri uzastopna dana i dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 3.

Limit detekcije (LOD) je određen kada je odnos signala i šuma iznosio 1:3 i iznosio je 0.002 $\mu\text{g/ml}$. Limit kvantifikacije (LOQ) je određen kada je odnos signal-šum iznosio 1:10 i iznosio je 0.03 $\mu\text{g/ml}$. U Tabeli 3. i Grafikonu 1. su prikazani rezultati kalibracije sa spajkovanim uzorcima seruma.

Tabela 3. Rezultati validacije LC-MS metoda.

Koncentracije u uzorcima seruma [$\mu\text{g/ml}$]	Tačnost (%ACC)		Preciznost (%RSD)	
	Unutar dana	Između dana	Unutar dana	Između dana
6	4,11-7,02	5,9-11,12	1,2-3,2	1,01-5,2
1,75	7,99-9,01	8,01-12,02	1,8-4,0	1,02-5,7
0,075	13,08-14,88	12,89-15,45		



Grafikon 1. Zavisnost površine pika od koncentracije raloksifena u serumu.

Kalibracija LC-MS uređaja za određivanje koncentracije raloksifena u urinu

Standardni osnovni rastvor raloksifena koncentracije 1 mg/ml dobijen je odmeravanjem 1 mg raloksifena u ependorfu i dodavanjem 1 ml metanola. Iz standardnog osnovnog rastvora je rađena serija kontrolnih uzoraka u metanolu i serija spajkovanih uzoraka u urinu.

Urin pacova koji nije tretiran lekom je spajkovao pri čemu je rađena serija rastvora. Nakon mešanja standarda i urina u svakoj tački je rađeno vorteksovanje 30 sekundi. Dobijena je kalibraciona kriva sa 6 tačaka.

Spajkovani uzorak u urinu je dalje tretiran kao i uzorci eksperimentalnih životinja, odnosno uzimano je 75 µl spajkovanog uzorka i prebacivano u mikroeprevetu. Potom je dodato 25µl metanola i 150µl acetonitrila i smeša je homogenizovana 30 sekundi na vorteksu. Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3500 obr/s. Na uređaj LC-MS je

injektovano 10 μ l supernatanta. Rađena je i serija rastvora u metanolu koja je služila kao kontrola spajkovanim uzorcima u urinu i pripremana je na isti način.

Pri navedenim uslovima metod je specifičan (poređenje blank urina i spajkovanog uzorka urina), utvrđeno je retenciono vreme 4,6 minuta.

Metod je linearan u rasponu od 0,04-6,6 μ g/ml ($R^2=0,9989$).

Recovery je rađen poređenjem površine pika spajkovanih uzoraka sa površinama pika kontrolnih uzoraka iste koncentracije tretiranih na isti način. Dobijen je recovery od $90,12 \pm 8,11$.

Tačnost je određena kao bliskost između izmerene i stvarne vrednosti koncentracija koja je trebala biti postignuta. Ponavljano je injektovanje sa po tri merenja za koncentracije 0,075, 1,75 i 6 μ g/ml (Tabela 4).

Preciznost je računata kao procenat relativne standardne devijacije (RSD%) za koncentraciju 0,075 i 1,75 μ g/ml koje su injektovane 10 puta iz istog uzorka (Tabela 4), a za izračunavanje je korišćena Formula 3.

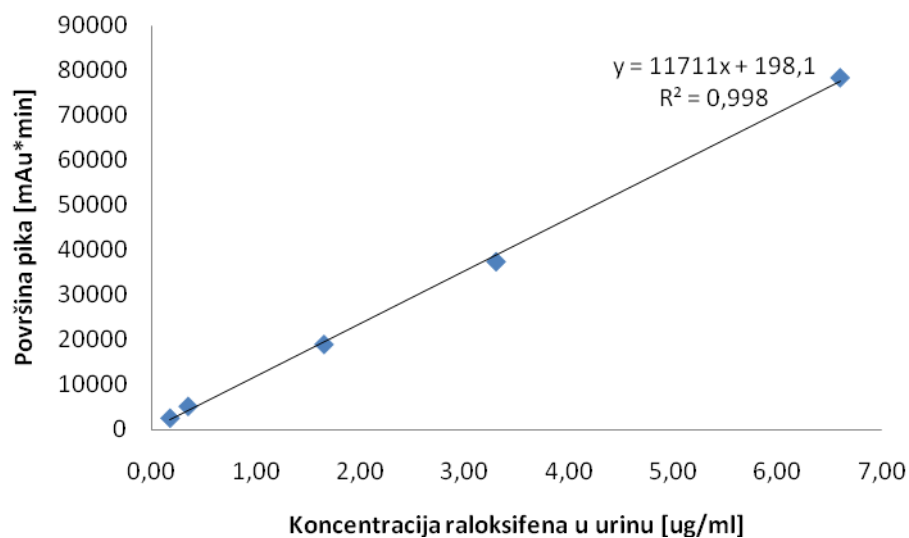
Standardi za određivanje preciznosti i tačnosti su praćeni u tri uzastopna dana i dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 4.

Limit detekcije (LOD) je određen kada je odnos signala i šuma iznosio 1:3 i iznosio je 0,007 μ g/ml. Limit kvantifikacije (LOQ) je određen kada je odnos signal-šum iznosio 1:10 i iznosio je 0,035 μ g/ml.

U Tabeli 4. i na Grafikonu 2. su prikazani rezultati kalibracije sa spajkovanim uzorcima urina.

Tabela 4. Rezultati validacije LC-MS metoda.

Koncentracije u uzorcima urina [$\mu\text{g/ml}$]	Tačnost (%ACC)		Preciznost (%RSD)	
	Unutar dana	Između dana	Unutar dana	Između dana
6	7,08-10,33	9,9-12,43	1,8-4,1	2,2-6,8
1,75	8,13-8,13	9,01-15,03	2,7-3,8	2,2-5,1
0,075	12,07-17,22	15,75-18,22		



Grafikon 2. Zavisnost površine pika od koncentracije raloksifena u urinu.

Kalibracija LC-MS uređaja za određivanje koncentracije raloksifena u fecesu

Standardni osnovni rastvor raloksifena koncentracije 1 mg/ml dobijen je odmeravanjem 1 mg raloksifena u ependorfu i dodavanjem 1 ml metanola. Iz standardnog osnovnog rastvora je rađena serija kontrolnih uzoraka u metanolu i serija spajkovanih uzoraka u fecesu.

Feces pacova koji nije tretiran lekom je spajkovani pri čemu je rađena serija rastvora. Nakon mešanja standarda i homogenata fecesa u svakoj tački je rađeno vorteksovanje 30 sekundi. Dobijena je kalibraciona kriva sa 6 tačaka.

Homogenat fecesa je rađen merenjem 1 g fecesa i dodavanjem 4 ml destilovane vode. Masa je homogenizovana u homogenizatoru a zatim prenošena u staklene konične epruvete. Epruvete su centrifugirane 5 minuta na 3500 obr/s a supernatan je dalje korišten za spajkovanje. Spajkovani uzorak homogenata fecesa je dalje tretiran kao i uzorci eksperimentalnih životinja odnosno uzimano je 75 µl spajkovanog uzorka i prebacivano u mikroepruvetu. Potom je dodato 25µl metanola i 150µl acetonitrila i smeša je homogenizovana 30s na vorteksu. Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3500 obr/s. Na uređaj LC-MS je injektovano 10 µl supernatanta. Pre određivanja koncentracije raloksifena u fecesu dobijene vrednosti koncentracije homogenata su množene sa 5.

Rađena je i serija rastvora u metanolu koja je služila kao kontrola spajkovanim uzorcima u homogenatu fecesa i pripremana je na isti način.

Pri navedenim uslovima metod je specifičan (poređenje blank urina i spajkovanog uzorka fecesa) utvrđeno je retenciono vreme 4,9 minuta.

Metod je linearan u rasponu od 0,17-6,6 µg/ml ($R^2=0,983$).

Recovery je rađen poređenjem površine pika spajkovanih uzoraka sa površinama pika kontrolnih uzoraka iste koncentracije tretiranih na isti način. Dobijen je recovery od $85,11 \pm 7,03$.

Tačnost je određena kao bliskost između izmerene i stvarne vrednosti koncentracija koja je trebala biti postignuta. Ponavljano je injektovanje sa po tri merenja za koncentracije 0,075, 1,75 i 6 µg/ml (Tabela 5).

Preciznost je računata kao procenat relativne standradne devijacije (RSD%) za koncentracije 0,075 i 1,75 µg/ml koje su injektovane 10 puta iz istog uzorka (Tabela 5) a za izračunavanje je korišćena Formula 3.

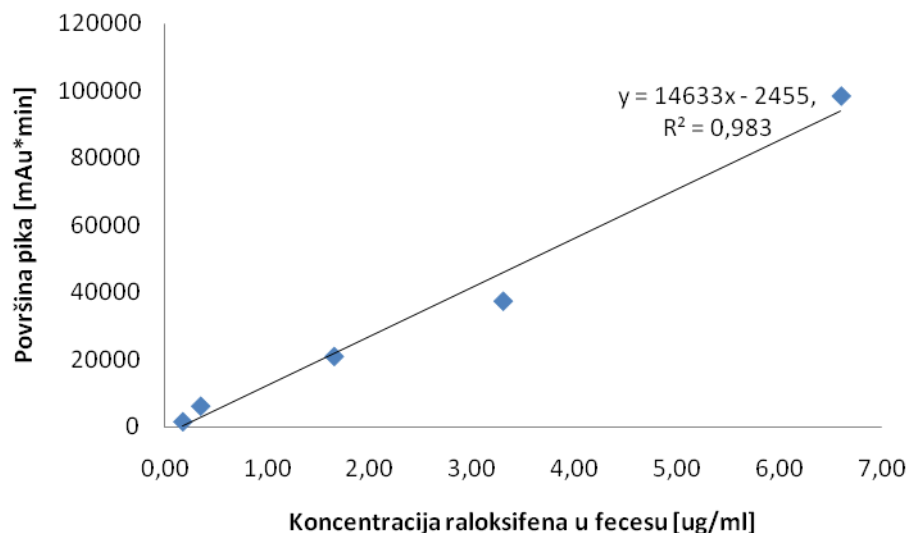
Standardi za određivanje preciznosti i tačnosti su praćeni u tri uzastopna dana i dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 5.

Limit detekcije (LOD) je određen kada je odnos signala i šuma iznosio 1:3 i iznosio je 0,05 µg/ml. Limit kvantifikacije (LOQ) je određen kada je odnos signal-šum iznosio 1:10 i iznosio je 0,1 µg/ml (Krishna RD, 2014).

U Tabeli 5 i na Grafikonu 3. su prikazani rezultati kalibracije sa spajkovanim uzorcima fecesa.

Tabela 5. Rezultati validacije LC-MS metode.

Koncentracije u uzorcima homogenata [µg/ml]	Tačnost (%ACC)		Preciznost (%RSD)	
	Unutar dana	Između dana	Unutar dana	Između dana
6	6,43-9,88	7,83-13,12	1,9-3,3	2,6-5,1
1,75	8,97-11,85	7,99-14,99	3,4-5,6	2,4-6,2
0,075	15,02-18,13	16,02-19,05		



Grafikon 3. Zavisnosti površine pika od koncentracije raloksifena u fecesu

4.4.6. Farmakokinetička analiza

Program WinNonLin (version 5.1., SCI software, Pharsight Corporation, Garz, NC, USA, 2005) je korišćen za računanje farmakokinetičkih parametara iz podataka koncentracija-vreme. Korišćena je nekompartmanska analiza. Maksimalna koncentracija (C_{max}) i vreme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije (t_{max}) su dobijeni direktno iz podataka. Početna koncentracija leka nakon i.v. davanja (C_0) je dobijena ekstrapolacijom krive koncentracija-vreme na y-osu.

Ukupna površina ispod krive koncentracija-vreme do merenog vremena (AUC_{0-t}) i ekstrapoliranog vremena u beskonačnost ($AUC_{0-\infty}$) je izračunata korišćenjem trapezoidalnog metoda (Formula 4 i 5). Koreliranjem vrednosti koncentracija-vreme sa vremenom dobija se kriva prvog momenta gde se trapezoidalnim metodom može izračunati površina ispod krive prvog momenta (AUMC) (Formula 6).

$$AUC_{0-t} = \int_0^t C_{pt} * dt \quad (\text{min} \cdot \mu\text{g/ml}) \quad (\text{Formula 4})$$

$$AUC_{0-\infty} = \int_0^t C_{pt} * dt + \frac{C_{pt}}{\lambda_z} = \int_0^{\infty} C_{pt} * dt \quad (\text{min} \cdot \mu\text{g/ml}) \quad (\text{Formula 5})$$

$$AUMC_{0-t} = \int_0^t t C_{pt} * dt \quad (\text{min}^2 \cdot \mu\text{g/ml}) \quad (\text{Formula 6})$$

C_{pt} je koncentracija u vremenu t , a dt je diferencijalna razlika vremena.

Konstanta eliminacije (λ_z) se dobija iz poslednjih tačaka krive u sistemu $\ln C_{pt}$ -vreme i određuje se linearnom regresijom, odnosno konstanta eliminacije je nagib prave u logaritamskom sistemu (Formula 7).

$$\lambda_z = \frac{\Delta \ln C_{pt}}{\Delta t} \quad (1/\text{min}) \quad (\text{Formula 7})$$

Poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$) je računato preko konstante eliminacije λ_z (Formula 8):

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda_z} \quad (\text{min}) \quad (\text{Formula 8})$$

Srednje vreme zadržavanja leka u organizmu (MRT) je računato preko površine ispod krive AUC, na osnovu Formule 9:

$$MRT = \frac{AUMC_{0-t}}{AUC_{0-t}} \quad (\text{min}) \quad (\text{Formula 9})$$

Ukupan klirens leka (CL) je izračunat preko Formule 10:

$$Cl = \frac{Doza}{AUC_{0-\infty}} \quad (\text{ml/min/kg}) \quad (\text{Formula 10})$$

Volumen distribucije (Vd) je određen korišćenjem date doze leka i izračunate AUC $0-\infty$ (Formula 11):

$$Vd = \frac{Doza}{AUC_{0-\infty} * \lambda_z} \quad (\text{ml/kg}) \quad (\text{Formula 11})$$

Statistička analiza farmakokinetičkih parametara

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (sr.vred \pm SD). Statistička poređenja između grupa eksperimentalnih životinja koje su primale raloksifen kao i grupa pretretiranih natrijum-deoksiholatom i/ili apigeninom su rađene testom analize varijanse (ANOVA). Razlike su smatrane statistički značajnim ako je $p < 0,05$. Statističke analize su rađene korišćenjem programa SPSS (version 17, Systat Software Inc., San Jose, CA).

4.5. Biohemijska i toksikološka ispitivanja

U serumu laboratorijskih životinja je određivana koncentracija jetrenih enzima - aspartat aminotransferaze (AST), alanin aminotransferaze (ALT), alkalne fosfataze (ALP), gama-glutamil transferaze (GGT) i direktnog bilirubina u cilju praćenja funkcije jetre, a određivana je i koncentracija uree, kreatinina i mokraćne kiseline, pokazatelja bubrežne funkcije. Sve analize su rađene prema standardnim spektrofotometrijskim metodama na automatskom sistemu za hemijske analize Olympus AU 400 (Hamburg, Nemačka).

4.5.1. Određivanje koncentracije aspartat aminotransferaze (AST)

Katalitička koncentracija aspartat aminotransferaze u serumu životinja je merena metodom IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine). U reakciji transaminacije, između L-aspartata i 2-ketoglutarata nastaje oksalacetat. Oksalacetat u sledećoj, indikatorskoj reakciji, katalizovanoj od strane malat dehidrogenaze, oksiduje NADH. U ovoj metodi promena brzine oksidacije NADH u indikatorskoj reakciji je proporcionalna koncentraciji AST (Majkić-Singh i sar., 1995; Spasić i sar., 2003).

4.5.2. Određivanje koncentracije alanin aminotransferaze (ALT)

Katalitička koncentracija alanin aminotransferaze u serumu životinja je merena metodom IFCC. U reakciji transaminacije, između L-alanina i 2-oksoglutarata nastaje piruvat. Piruvat u sledećoj, indikatorskoj reakciji, katalizovanoj od strane laktat dehidrogenaze, oksiduje NADH. U ovoj metodi promena brzine oksidacije NADH u indikatorskoj reakciji je proporcionalna koncentraciji ALT (Majkić-Singh i sar., 1995; Spasić i sar., 2003).

4.5.3. Određivanje koncentracije alkalne fosfataze (ALP)

Katalitička koncentracija alkaline fosfataze u serumu životinja je merena metodom IFCC. Supstrat za određivanje aktivnosti ALP je 4-nitrofenil-fosfat čijim se razlaganjem dobija 4-nitrofenol. Ovo jedinjenje u uslovima reakcije (pH 9,2) prelazi u 4-nitrofenoksidni jon koji je u hinoidnom obliku intenzivno žuto obojen sa maksimumom apsorbancije na 405 nm. Zbog toga brzina enzimske reakcije može da se prati direktno fotometrijskim merenjem, a metode koje se zasnivaju na ovom principu su brojne i razlikuju se po temperaturi na kojoj se reakcija odvija, vrsti i koncentraciji pufera, pH vrednosti, koncentraciji dodatog Mg^{2+} i zapremini uzorka (Dean, 2002).

4.5.4. Određivanje gama-glutamil transferaze (GGT)

Katalitička koncentracija gama-glutamil transferaze u serumu životinja je merena metodom IFCC. Određivanje nivoa gama-glutamil transferaze (GGT) u serumu vrši se spektrofotometrijski, "point of care" (POCT), na 37°C. Supstrat je L- γ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilid, akceptor je glicil-glicin.

Princip metode:

Serumska GGT katalizuje reakciju između L- γ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilida i glicil-glicina. U reakciji nastaje 3-karboksi-4-nitroanilin. Promena apsorbancija se meri na 405 nm na temperaturi 37°C i proporcionalna je aktivnosti enzima GGT (Persijn and Van der Slik, 1976).

4.5.5. Određivanje direktnog bilirubina

Koncentracija direktnog bilirubina je određivana kolorimetrijskom DPD metodom, koja je zasnovana na reakciji bilirubina i 2,5 dihlorofenildiazonium soli, pri čemu nastaje azobilirubinski kompleks. Prilikom određivanja direktnog bilirubina, serum životinja se prvo zakiseli s razblaženom HCl i zatim izmeša s diazotovanom sulfanilnom kiselinom pri čemu nastaje azobilirubin. U odsustvu akceleratora, kofein benzoata, reaguju samo konjugovani oblici bilirubina, reakcija se zaustavlja dodatkom rastvora askorbinske kiseline, a zatim se smeši dodaje alkalni rastvor tartarata i alikvot reagensa kofeina. Kofein dodat na kraju pomera pik apsorbancije od 585 na 598 nm. Intenzitet plave boje se meri na 598 nm (Landis and Pardue, 1978).

4.5.6. Određivanje koncentracije uree

Koncentracija uree u serumu životinja je određivana metodom GLDH-UV. U prvoj reakciji urea, pod uticajem enzima ureaze, hidrolizuje na amonijak i ugljen-dioksid. U indikatorskoj reakciji formirani amonijumovi joni reaguju sa α -ketoglutaratom, u reakciji katalizovanoj od strane glutamat dehidrogenaze (GLDH), gde istovremeno dolazi do oksidacije NADH. Smanjenje koncentracije NADH je direktno proporcionalno sa koncentracijom uree u uzorku (Spasić i sar., 2003).

4.5.7. Određivanje koncentracije mokraćne kiseline

Koncentracija mokraćne kiseline u serumu je određena enzimskom metodom pomoću N-metil-N-(4-aminofenil)-3-metoksianilin reagensa (Jelikić Stankov et al., 2003).

4.5.8. Određivanje koncentracije kreatinina

Koncentracija kreatinina u serumu životinja je određivana metodom Jaffe. U reakciji kreatinina sa alkalnim pikratom nastaje Janovski kompleks, koji je crvenonarandžaste boje.

Merenjem apsorbancije je određena koncentracija kreatinina (Spasić i sar., 2003).

4.6. Određivanje uticaja natrijum-deoksiholata i apigenina na parametre hemostaze kod eksperimentalnih životinja tretiranih terapijskom dozom raloksifena

Kao što je ranije rečeno, venska tromboembolija je najozbiljnije neželjeno dejstvo raloksifena. Raloksifen je kontraindikovano kod već postojeće tromboembolijske bolesti (Rang i sar., 2005; Ugrešić i sar., 2011). Stoga je u ovom radu ispitivan uticaj natrijum-deoksiholata i apigenina na parametre hemostaze kod životinja izloženih terapijskoj dozi raloksifena.

4.6.1. Određivanje aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTT)

Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vreme (APTT) predstavlja globalni "skrining" postupak (Kamal et al., 2007; Leung, 2006) koji se primarno koristi za evaluaciju abnormalnosti koagulacije unutrašnjeg puta, a takođe može da detektuje teške funkcionalne deficijencije faktora II, V, X ili fibrinogena. APTT se takođe koristi za praćenje efikasnosti terapije heparinom kod koga je produženo vreme koagulacije u zavisnosti od nivoa heparina. Kod pacijenata koji uzimaju oralne antikoagulanse, nivoi cirkulišućih faktora II, VII, IX i X su sniženi, i stoga se očekuje da APTT može da bude produženo (Bates et al., 2001; Eikelboom and Hirsh, 2006; Hirsh and Raschke, 2004; Olson et al., 1998).

Princip metode:

Faktori unutrašnjeg koagulacionog sistema se aktiviraju inkubacijom plazme sa optimalnom količinom fosfolipida i površinskog aktivatora. Dodatkom jona kalcijuma se započinje koagulacioni proces i posle toga se meri vreme stvaranja ugruška. Rezultati su prikazani u sekundama (sec) i kao odnos (R) između vremena stvaranja ugruška ispitivanog uzorka i vremena stvaranja ugruška kod normalne humane plazme.

4.6.2. Određivanje protrombinskog vremena (PT)

Protrombinsko vreme mereno Tromborel® S reagensom predstavlja brz, osetljiv “skrining” test poremećaja u okviru spoljašnjeg puta koagulacije (faktori II, V, VII i X). Zbog svoje visoke osetljivosti za ove faktore koagulacije Tromborel® S reagens je posebno podesan za uvođenje i praćenje oralne antikoagulantne terapije, za dijagnozu genetski uzrokovanih i stečenih deficijencija faktora koagulacije spoljašnjeg puta koagulacije i proveru sposobnosti sinteze jetre u hepatičnim poremećajima (Ansell et al., 2008; Poller, 1998; Quick et al., 1935).

Tromborel® S reagens sadrži liofilizovan humani placentalni tromboplastin (≤ 60 g/L), kalcijum hlorid (oko 1,5 g/L) i stabilizatore.

Princip metode:

Proces koagulacije započinje inkubacijom plazme sa optimalnom količinom tromboplastina i kalcijuma. Posle toga se meri vreme potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška. Rezultati su prikazani u sekundama i kao procenat u odnosu na normalne vrednosti protrombinskog vremena kod ljudi.

4.6.3. Određivanje fibrinogena

Nivo fibrinogena u plazmi može biti povišen ili snižen. Sniženi nivoi fibrinogena nađeni su u stečenoj i kongenitalnoj hipofibrinogenemiji ili afibrinogenemiji.

Stanja stečene deficijencije fibrinogena nastaju posebno kao rezultat intravaskularne proteolize fibrinogena trombinom, zmijskim otrovom ili plazminom. Osim toga, do umerenih hipofibrinogenemija može doći u slučaju smanjene produkcije, gubitaka u intravaskularnom prostoru ili povećane degradacije fibrinogena. Privremeno povećanje nivoa fibrinogena nađeno je kao rezultat ponašanja fibrinogena kao proteina akutne faze kod:

- tranzitorne hiperfibrinogenemije, koja se javlja posle operacija, trauma, infarkta miokarda i infekcija (Cooper and Douglas, 1991) i
- perzistentne hiperfibrinogenemije, koja se javlja kod pacijenata sa neoplazmama i hroničnim inflamatornim oboljenjima.

Do neznatnog povećanja fibrinogena dolazi sa godinama. Povišeni nivoi fibrinogena predstavljaju faktor rizika za kardiovaskularna oboljenja (Cook and Ubben, 1990).

Princip metode (modifikovana metoda po Clauss-u):

U citratnoj plazmi dolazi do koagulacije pri velikom višku trombina s obzirom da se fibrinogen prevodi u fibrin, pri čemu nastaje ugrušak. Vreme koagulacije je obrnuto srazmerno količini fibrinogena u uzorku.

Uzorcima krvi dodat je natrijum-citrat kao antikoagulans, nakon čega su uzorci centrifugirani na 2500 obrtaja u trajanju od 15 minuta. Nivo fibrinogena je određen po *Clauss* metodi pomoću komercijalnih kitova *Instrumentation Laboratory* (IL, Milan, Italija) i koagulometra ACL 9000 (IL, Milan, Italija) (Medić-Stojanoska et al., 2014; Palareti and Maccaferri, 1990).

4.6.4. Određivanje fibrin degradacionih produkata u plazmi

Prilikom razgradnje ugruška nastaju različiti produkti, od kojih je jedan D-dimer. Iako nije specifičan marker tromboze, D-dimer se u kombinaciji sa drugim kliničkim podacima koristi

za isključivanje prisustva duboke venske tromboze ili plućne embolije, kao i za procenu verovatnoće ponovnog nastajanja ugruška (Gavrilović, 2012; Petrović i sar., 2002).

D-dimer sadrži neo-epitop koji se formira unakrsnim vezivanjem susednih D domena s faktorom XIIIa. Tako nastali epitop prepoznaju antiserumi koji se koriste u kliničkim ispitivanjima (Dempfle, 2005). Innovance* D-DIMER test se koristi za kvantitativno određivanje fibrin degradacionih produkata u humanoj plazmi. Reagens sadrži polistirenske čestice kovalentno vezane za monoklonska antitela (MA-8D3, IL, Milan, Italija) koja aglutiniraju kada se mešaju sa uzorcima koji sadrže D-dimer. Struktura ovog molekula je stereosimetrična što uslovljava da se epitop za monoklonsko antitelo pojavljuje dva puta. Ovo ima za posledicu da je jedno antitelo dovoljno da započne reakciju aglutinacije, dolazi do zamućenja, što se detektuje turbidimetrijski (Medić-Stojanoska et al., 2014; Righini et al., 2008).

4.7. *In vivo* ispitivanje antioksidativne aktivnosti apigenina

Za *in vivo* ispitivanje antioksidativne aktivnosti apigenina korišćen je paracetamol u toksičnoj dozi od 600 mg/kg telesne mase. Paracetamol je prethodno rastvoren u fiziološkom rastvoru na temperaturi 70°C i pre primene rashlađen na 37°C, a zatim, 30 minuta nakon poslednje doze apigenina, rastvor paracetamola je aplikovan *per os* gastričnom sondom. Dvadeset četiri sata nakon primene rastvora paracetamola životinje su uvedene u anesteziju pomoću rastvora uretana (0,75 mg/kg) i žrtvovane kardiopunkcijom, u cilju uzimanja uzoraka krvi i jetre za dalja ispitivanja.

Homogenat jetre pripremljen je tako što se 1 g tkiva jetre homogenizovao sa TRIS-HCl puferom (pH=7,4), u odnosu 1:3, na temperaturi od 4°C. Za homogenizaciju je korišćen homogenizator tipa B. Braun, Potter S (Melsungen, Nemačka). Tokom homogenizacije, posuda

homogenizatora je bila sve vreme uronjena u usitnjeni led, kako bi se zaustavila aktivnost enzima i kako usled povećane temperature usled trenja pri homogenizaciji ne bi došlo do denaturacije proteina.

Za spektrofotometrijsko određivanje parametara oksidativnog stresa u pripremljenom homogenatu tkiva jetre korišćen je spektrofotometar Agilent 8453 (Santa Clara, USA).

Određivani su sledeći parametri:

- intenzitet lipidne peroksidacije (LPx), izmeren je na osnovu koncentracije sekundarnog produkta lipidne peroksidacije, malondialdehida (MDA);
- aktivnost katalaze (CAT);
- aktivnost enzima glutation reduktaze (GR);
- aktivnost enzima glutation peroksidaze (GPx).

Za određivanje svih navedenih parametara neophodno je bilo prvo odrediti koncentraciju proteina u uzorcima.

4.7.1. Određivanje koncentracije proteina

Određivanje koncentracije proteina u grubom homogenatu jetre i citosolnim frakcijama jetre vršeno je biuretskom metodom koja se zasniva na reakciji peptidne veze sa jonima bakra u alkalnoj sredini, pri čemu se stvara ljubičasto obojeni kompleks. Intenzitet obojenja je srazmeran koncentraciji proteina i meri se na 540 nm (Niketić, 2007; Robinson and Hogden, 1940). Određivanje koncentracije proteina je izvedeno pomoću komercijalnog kit-a firme Sentinel Diagnostic (Milan, Italija), prema uputstvima proizvođača.

Reakciona smeša je pripremljena na sledeći način:

U 1 ml reagensa (6 mmol CuSO₄, 6 mmol KI, 0,75 mmol NaOH, $pH \geq 10$) dodato je 0,01 ml uzorka. U slepu probu je umesto uzorka dodato 0,01 ml destilovane vode, a u standard 0,01 ml

rastvora standarda (6g/dl). Reakciona smeša je dobro pomešana i nakon 15 min merene su apsorbance standarda (AS) i uzorka (AU), normalizovane u odnosu na slepu probu.

Izračunavanje koncentracije proteina (Cpr):

$$(AS/AU) \times 6 = \text{g ukupnih proteina / dl uzorka}$$

4.7.2. Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije

Metoda se zasniva na reakciji tiobarbiturne kiseline (TBA) sa malonaldehidom (MDA) iz uzoraka, koji nastaje u procesu lipidne peroksidacije, odnosno kada reaktivne kiseonične vrste razgrađuju polinezasićene masne kiseline iz ćelijskih membrana. MDA je prihvaćeni pokazatelj lipidne peroksidacije koji se koristi u evaluaciji oksidativnog stresa. U uslovima visoke temperature i u kiseloj sredini MDA učestvuje u reakciji nukleofilne adicije sa TBA, pri čemu nastaje konjugat crvene boje koji ima maksimum apsorpcije monohromatske svetlosti na talasnoj dužini od 535nm (Guéraud et al., 2010).

Reakciona smeša je pripremljena na sledeći način:

100-500 μ l uzorka grubog homogenata jetre je pomešano sa 1 ml rastvora smeše tiobarbiturne kiseline (0,375% w/v) i trihlorsirćetne kiseline (15% w/v) u 0,25 M hlorovodoničnoj kiselini (HCl), zatim izmešano vorteksovanjem i zagrevano na vodenom kupatilu 15 minuta na 90°C. Nakon zagrevanja epruvete su hladene na ledu 5 minuta, a zatim centrifugirane 10 minuta na 10.000 obrtaja/minuti. Koncentracija MDA je određena iz supernatanta spektrofotometrijski na 535 nm uz TCA-TBA-HCl reagens kao slepu probu, prema sledećoj formuli:

$$C(\text{MDA}) = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times V_{\text{rs}} \times 10}{1,56 \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{pr}}}$$

pri čemu je:

ΔA_{sp} – srednja promena apsorbance slepe probe,

ΔA_{uz} – srednja promena apsorbance uzorka u minuti,

Cpr – koncentracija proteina u uzorku (mg/ml),

Vrs – zapremina reakcione smeše (ml),

Vuz – zapremina uzorka (ml).

Molarni apsorpcioni koeficijent za konjugat MDA-TBA iznosi $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Koncentracija MDA je izražena u nmol/mg proteina (Guéraud et al., 2010).

4.7.3. Određivanje specifične aktivnosti katalaze (CAT)

Metoda se sastoji u spektrofotometrijskom praćenju brzine razgradnje vodonik-peroksida u prisustvu katalaze na 240 nm.

Reakciona smeša se priprema na sledeći način:

0,05 M fosfatni pufer ($pH=7,0$) podešen je sa 30 % vodonik-peroksidom tako da apsorbance slepe probe na 240 nm bude 0,525-0,550. U 1,5 ml podešenog rastvora H_2O_2 u fosfatnom puferu dodato je 10 μl uzorka nakon čega odmah započinje reakcija. Pad apsorbance je praćen na 240 nm tokom tri minuta na temperaturi od 25 °C.

Izračunavanje:

$$\text{spec.aktivnost CAT} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) \times V_{rs} \times 1000}{43,6 \times V_{uz} \times C_{pr}}$$

pri čemu je:

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti,

ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe,

Cpr - koncentracija proteina u uzorku (mg/ml),

Vrs - zapremina reakcione smeše (ml),

Vuz - zapremina uzorka (ml).

Specifična aktivnost CAT se izražava u jedinicama aktivnosti na mg proteina (Aebi and Catalase, 1974).

4.7.4. Određivanje specifične aktivnosti glutation reduktaze (GR)

Metoda se zasniva na praćenju oksidacije NADPH na 340 nm, u reakciji u kojoj enzim katalizuje redukciju oksidovanog (GSSG) u redukovani glutation (GSH).

Reakciona smeša se priprema na sledeći način:

U spektrofotometrijsku kivetu sipano je 0,2 ml fosfatnog pufera (0,5 M, $pH=7,4$), 0,035 ml oksidovanog glutationa GSSG (2 mM), 0,035 ml uzorka i vode do 1 ml. Reakcija otpočinje dodatkom 0,035 ml NADPH (0,1 mM). Optimalna temperatura reakcije bila je 37°C. Pratila se promena apsorbance u toku 3 minuta, a aktivnost se izračunavala pomoću jednačine:

$$\text{spec.aktivnost GR} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{asp}}) \times V_{\text{rs}} \times 1000}{6,22 \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{pr}}}$$

pri čemu je:

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti,

ΔA_{asp} - srednja promena apsorbance slepe probe,

C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku (mg/ml),

V_{rs} - zapremina reakcione smeše (ml),

V_{uz} - zapremina uzorka (ml).

Aktivnost GR se izražava u specifičnim jedinicama aktivnosti na mg proteina. Specifična jedinica aktivnosti je definisana kao broj nmol NADPH oksidovanih u minuti po mg proteina (Glatzle et al., 1974).

4.7.5. Određivanje specifične aktivnosti glutation peroksidaze (GPx)

Glutation peroksidaza katališe redukciju organskog peroksida uz nastajanje oksidovanog glutationa, GSSG. GSSG se ponovo redukuje do glutationa (GSH) uz NADPH (kao donora redukcionih ekvivalenata), a reakciju katališe enzim glutation reduktaza (GR). Aktivnost GPx se prati spektrofotometrijski, indirektno, praćenjem pada apsorbance na 340 nm koja potiče od NADPH.

Reakciona smeša se priprema na sledeći način:

U spektrofotometrijsku epruvetu sipano je 0,5 ml destilovane vode, 0,1 ml rastvora redukovanog glutationa (10^{-3} M), 0,2 ml rastvora NADPH (0,2 mM u 1% NaHCO_3), 0,035 ml EDTA (1 mM), 0,1 ml fosfatnog pufera (0,5 M, $\text{pH}=7,0$), 0,035 ml *t*-butilhidroperoksida (0,03 M) i 50 μl uzorka. Smeša je inkubirana 10 min na 37°C , nakon čega reakcija počinje dodavanjem 20 μl GR (10 U/mg proteina). Apsorbanca je očitavana na 340 nm u toku 3 min. U slepu probu je umesto GR dodato 1,7 μl destilovane vode.

Izračunavanje:

$$\text{spec.aktivnost GPx} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) \times V_{\text{rs}} \times 1000}{6,22 \times V_{\text{uz}} \times C_{\text{pr}}}$$

pri čemu je:

ΔA_{uz} - srednja promena apsorbance uzorka u minuti,

ΔA_{sp} - srednja promena apsorbance slepe probe,

C_{pr} - koncentracija proteina u uzorku [mg/ml],

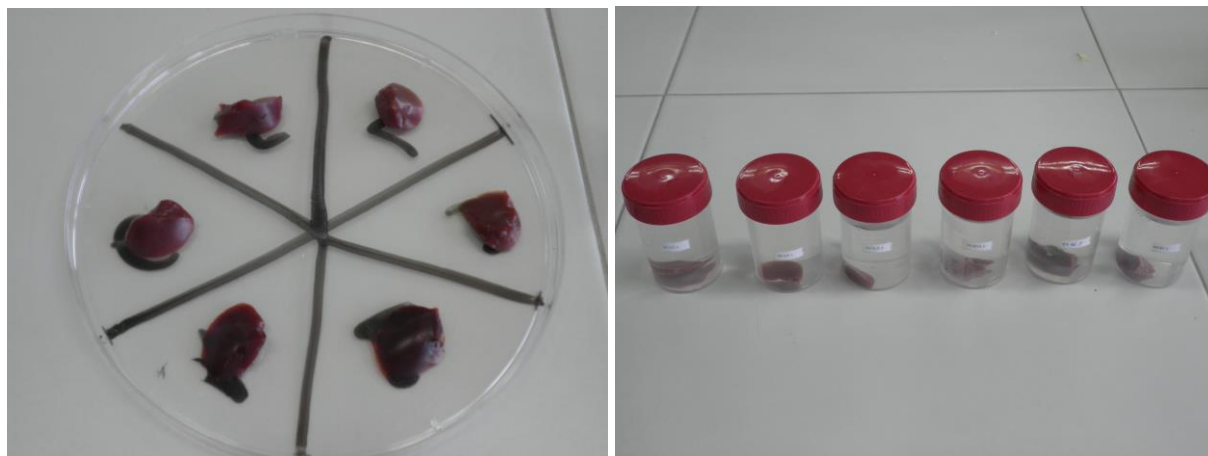
V_{rs} - zapremina reakcione smeše [ml],

V_{uz} - zapremina uzorka [ml].

Specifična aktivnost GPx se izražava kao broj nmol NADPH oksidovanih po minuti po mg proteina (Paglia and Valentine, 1967).

4.8. Patohistološka ispitivanja

Nakon žrtvovanja i kompletne obdukcije, isečci tkiva jetre su izdvojeni i fiksirani u Bujenovom fiksativu na 4°C tokom 24h (slika 12). Potom je izvršena dehidracija tkiva rastućim koncentracijama izopropanola, kalupljenje u parafin i sečenje na rotacionom mikrotomu marke Leica pri debljini od 5 μ m. Od uzoraka tkiva jetre uzet je po jedan presek organa svake ispitivane jedinice. Tkivo jetre je bojeno standardnom hematoksilin i eozin metodom (Lalošević i sar., 2005).



Slike 12. i 13. Uzorci jetre za patohistološka ispitivanja

4.9. Statistička obrada podataka

Statistička obrada rezultata dobijenih tokom ispitivanja urađena je pomoću statističkog programa SPSS (version 21, Systat Software Inc., San Jose, CA). Kao mera centralne tendencije korišćena je aritmetička sredina (\bar{X}), a mera varijabiliteta između podataka je predstavljena standardnom devijacijom (SD), odnosno standardnom greškom srednje vrednosti (Standard Error of Mean Value, SEM). Studentovim t-testom za male nezavisne uzorke analizirana je statistička značajnost razlika između ispitivanih grupa, odnosno analizom varijanse sa jednim promenljivim faktorom (ANOVA). Post hoc testiranje nakon ANOVA-e urađeno je Tukey-evim metodom.

Sve statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti (alfa nivo) od 0,05, odnosno statistički značajne su smatrane vrednosti $p < 0,05$.

Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički.

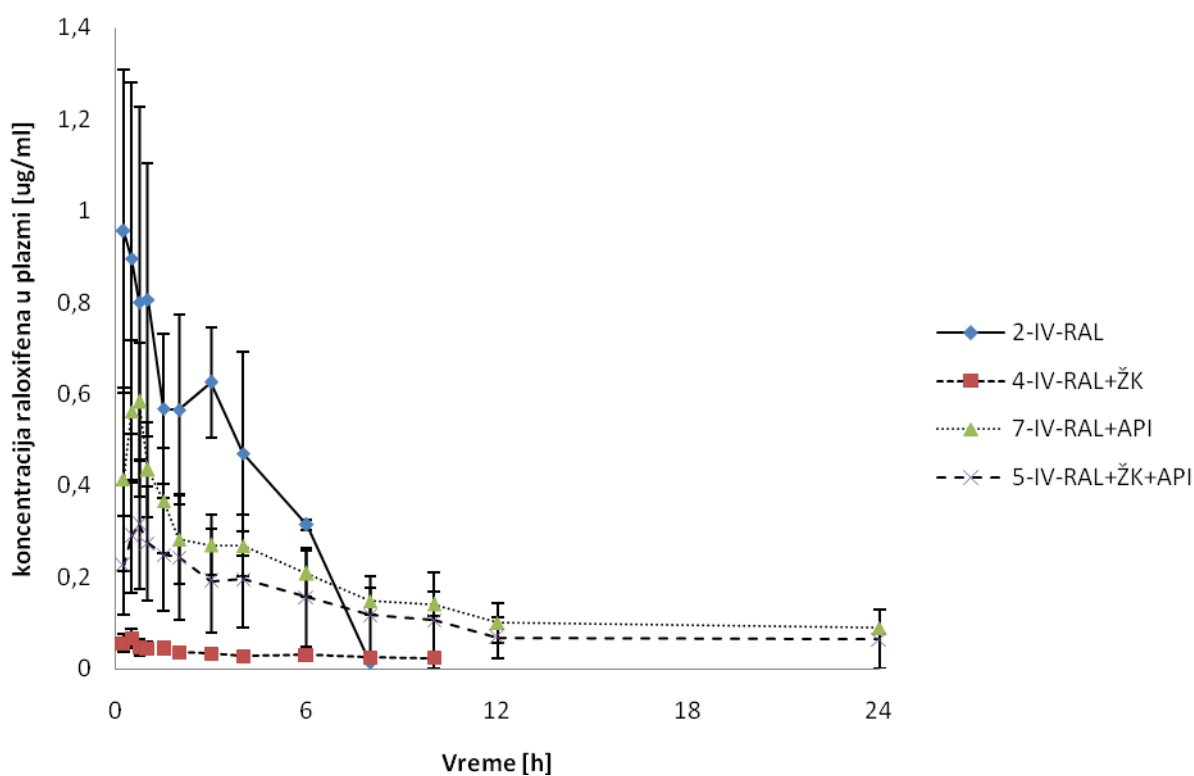
5. REZULTATI

5.1. Farmakokinetička ispitivanja

Određivana je koncentracija raloksifena u plazmi, urinu i fecesu.

5.1.1. Određivanje koncentracije raloksifena u plazmi nakon intravenske primene

Koncentracije raloksifena u plazmi nakon intravenske primene raloksifena (RAL; 6 mg/kg, i.v.) kod laboratorijskih pacova sa i bez pretretmana natrijum-deoksiholatom (ŽK; 4 mg/kg, p.o.) i apigeninom (API; 10 mg/kg, p.o.) su prikazane na Grafikonu 4. Farmakokinetički parametri raloksifena kod eksperimentalnih životinja su prikazani u Tabeli 6.



Grafikon 4. Koncentracije raloksifena u plazmi sa i bez pretretmana natrijum-deoksiholatom (ŽK) i apigeninom (API) nakon intravenske primene raloksifena

Koncentracija raloksifena je merena u 15, 30, 45, 60, 90, 120. minutu, zatim na 3, 4, 6, 8, 10, 12 i 24 časa od trenutka aplikacije leka. Nakon jednokratne intravenske primene početna koncentracija leka je maksimalna (100%) u odnosu na unetu dozu.

Na Grafikonu 4. može se primetiti da su u grupi tretiranoj samo raloksifenom koncentracije leka bile značajno veće u odnosu na grupe koje su pretretirane natrijum-deoksiholatom i apigeninom. Nakon trećeg sata u grupi 2 (RAL i.v.) je došlo do povećanja koncentracije leka u krvi. Nakon šestog sata koncentracija raloksifena u grupi 2 je naglo pala, te nakon osmog sata koncentracija raloksifena u ovoj grupi nije bila detektibilna. I u ostalim eksperimentalnim grupama je došlo do povećanja koncentracije raloksifena (između drugog i četvrtog sata), pri čemu je to povećanje bilo manje u odnosu na grupu 2 (RAL i.v.).

U grupi tretiranoj kombinacijom natrijum-deoksiholata i raloksifena koncentracije raloksifena su bile vrlo niske tokom celog intervala od 24 časa, a već u 15. minutu (prvom merenju nakon aplikacije raloksifena) došlo je do naglog pada koncentracije raloksifena u poređenju sa grupom tretiranom samo raloksifenom.

Koncentracije raloksifena u grupi 7, koja je bila pretretirana apigeninom, u prvih 6 sati nakon aplikacije leka bile su niže u odnosu na grupu koja je dobijala samo raloksifen, ali značajno više u odnosu na grupu 4 (RAL i.v.+ŽK) koja je dobijala kombinaciju natrijum-deoksiholata i raloksifena. Nakon šestog sata u grupi 7 (RAL i.v.+API) koncentracija raloksifena je znatno sporije opadala u odnosu na grupu 2 (RAL i.v.), te su u grupi 7 relativno visoke koncentracije raloksifena izmerene sve do kraja merenja (24h).

Tabela 6. Farmakokinetički parametri raloksifena nakon intravenske aplikacije raloksifena (6 mg/kg) eksperimentalnim životinjama sa i bez pretretmana sa natrijum-deoksiholatom i apigeninom. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

Farmakokinetički parametri	Grupa 2 RAL i.v.	Grupa 4 RAL i.v. + ŽK	Grupa 5 RAL i.v. + ŽK + API	Grupa 7 RAL i.v. + API
λ_z (1/min)	0,011 \pm 0,004	0,0023 \pm 0,0014*	0,0025 \pm 0,0009*	0,0026 \pm 0,0008*
$t_{1/2}$ (min)	78,49 \pm 54,82	428,31 \pm 262,63*	296,46 \pm 74,64	288,09 \pm 75,00
Clast (μ g/ml)	0,82 \pm 0,27	0,056 \pm 0,017*	0,48 \pm 0,24* ^x	0,225 \pm 0,108*
AUC 0-t (min* μ g/ml)	193,51 \pm 76,90	14,91 \pm 6,86*	223,34 \pm 78,72 ^x	152,90 \pm 109,57 ^x
AUC 0- ∞ (min* μ g/ml)	213,26 \pm 57,86	29,82 \pm 15,81*	260,91 \pm 98,24 ^x	177,44 \pm 137,81
Vd (ml/kg)	1.152,87 \pm 845,61	33.066,07 \pm 7.934,48*	2.480,18 \pm 463,98 ^x	3.822,79 \pm 1.584,84 ^x
CL (ml/min/kg)	10,36 \pm 3,85	70,88 \pm 36,25*	6,42 \pm 3,19 ^x	9,95 \pm 4,65 ^x
MRT (min)	177,31 \pm 40,46	613,02 \pm 352,36*	616,68 \pm 156,74*	546,40 \pm 204,31

* $p < 0,05$ u odnosu na grupu koja je dobijala raloksifen i.v.

^x $p < 0,05$ u odnosu na grupu tretiranu natrijum-deoksiholatom i raloksifenom

$p < 0,05$ u odnosu na grupu tretiranu natrijum-deoksiholatom, apigeninom i raloksifenom

Konstanta eliminacije (λ_z) je bila statistički značajno veća u grupama 4, 5 i 7 u odnosu na grupu tretiranu samo raloksifenom, $p < 0,05$.

Poluvreme eliminacije ($t_{1/2}$) je bilo produženo u grupama 4, 5 i 7 u odnosu na grupu tretiranu raloksifenom. Razlika je bila statistički značajna samo u grupi tretiranoj kombinacijom natrijum-deoksiholata i raloksifena u odnosu na grupu tretiranu raloksifenom, $p < 0,05$.

Poslednja merljiva koncentracija raloksifena (Clast) je bila statistički značajno niža u grupama 4, 5 i 7 u poređenju sa grupom 2, koja je dobijala samo raloksifen, $p < 0,05$.

Površina ispod krive (AUC) je bila značajno niža u grupi pretretiranoj natrijum-deoksiholatom u odnosu na ostale eksperimentalne grupe, $p < 0,05$, dok među ostalim grupama nije bilo statistički značajnih razlika u ovom parametru.

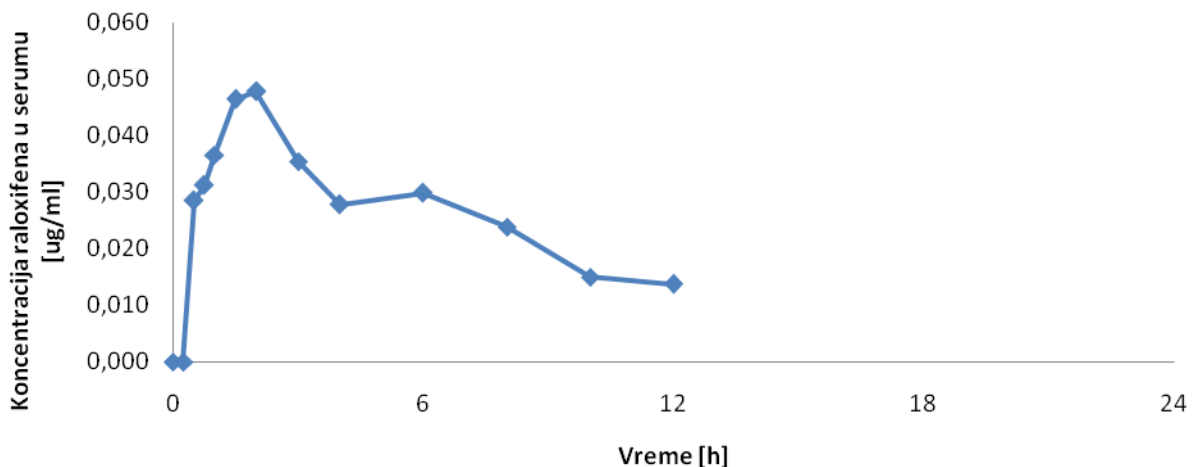
Volumen distribucije (Vd) je statistički značajno povećan u grupi 4 (RAL i.v. + ŽK) u odnosu na grupu koja je dobijala samo raloksifen intravenski, $p < 0,05$. Volumen distribucije je u grupi 4 bio gotovo 29 puta veći od volumena distribucije u grupi 2 (RAL i.v.), u grupi 5 je bio oko 2 puta veći, a u grupi 7 oko 3,5 puta veći u odnosu na grupu 2.

Klirens (CL) je statistički značajno povećan u grupi 4 (RAL i.v. + ŽK), gotovo 7 puta veći u odnosu na grupu koja je dobijala samo raloksifen intravenski, $p < 0,05$. U grupama 5 i 7 klirens je bio približan klirensu u grupi 2. S obzirom da je klirens direktno proporcionalan konstanti eliminacije i volumenu distribucije ($CL = \lambda z \cdot Vd$), očekivano je da je klirens značajno povećan u grupi 4, jer je u toj grupi volumen distribucije povećan gotovo 29 puta u odnosu na grupu 2, dok je vrednost konstante eliminacije u grupi 4 oko 5 puta manja nego u grupi 2.

Srednje vreme zadržavanja (MRT – mean residence time) je statistički značajno produženo u grupama pretretiranim natrijum-deoksiholatom i kombinacijom natrijum-deoksiholata i apigenina, u poređenju sa grupom životinja koje je tretirana samo raloksifenom intravenski, $p < 0,05$.

5.1.2. Određivanje koncentracije raloksifena u plazmi nakon peroralne primene

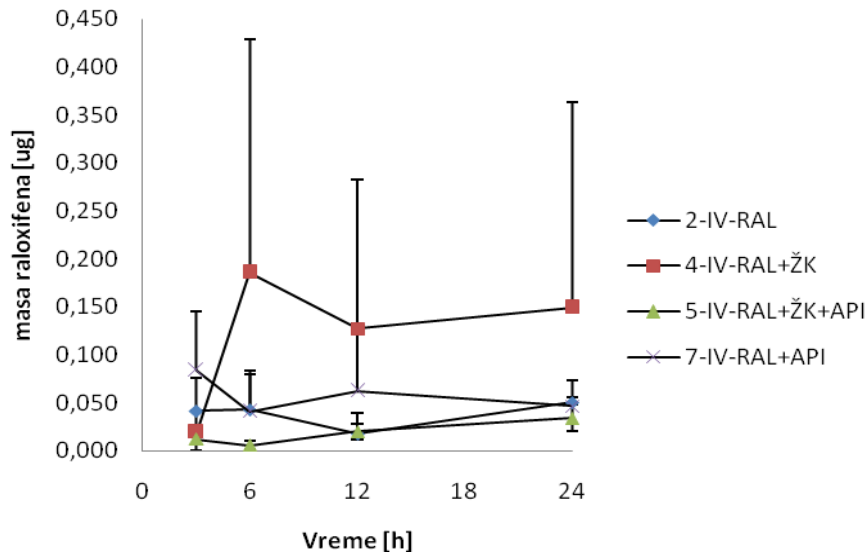
U grupama životinja koje su tretirane raloksifenom *per os* vrednosti koncentracija raloksifena su bile ispod limita detekcije, osim kod jednog pacova u grupi 8, koja je tretirana kombinacijom apigenina i raloksifena.



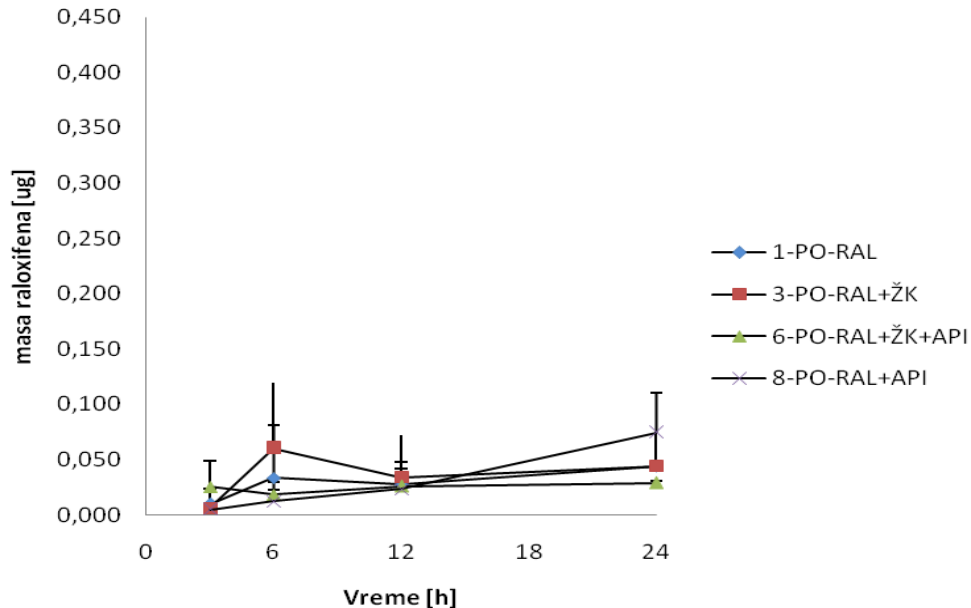
Grafikon 5. Koncentracija raloksifena u serumu pacova pretretiranog apigeninom, kojem je aplikovana terapijska doza raloksifena *per os*.

Na grafikonu 5 je prikazana koncentracija raloksifena u serumu pacova pretretiranog apigeninom, kojem je raloksifen dat *per os*. Nakon drugog sata od primene raloksifena kriva koja pokazuje koncentraciju raloksifena u zavisnosti od vremena je vrlo slična krivi koncentracije leka nakon intravenske primene raloksifena u grupi pretretiranoj apigeninom (grafikon 4). Primećuje se blagi porast koncentracije raloksifena nakon četvrtog sata od primene raloksifena i spori pad koncentracije raloksifena nakon osmog sata od početka merenja.

5.1.3. Određivanje količine raloksifena u urinu



Grafikon 6. Količina (masa) raloksifena u urinu izražena u mikrogramima, sa i bez pretretmana natrijum-deoksiholatom (ŽK) i apigeninom (API) u periodu od 3, 6, 12 i 24 h nakon intravenske primene raloksifena.



Grafikon 7. Količina (masa) raloksifena u urinu izražena u mikrogramima, sa i bez pretretmana natrijum-deoksiholatom (ŽK) i apigeninom (API) u periodu od 3, 6, 12 i 24 h nakon peroralne primene raloksifena.

Tabela 7. Ukupna količina raloksifena u urinu prikupljenog u intervalu od 24 časa izražena kao procenat (%) od primenjene doze raloksifena, nakon intravenske i peroralne primene raloksifena eksperimentalnim životinjama, sa i bez pretretmana natrijum-deoksiholatom i apigeninom. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

Grupa životinja	RAL	RAL + ŽK	RAL + ŽK + API	RAL + API
Intravenski (i.v.)	0,007 \pm 0,0017	0,032 \pm 0,042	0,004 \pm 0,002	0,014 \pm 0,015
Peroralno (p.o.)	0,003 \pm 0,003	0,007 \pm 0,002	0,006 \pm 0,004	0,006 \pm 0,005

*p<0,05 u odnosu na grupu koja je dobijala raloksifen

^x p<0,05 u odnosu na grupu tretiranu natrijum-deoksiholatom i raloksifenom

p<0,05 u odnosu na grupu tretiranu natrijum-deoksiholatom, apigeninom i raloksifenom

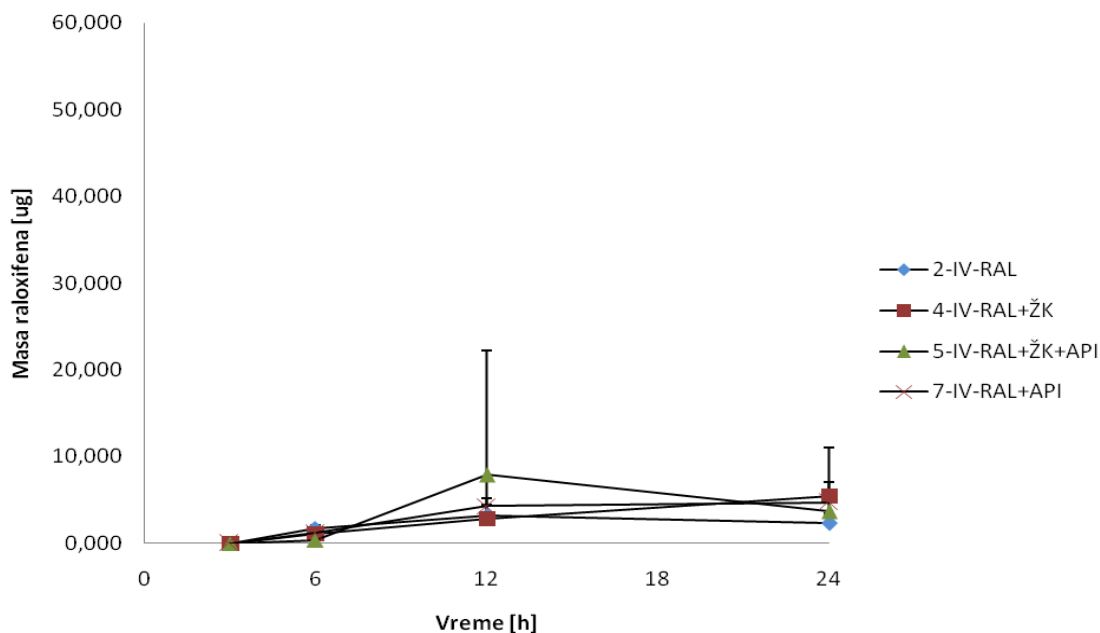
U urinu su detektovane vrlo male količine raloksifena. Statistički nije bilo značajnih razlika u količini raloksifena između grupa.

Kada se uporede srednje vrednosti količina raloksifena u urinu u različitim grupama, primećuje se da je natrijum-deoksiholat imao najveći uticaj na povećanje količine raloksifena u urinu pri intravenskoj primeni raloksifena.

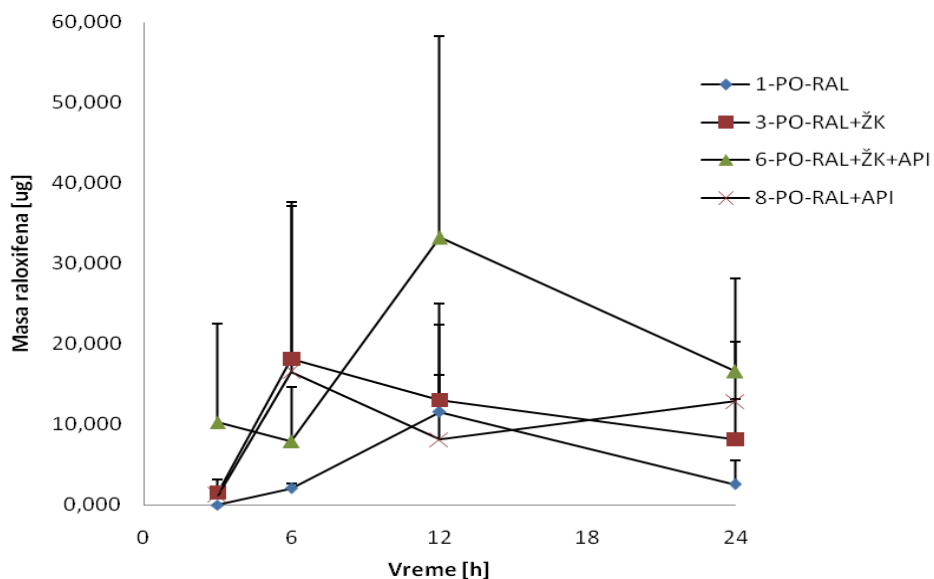
Apigenin je doveo do povećanja količine raloksifena u urinu, koja je bilo manje izraženo nego u grupi pretretiranoj natrijum-deoksiholatom.

U grupi pretretiranoj kombinacijom natrijum-deoksiholatom i apigeninom količina urina je bila približna količini urina u grupi koja je dobijala samo raloksifen.

5.1.4. Određivanje količine raloksifena u fecesu



Grafikon 8. Količina (masa) raloksifena u fecesu izražena u mikrogramima, sa i bez pretretmana natrijum-deoksiholatom (ŽK) i apigeninom (API) u periodu od 3, 6, 12 i 24 h nakon intravenske primene raloksifena.



Grafikon 9. Količina (masa) raloksifena u fecesu izražena u mikrogramima, sa i bez pretretmana natrijum-deoksiholatom (ŽK) i apigeninom (API) u periodu od 3, 6, 12 i 24 h nakon peroralne primene raloksifena

Tabela 8. Ukupna količina raloksifena u fecesu prikupljenog u intervalu od 24 časa izražena kao procenat (%) od primenjene doze raloksifena, nakon intravenske i peroralne aplikacije raloksifena eksperimentalnim životinjama, sa i bez pretretmana natrijum-deoksiholatom i apigeninom. Podaci su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

Grupa životinja	RAL	RAL + ŽK	RAL + ŽK + API	RAL + API
Intravenski (i.v.)	0,336 \pm 0,075	0,463 \pm 0,422	0,813 \pm 1,006	0,696 \pm 0,457
Peroralno (p.o.)	0,505 \pm 0,602	1,555 \pm 0,915	4,611 \pm 2,310*	2,124 \pm 1,954

*p<0,05 u odnosu na grupu koja je dobijala raloksifen

^x p<0,05 u odnosu na grupu tretiranu natrijum-deoksiholatom i raloksifenom

p<0,05 u odnosu na grupu tretiranu natrijum-deoksiholatom, apigeninom i raloksifenom

U fecesu su izmerene veće količine raloksifena nego u urinu. Količina raloksifena u fecesu je bila veća nakon peroralnog davanja nego nakon intravenske primene leka.

Pretretman natrijum-deoksiholatom i apigeninom je doveo do povećanja količine raloksifena u fecesu, i nakon intravenske i nakon peroralne primene raloksifena.

U grupama životinja pretretiranih kombinacijom natrijum-deoksiholata i apigenina (RAL+ŽK+API) količina raloksifena u fecesu je bila najveća. Grupa životinja koja je pretretirana natrijum-deoksiholatom i apigeninom i kojoj je raloksifen primenjen *per os* imala statistički značajno povećanje količine raloksifena u fecesu u odnosu na grupu tretiranu samo raloksifenom *per os*, kao i u odnosu na sve grupe koje su dobijale raloksifen intravenski, p<0,05.

5.2. Biohemijska i toksikološka ispitivanja

5.2.1. Uticaj natrijum-deoksiholata i apigenina na biohemijske parametre u serumu nakon primene terapijske doze raloksifena

Tabela 9. Aktivnost alkalne fosfataze, alanin i aspartat transaminaze, gama-glutamil transferaze (ALP, AST, ALT, GGT, U/l, $x \pm SD$) u serumu pacova tretiranih terapijskom dozom raloksifena *per os*.

	Kontrola (K)	RAL p.o.	RAL p.o. + ŽK	RAL p.o. + ŽK + API	RAL p.o. + API	RAL _{HRON}
ALP	272.82±92.71	299.33±38.00	187.00±45.67 ^x	212.67±52.67 ^x	318.33±20.22	369.67±66.33
ALT	41.82±16.78	50.33±3.00	43.33±5.33 ^x	21.00±9.33 ^{*x}	37.33±4.56 ^x	56.83±7.50
AST	105.83±20.50	112.50±12.17	177.50±72.17	86.00±30.33 ^{*x}	141.67±21.89 ^{*x}	99.67±7.33
GGT	0.73±0.40	0.50±0.50	0.83±0.28	0,17±0.28 [*]	1,00±0.00 ^x	0,50±0.50

* $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu koja je dobijala fiziološki rastvor

^x $p < 0,05$ u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom i raloksifenom

Aktivnost alkalne fosfataze (ALP) i alanin transaminaze (ALT) u serumu pacova tretiranih kombinacijom raloksifena i natrijum-deoksiholata, kao i trojnom kombinacijom raloksifena, natrijum-deoksiholata i apigenina, je značajno niža u poređenju sa aktivnošću ovih enzima kod grupe tretirane raloksifenom. Kombinacija raloksifena i apigenina je takođe uzrokovala značajno smanjenje nivoa ALT u odnosu na grupu koja je dobijala raloksifen, $p < 0,05$.

Aktivnost aspartat aminotransferaze (AST) u serumu pacova tretiranih trojnom kombinacijom raloksifena, deoksiholne kiseline i apigenina, kao i kombinacijom raloksifena i apigenina je statistički niža u poređenju sa aktivnošću ovog enzima u kontrolnoj i grupi tretiranoj raloksifenom, $p < 0,05$.

Koncentracija gama-glutamil transferaze (GGT) u serumu pacova tretiranih trojnom kombinacijom deoksiholne kiseline, apigenina i raloksifena je statistički značajno niža u poređenju sa kontrolnom grupom, $p < 0,05$.

Aktivnost GGT u serumu pacova tretiranih kombinacijom apigenina i raloksifena je značajno viša nego u grupi tretiranoj samo raloksifenom, $p < 0,05$.

Tabela 10. Koncentracija uree (Urea, mmol, $x \pm SD$), mokraćne kiseline, kreatinina i direktnog bilirubina (MK, Krea, DB, μmol , $x \pm SD$) u serumu pacova tretiranih terapijskom dozom raloksifena *per os*.

	Kontrola (K)	RAL p.o.	RAL p.o. + ŽK	RAL p.o. + ŽK + API	RAL p.o. + API	RAL _{HROH}
Urea	11.08±0.98	8.23±1.10*	4.75±0.57* ^x	4,88±1.21* ^x	7,93±1.49*	7,62±0.88*
MK	85.67±19.67	105.50±41.50	141.83±58.78	49.50±21.00* ^x	102.50±25.83	62.17±9.22
Krea	52.83±3.78	50.67±3.00	47.17±2.44*	#	45.50±2.17*	32.83±1.28* ^x
DB	0.92±0.22	0.65±0.05*	0.76±0.05 ^x	0.43±0.10* ^x	0.63±0.10*	0,22±0.08* ^x

* $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu koja je dobijala fiziološki rastvor

^x $p < 0,05$ u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom i raloksifenom

- nisu dobijeni rezultati

Primena jednokratne terapijske doze raloksifena *per os* dovela je do statistički značajnog smanjenja nivoa uree i direktnog bilirubina, $p < 0,05$, dok koncentracija mokraćne kiseline i kreatinina nije bila značajno promenjena u poređenju sa kontrolom.

U grupi životinja koja je 14 dana tretirana raloksifenom peroralno došlo je do statistički značajnog smanjenja nivoa uree u odnosu na kontrolnu grupu, kao i statistički značajnog smanjenja nivoa kreatinina i direktnog bilirubina u odnosu na kontrolu i u odnosu na grupu koja

je dobijala raloksifen jednokratno, $p < 0,05$. Kod ostalih parametara nije bilo statistički značajnih razlika u odnosu na kontrolu.

Koncentracija uree je značajno niža u svim eksperimentalnim grupama životinja u poređenju sa kontrolnom grupom, $p < 0,05$. Pored toga, u grupama životinja koje su dobijale kombinaciju raloksifena i natrijum-deoksiholata i trojnu kombinaciju raloksifena, natrijum-deoksiholata i apigenina nivo uree je bio značajno niži u odnosu na grupu koja je dobijala raloksifen, $p < 0,05$.

Trojna kombinacija raloksifena, natrijum-deoksiholata i apigenina je dovela do statistički značajnog smanjenja nivoa mokraćne kiseline u odnosu na kontrolu i na grupu životinja koja je dobijala raloksifen, $p < 0,05$.

Nivo kreatinina je bio statistički značajno niži u grupama životinja koje su dobijale kombinacije raloksifen – natrijum-deoksiholat i raloksifen – apigenin u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$.

Koncentracija direktnog bilirubina u serumu pacova tretiranih kombinacijom natrijum-deoksiholata i raloksifena je značajno viša u poređenju sa aktivnošću istog enzima kod grupe tretirane raloksifenom, $p < 0,05$. Koncentracija direktnog bilirubina u serumu pacova tretiranih trojnom kombinacijom deoksiholne kiseline, apigenina i raloksifena je značajno niža u poređenju sa onom u kontrolnoj grupi i grupi tretiranoj raloksifenom, $p < 0,05$. Koncentracija direktnog bilirubina u serumu pacova tretiranih kombinacijom apigenina i raloksifena je bila statistički značajno niža u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$.

Tabela 11. Aktivnost alkalne fosfataze, alanin i aspartat transaminaze, gama-glutamil transferaze (ALP, AST, ALT, GGT, U/l, $\bar{x} \pm SD$) u serumu pacova tretiranih terapijskom dozom raloksifena intravenski.

	Kontrola (K)	RAL i.v.	RAL i.v. + ŽK	RAL i.v. + ŽK + API	RAL i.v. + API
ALP	272.82±92.71	543.17±125.83*	368.50±67.50 ^x	154.00±13.60* ^x	396.29±101.67
ALT	41.82±16.78	64.20±8.16*	53.38±6.22	13.00±4.40* ^x	48.57±6.94 ^x
AST	105.83±20.50	187.00±20.67*	174.00±18.00*	62.00±4.80* ^x	140.86±17.63* ^x
GGT	0.73±0.40	1.67±0.67*	2.13±0.44	0.00±0.00* ^x	2,29±1.63

* $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu

^x $p < 0,05$ u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom i raloksifenom

Intravenska primena terapijske doze raloksifena je dovela do statistički značajnog povećanja aktivnosti alkalne fosfataze (ALP), alanin i aspartat transaminaze (ALT, AST), gama-glutamil transferaze (GGT), kao i do statistički značajnog smanjenja nivoa uree, mokraćne kiseline i kreatinina u serumu pacova u poređenju sa kontrolom, $p < 0,05$.

Aktivnost alkalne fosfataze u serumu pacova tretiranih kombinacijom raloksifena i natrijum-deoksiholata je značajno niža u poređenju sa aktivnošću ovog enzima kod grupe tretirane raloksifenom i nije statistički značajno različita od vrednosti u kontrolnoj grupi, $p < 0,05$.

U grupi životinja koja je tretirana kombinacijom raloksifena i apigenina aktivnost ALT i AST su bile statistički značajno niže u odnosu na grupu tretiranu raloksifenom, $p < 0,05$.

Tabela 12. Koncentracija uree (Urea, mmol, $x \pm SD$), mokraćne kiseline, kreatinina i direktnog bilirubina (MK, Krea, DB, μmol , $x \pm SD$) u serumu pacova tretiranih terapijskom dozom raloksifena intravenski.

	Kontrola (K)	RAL i.v.	RAL i.v. + ŽK	RAL i.v. + ŽK + API	RAL i.v. + API
Urea	11.08±0.98	7.87±1.14*	6.79±1.34*	3,68±0.66** ^x	7,87±1.69*
MK	85.67±19.67	59.17±9.1*	85.25±14.56 ^x	35.80±3.84** ^x	81.71±11.59 ^x
Krea	52.83±3.78	45.50±2.17*	45.63±3.22*	#	43.57±1.80*
DB	0.92±0.22	0.87±0.16	0.85±0.13	0.34±0.05** ^x	0.80±0.09

* $p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu

^x $p < 0,05$ u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom i raloksifenom

- nisu dobijeni rezultati

Nivo mokraćne kiseline u grupi pacova tretiranih kombinacijom raloksifena i natrijum-deoksiholata je statistički značajno viša od nivoa mokraćne kiseline kod pacova koji su tretirani raloksifenom i približno je jednaka koncentraciji mokraćne kiseline u kontrolnoj grupi, $p < 0,05$.

Nivo mokraćne kiseline je značajno niži u grupi tretiranoj kombinacijom raloksifena i apigenina u poređenju sa grupom koja je dobijala raloksifen, $p < 0,05$.

Koncentracije uree i kreatinina u serumu pacova tretiranih kombinacijom apigenina i raloksifena značajno su niže u odnosu na grupu tretiranu samo raloksifenom i približno su jednake vrednostima u kontrolnoj grupi životinja, $p < 0,05$.

Vrednosti svih ispitivanih parametara (ALP, ALT, AST, GGT, uree, mokraćne kiseline i direktnog bilirubina), izuzev kreatinina za koji nisu dobijeni rezultati, u serumu pacova tretiranih trojnom kombinacijom raloksifena, natrijum-deoksiholata i apigenina bile su statistički značajno niže u poređenju sa vrednostima ovih parametara u kontrolnoj i svim ostalim eksperimentalnim grupama na nivou značajnosti od $p < 0,01$.

5.2.2. Uticaj apigenina na bihemijske parametre seruma nakon primene toksične doze paracetamola

Oštećenje jetre izazvano je toksičnom dozom paracetamola (600 mg/kg). Kako bi se potvrdio hepatotoksični efekat paracetamola određivan je nivo aktivnosti jetrenih enzima u serumu.

Tabela 13. Efekat apigenina i paracetamola na bihemijske parametre u serumu

	Kontrola (K)	PAR	API	PAR + API
ALP (U/I)	229.00±46.18	299.33±49.73	240.17±49.17	200±20.19 ^x
ALT (U/I)	9.67±2.08	50.33±3.78*	10±5.06	11.5±7.40 ^x
AST (U/I)	48.00±10.00	112.50±15.58*	68.83±8.95*	89.5±69.08
GGT(U/I)	1.00±1.00	0.50±0.55	2.5±2.17	1.5±1.38
Direktni bilirubin	0.40±0.17	0.65±0.05*	0.43±0.12	0.35±0.07 ^x
Urea (µmol/l)	5.20±0.61	8.23±1.44*	5.57±0.85	6±1.67 ^x
Mokraćna kiselina (µmol/l)	48.67±6.03	80.60±17.20*	46.17±13.95	46.17±29.54 ^x

* p<0,05 u odnosu na kontrolnu grupu

^x p<0,05 u odnosu na grupu tretiranu paracetamolom

Toksične doze paracetamola su dovele do povećanja nivoa ALP koje nije bilo statistički značajno, kao i do statistički značajnog povećanja aktivnosti ALT i AST u serumu u poređenju sa kontrolnom grupom koja je dobijala fiziološki rastvor, p<0,05.

U grupi životinja tretiranih apigeninom aktivnost AST je bila povišena u odnosu na kontrolnu grupu, p<0,05, dok vrednosti ostalih parametara jetrene i bubrežne funkcije nisu bili statistički značajno različite u odnosu na kontrolu. Kod životinja kojima su aplikovani apigenin i paracetamol u kombinaciji utvđen je niži nivo parametara hepatotoksičnosti, naročito u pogledu

aktivnosti ALT i ALP, koja je bila statistički značajno niža u odnosu na grupu životinja tretiranih fiziološkim rastvorom i paracetamolom, $p < 0,05$.

Direktni bilirubin je bio statistički značajno povišen kod životinja tretiranih paracetamolom u odnosu na kontrolnu grupu ($p < 0,05$), što ukazuje na poremećaj ekskretorne funkcije jetre. Kod životinja kojima je aplikovan apigenin u kombinaciji sa paracetamolom došlo je do statistički značajnog pada koncentracije direktnog bilirubina u odnosu na grupu koja je dobijala paracetamol, $p < 0,05$.

Određivane su koncentracije uree i mokraćne kiseline u serumu, kao indikatora funkcije bubrega. Ovi biohemijski parametri su bili statistički značajno povećani kod životinja tretiranih paracetamolom. U grupi životinja kojima je paracetamol aplikovan u kombinaciji sa apigeninom koncentracije uree i mokraćne kiseline su bile približne vrednostima u kontrolnoj grupi i statistički značajno niže u odnosu na koncentracije uree i mokraćne kiseline kod životinja tretiranih paracetamolom, $p < 0,05$.

5.3. Uticaj raloksifena, natrijum-deoksiholata i apigenina na parametre hemostaze

S obzirom da je poznato da je jedno od neželjenih dejstava raloksifena venska tromboembolija, ispitivan je uticaj raloksifena, natrijum-deoksiholata i apigenina na hemostazu kod eksperimentalnih životinja.

Tabela 14. Vrednosti aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (aPTT) i protrombinskog vremena (PT) izražene u sekundama i u odnosu na normalne vrednosti (R) (aPTT (sec), aPTT (R), PT (sec), PT (R), $x \pm SD$), fibrinogena (Fib, g/L, $x \pm SD$) i D-dimera (DDi, mg/L, $x \pm SD$) u serumu pacova tretiranih terapijskom dozom (6 mg/kg) raloksifena *per os*.

	Kontrola (K)	RAL p.o.	RAL p.o. + ŽK	RAL p.o. + ŽK + API	RAL p.o. + API	RAL _{HRON}
aPTT (sec)	14.61±1.03	12.96±0.51*	13.53±0.67*	13.13±0.34*	13.08±0.46*	14.27±0.87 ^x
aPTT (R)	0.54±0.04	0.48±0.02*	0.51±0.03	0.49±0.01*	0.49±0.02*	0.53±0.03 ^x
PT (sec)	9.41±0.37	9.28±0.10	8.98±0.16**	9.28±0.32	9.17±0.19	9.17±0.23
PT (R)	0.85±0.03	0.83±0.01	0.81±0.01**	0.84±0.03	#	0,83±0.02
Fib (g/L)	1.04±0.098	1.28±0.16*	1.12±0.04	1.40±0.17*	1.39±0.46	1.33±0.17*
DDi (mg/L)	0.12±0.02	0.09±0.02*	0.18±0.14	0.11±0.01	0.09±0.01*	0.11±0.01

* $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu

^x $p < 0,05$ u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom i raloksifenom

- nisu dobijeni rezultati

Terapijska doza raloksifena primenjenog peroralno dovela je do statistički značajnog skraćenja aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (aPTT) i pada vrednosti D-dimera, kao i do statistički značajnog povećanja nivoa fibronogena u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$.

Kombinacija natrijum-deoksiholata i raloksifena dovela je do statistički značajnog skraćenja aPTT izraženog u sekundama u odnosu na kontrolu, kao i do skraćenja protrombinskog vremena (PT) u odnosu na kontrolnu grupu i grupu tretiranu raloksifenom, $p < 0,05$.

U grupi životinja tretiranoj trojnom kombinacijom natrijum-deoksiholata, apigenina i raloksifena došlo je do statistički značajnog skraćenja aPTT, kao i do značajnog povećanja nivoa fibrinogena u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$. U poređenju sa grupom tretiranom raloksifenom, trojna kombinacija nije pokazala značajne razlike kod nijednog parametra.

Kombinacija apigenina i raloksifena je dovela do statistički značajnog skraćenja aPTT i smanjenja nivoa Ddi u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$. Vrednosti svih parametara u grupi tretiranoj kombinacijom apigenina i raloksifena su približno iste vrednostima u grupi tretiranoj raloksifenom.

Nakon hronične primene raloksifena *per os* (14 dana) došlo je do statistički značajnog povećanja nivoa fibrinogena u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$. Hronična primena raloksifena dovela je do skraćenja aPTT i PT i pada nivoa D-dimera, ali ove razlike nisu bile statistički značajne.

Tabela 15. Vrednosti aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (aPTT) i protrombinskog vremena (PT) izražene u sekundama i u odnosu na normalne vrednosti (R) (aPTT (sec), aPTT (R), PT (sec), PT (R), $x \pm SD$), fibrinogena (Fib, g/L, $x \pm SD$) i D-dimera (Ddi, mg/L, $x \pm SD$) u serumu pacova tretiranih terapijskom dozom raloksifena intravenski.

	Kontrola (K)	RAL i.v.	RAL i.v. + ŽK	RAL i.v. + ŽK + API	RAL i.v. + API
aPTT (sec)	14.61±1.03	13.92±0.86	13.43±0.58*	12.74±0.31*	13.76±0.84
aPTT (R)	0.54±0.04	0.52±0.03	0.50±0.02*	0.48±0.01*	0.51±0.03
PT (sec)	9.41±0.37	9.08±0.23	8.48±0.19* ^x	8.60±0.24* ^x	8.44±0.29* ^x
PT (R)	0.85±0.03	0.82±0.02	0.76±0.02* ^x	0.78±0.02* ^x	0.76±0.03* ^x
Fib (g/L)	1.04±0.098	1.71±0.28*	2.21±0.57*	1.88±0.30*	2.48±0.50* ^x
DDi (mg/L)	0.12±0.02	0.14±0.04	0.12±0.02	0.11±0.01	0.12±0.02

* $p < 0,05$ u odnosu na kontrolu

^x $p < 0,05$ u odnosu na grupu tretiranu fiziološkim rastvorom i raloksifenom

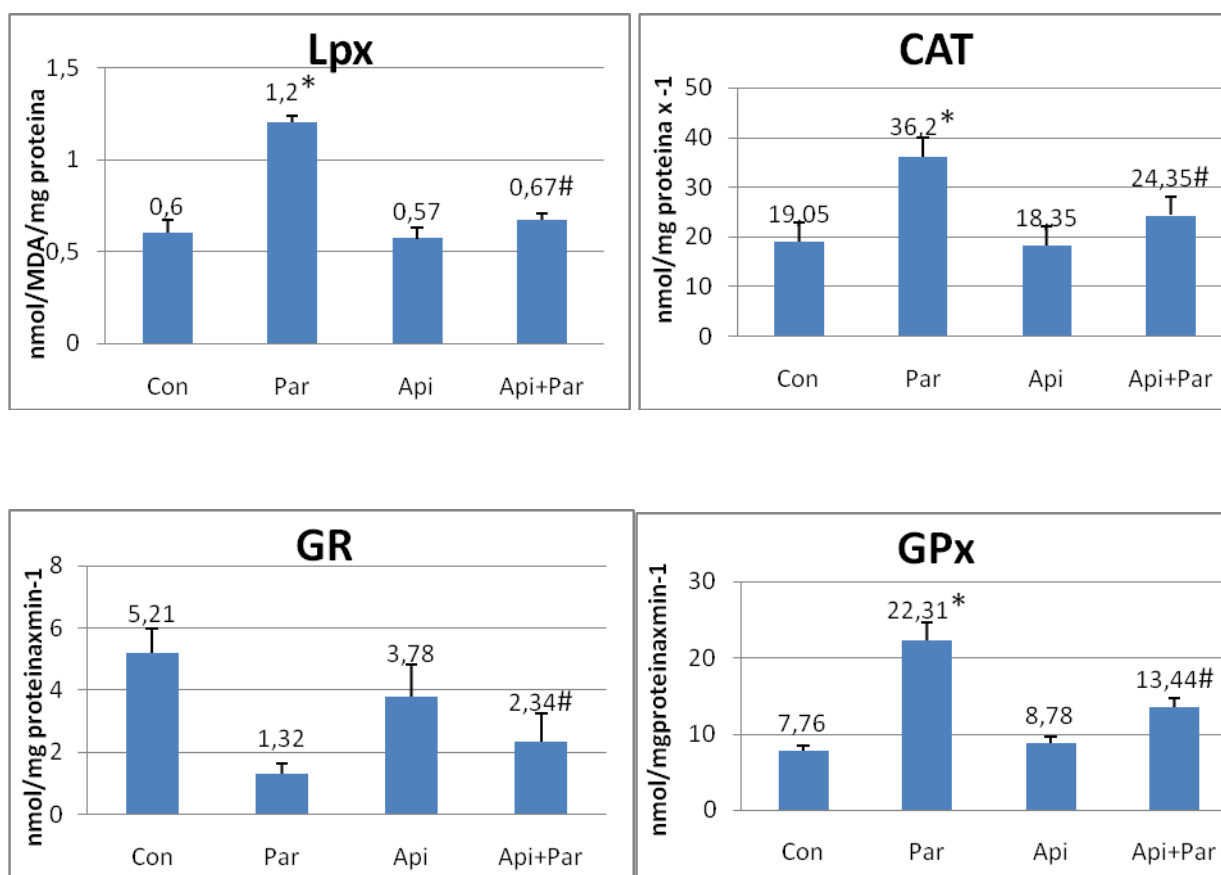
Raloksifen primenjen intravenski doveo je do statistički značajnog povećanja fibrinogena u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$. Kod ostalih parametara hemostaze nije bilo značajnih razlika između kontrolne grupe i grupe tretirane raloksifenom.

U grupi tretiranoj kombinacijom natrijum-deoksiholata i raloksifena, kao i u grupi tretiranoj trojnom kombinacijom natrijum-deoksiholata, apigenina i raloksifena došlo je do statistički značajnog skraćenja aPTT i protrombinskog vremena i značajnog povećanja nivoa fibrinogena u odnosu na kontrolu, $p < 0,05$. Pored toga, protrombinsko vreme je bilo statistički značajno kraće nakon primene kombinacije natrijum-deoksiholata i raloksifena, kao i nakon primene trojne kombinacije, u odnosu na grupu tretiranu raloksifenom, $p < 0,05$.

Kombinacija apigenina i raloksifena je dovela do statistički značajnog skraćenja protrombinskog vremena i smanjenja nivoa fibrinogena u odnosu na kontrolnu i grupu tretiranu raloksifenom, $p < 0,05$. Kombinacija apigenina i raloksifena je pokazala približno iste vrednosti svih parametara hemostaze kao i kombinacija natrijum-deoksiholata i raloksifena.

5.4. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti apigenina

Prilikom ispitivanja antioksidativnog potencijala apigenina da prevenira biohemijske promene u jetri pacova nakon primene toksične doze paracetamola meren je nivo malondialdehida (MDA) i aktivnost katalaze (CAT), glutation reduktaze (GR), glutation peroksidaze (GPx) kao biomarkera oksidativnog stresa, odnosno stanja endogenog sistema antioksidativne zaštite.



Grafikon 10. Nivo lipidne peroksidacije (LPx), i aktivnost katalaze (CAT), glutation reduktaze (GR), glutation peroksidaze (GPx) u homogenatima jetre.

* - statistički značajno različite vrednosti od kontrolne grupe (Con)

- statistički značajno različite vrednosti od grupe koja je dobijala paracetamol (Par)

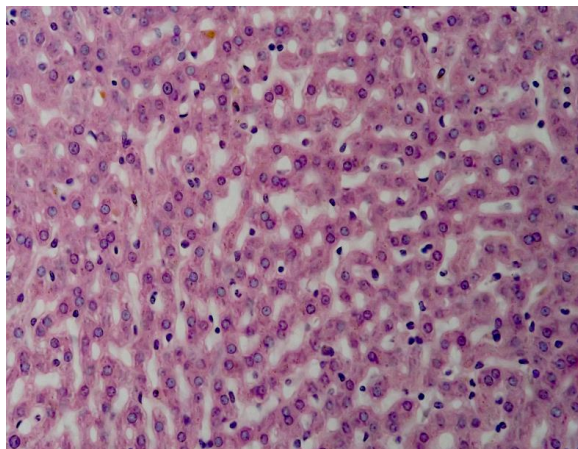
Jednokratna toksična doza paracetamola dovela je do dvostrukog povećanja nivoa hepatičnog MDA u poređenju sa kontrolnom grupom, što ukazuje na oksidativno oštećenje ćelijske membrane. Kao što je prikazano na grafikonu 10, u grupi tretiranoj kombinacijom apigenina i paracetamola nivo MDA je bio značajno niži u odnosu na grupu koja je dobijala samo paracetamol, pri čemu su vrednosti MDA bile približne vrednostima u kontrolnoj grupi, $p < 0,05$.

Aktivnosti enzima katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx) u homogenatima jetre bile su značajno povećano nakon primene toksične doze paracetamola u odnosu na kontrolnu grupu. Kombinacija apigenina i paracetamola dovela je do statistički značajnog smanjenja aktivnosti enzima CAT i GPx u odnosu na aktivnost ovih enzima u grupi životinja tretiranih samo paracetamolom, $p < 0,05$.

Vrednosti enzima glutation reduktaze (GR) u grupi koja je dobijala paracetamol pokazale su smanjenu aktivnost u odnosu na kontrolu. U grupi tretiranoj kombinacijom apigenina i paracetamola aktivnost enzima GR je bila statistički značajno veća u odnosu na grupu tretiranu paracetamolom, $p < 0,05$.

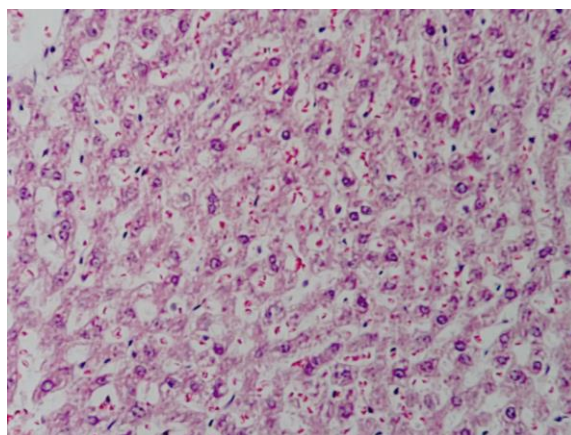
Rezultati ispitivanja pokazuju da pretretman apigeninom može delimično da reguliše parametre homogenata jetre izmenjene toksičnom dozom paracetamola, s obzirom da je pokazano da apigenin može vratiti aktivnost enzima CAT i GR na vrednosti približne vrednostima u kontrolnoj grupi.

5.5. Patohistološka ispitivanja



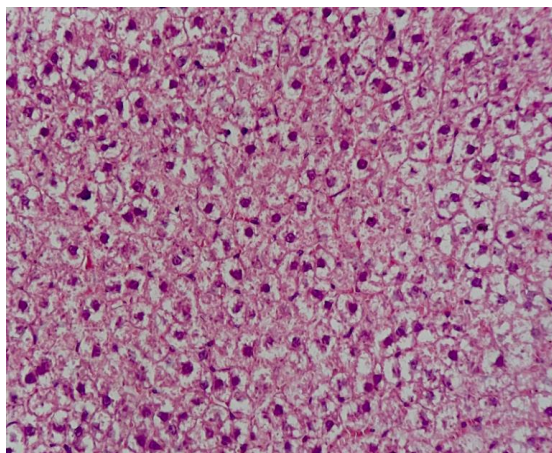
Slika 14. Fiziološki rastvor 6 dana - kontrola (K)

Slika 14. Fiziološki rastvor 6 dana - kontrola (K): Histološka građa jetre je u potpunosti očuvana. Hepatociti su svetle acidofilne citoplazme sa jasno centralno postavljenim jedrom. Sinusoidalni kapilari nisu prošireni i u Kiernanovim prostorima nema patoloških promena.



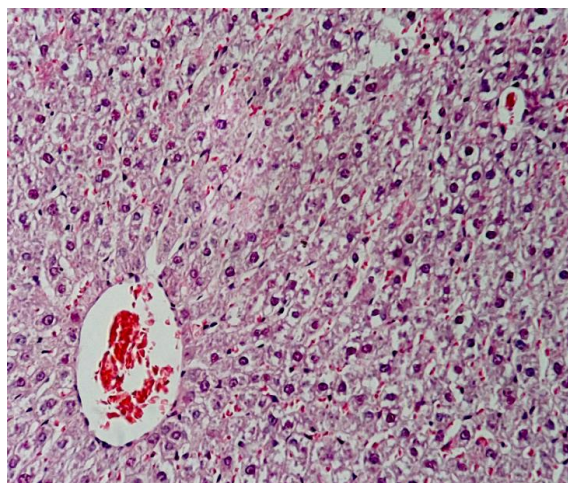
Slika 15. Apigenin per os 6 dana (API)

Slika 15. Apigenin per os 6 dana (API): Materijal predstavlja isečak tkiva jetre očuvane citoarhitektonike i pravilnosti građe jetre. Hepatociti se karakterišu blažim stepenom parenhimatozne degeneracije, ali bez uočljivih promena u sinusoidalnim prostorima u odnosu na hepatocite kod životinja tretiranih fiziološkim rastvorom. Kiernanovi prostori su uobičajenih histoloških karakteristika.



Slika 16. Paracetamol per os jednokratno, toksična doza (PAR)

Slika 16. Paracetamol per os jednokratno, toksična doza (PAR): Materijal predstavlja isečak tkiva jetre očuvane citoarhitektonike i pravilnosti građe jetre. Hepatociti se karakterišu većim stepenom parenhimatozne degeneracije, ali bez uočljivih promena u sinusoidalnim prostorima. Kiernanovi prostori su uobičajenih histoloških karakteristika.



Slika 17. Toksična doza paracetamola nakon 6 dana tretiranja apigeninom per os (API+PAR)

Slika 17. Toksična doza paracetamola nakon 6 dana tretiranja apigeninom per os (API+PAR): Materijal predstavlja isečak jetrenog tkiva histološki očuvane građe i arhitektonike. Hepatociti su bez patoloških promena i formiraju Kiernanove gredice koje ograničavaju sinusoidalne prostore pravilnih dimenzija. Kiernanovi prostori su bez patoloških promena i sadržaja.

6. DISKUSIJA

6.1. Farmakokinetička ispitivanja

Raloksifen nakon peroralne primene ima vrlo nisku bioraspoloživost, pri čemu postoje i interindividualne razlike među ljudima u farmakokinetici raloksifena (i do 30%). Intenzivan metabolizam već u crevima i jetri dovodi do toga da apsolutna biološka raspoloživost ovog leka posle *per os* primene iznosi 2% (Jeong et al., 2004; Morello et al., 2003). Zbog toga je u radu ispitivan potencijal apigenina i natrijum-deoksiholata da povećaju bioraspoloživost raloksifena kod pacova.

Nakon jednokratne intravenske aplikacije raloksifena koncentracija leka konstantno opada. Međutim, zbog enterohepatičke recirkulacije, kojoj podleže raloksifen, u svim grupama životinja tretiranih raloksifenom intravenski, u merenjima između drugog i četvrtog sata je došlo do blagog povećanja koncentracija raloksifena u serumu u odnosu na prethodne tačke merenja (Jeong et al., 2004; Czock et al., 2005). Isti fenomen je primećen i kod jedine životinje tretirane raloksifenom *per os*, a kod koje su dobijene merljive koncentracije raloksifena, s tim što je blagi porast koncentracije raloksifena nastupio nešto kasnije, nakon četvrtog sata od primene leka. Ovaj kasniji porast koncentracije raloksifena nakon *per os* primene je takođe očekivan, s obzirom da su resorpcija i postizanje maksimalnih koncentracija sporije kod peroralnog nego kod intravenskog davanja leka.

Već u prvom merenju, 15 minuta nakon intravenske aplikacije, koncentracija raloksifena u krvi je bila vrlo niska u grupi tretiranoj kombinacijom natrijum-deoksiholata i raloksifena u poređenju sa grupom koja je dobijala samo raloksifen. I u narednim merenjima u grupi 4 (RAL i.v. + ŽK) koncentracija raloksifena je bila vrlo niska. Žučne kiseline olakšavaju prolazak supstanci kroz sve biološke membrane, te mogu uticati i na resorpciju, ali i na distribuciju lekova

u organizmu (Mikov et al., 2006; Zhao et al., 2011). Stoga se može zaključiti da je pretretman natrijum-deoksiholatom u grupi 4 doveo do olakšanog i brzog izlaska raloksifena iz krvi, odnosno distribucije u periferne kompartmane i vrlo niskih koncentracija raloksifena u centralnom kompartmanu. Ovaj efekat je bio u manjoj meri izražen u grupi 5, koja je pretretirana i natrijum-deoksiholatom i apigeninom, s obzirom da apigenin inhibiše metabolizam raloksifena i povećava njegovu bioraspoloživost u krvi (Chen et al., 2010), te su u ovoj grupi izmerene više koncentracije nego u grupi 4 (RAL i.v. + ŽK).

Konstanta eliminacije je bila značajno niža u grupama koje su pretretirane natrijum-deoksiholatom i apigeninom u odnosu na grupu tretiranu samo raloksifenom intravenski.

Poluvreme eliminacije je vreme potrebno da se 50% leka eliminiše iz organizma (Fitzpatrick, 2004). S obzirom da je poluvreme eliminacije parametar koji se direktno izvodi iz konstante eliminacije i da je poluvreme eliminacije obrnuto proporcionalno konstanti eliminacije, poluvreme eliminacije je značajno produženo u grupama životinja koje su pretretirane natrijum-deoksiholatom i apigeninom u odnosu na grupu tretiranu samo raloksifenom intravenski.

Površina ispod krive, koja je značajno niža u grupi 2 pretretiranoj natrijum-deoksiholatom, je osnovni pokazatelj biološke raspoloživosti lekova, pa i raloksifena. Međutim, s obzirom na značajne promene i ostalih farmakokinetičkih parametara, može se zaključiti da je u prisustvu natrijum-deoksiholata došlo do brze distribucije raloksifena izvan centralnog kompartmana (plazme), te se vrednosti površine ispod krive ne mogu posmatrati izolovano, niti zaključiti da je smanjena količina leka u sistemu, već samo u plazmi.

U grupi 4 (RAL i.v. + ŽK) volumen distribucije je čak oko 29 puta povećan u odnosu na grupu tretiranu samo raloksifenom intravenski, a grupa 4 je imala najniže koncentracije

raloksifena u krvi. Ovo se može objasniti time da je natrijum-deoksiholat doveo do brze distribucije raloksifena iz plazme u periferne kompartmane. Primena apigenina je takođe dovela do povećanja volumena distribucije raloksifena, ali u znatno manjem obimu nego natrijum-deoksiholat.

U grupi 4 (RAL i.v. + ŽK) klirens je bio gotovo 7 puta veći u odnosu na grupu 2 (RAL i.v.), dok je u grupama 5 i 7 klirens bio približan klirensu u grupi 2. S obzirom da je klirens direktno proporcionalan konstanti eliminacije i volumenu distribucije ($CL = \lambda_z \cdot V_d$), očekivano je da je klirens značajno povećan u grupi 4, jer je u toj grupi volumen distribucije povećan gotovo 29 puta u odnosu na grupu 2, dok je vrednost konstante eliminacije u grupi 4 oko 5 puta manja nego u grupi 2. Klirens predstavlja zapreminu plazme koja se u jedinici vremena očisti od leka. Iako se to prvenstveno odnosi na eliminaciju iz plazme putem metabolizma i ekskrecije, uklanjanje leka iz plazme se može ubrzati i brzom distribucijom u periferne kompartmane u organizmu, što može biti objašnjenje za značajno povećanje klirensa u grupi koja je pretretirana natrijum-deoksiholatom. Ova činjenica potvrđuje prethodno iznete zaključke o snažnom uticaju natrijum-deoksiholata na distribuciju raloksifena izvan plazme, olakšavanjem prodora kroz biomembrane. Prema ranijim podacima, različiti nosači lekova, kao što su lipozomi, polimeri i lipidne emulzije, brzo se uklanjaju iz plazme i nagomilavanju se u perifernim tkivima (Juliano, 1988). Žučne kiseline spadaju u potencijalne nosače različitih lekova, odnosno supstance koje olakšavaju resorpciju lekova, čime mogu povećati biorasploživost lekova sa lošom resorpcijom (Enhsen et al., 1998; Tsuji and Tamai, 1996).

Srednje vreme zadržavanja (MRT) predstavlja prosečno vreme prisustva molekula leka u organizmu (Veng-Pedersen, 1989). U grupama pretretiranim natrijum-deoksiholatom i apigeninom srednje vreme zadržavanja je bilo značajno produženo u odnosu na grupu tretiranu

samo raloksifenom intravenski. Značajno produženo poluvreme eliminacije i srednje vreme zadržavanja u grupama 4, 5 i 7 pokazuju da natrijum-deoksiholat i apigenin dovode do značajno dužeg zadržavanja raloksifena u organizmu.

S obzirom da nakon peroralne primene raloksifena koncentracije u krvi nisu bile merljive, može se zaključiti da značajna količina leka nije ni bila resorbovana, odnosno da je završila u fecesu nepromenjena, što je potvrđeno prilikom određivanja količine raloksifena u fecesu.

Količina raloksifena u urinu je bila vrlo niska u svim eksperimentalnim grupama, što se može objasniti intenzivnim metabolizmom raloksifena u crevima i jetri, odnosno malom količinom nepromenjenog leka koji dospeva do urina. Prema podacima proizvođača leka, raloksifen se u najvećoj meri eliminiše iz organizma putem fecesa. Manje od 0,2% raloksifena se eliminiše nepromenjeno urinom, a manje od 6% se izlučuje urinom u obliku glukuronida (Eli Lilly and Company, 1997).

Pretretman natrijum-deoksiholatom i apigeninom je doveo do značajnog povećanja količine raloksifena u urinu i fecesu, kako kod intravenske, tako i kod peroralne primene raloksifena. Međutim, zbog velike disperzije uzorka i varijacije kod pojedinačnih životinja, ta promena nije bila i statistički značajna.

Pretretman kombinacijom natrijum-deoksiholata i apigenina u grupi tretiranoj raloksifenom *per os* doveo je do statistički značajnog povećanja količine raloksifena u fecesu u odnosu na grupu tretiranu samo raloksifenom *per os*, kao i u odnosu na sve grupe koje su tretirane raloksifenom intravenski. S obzirom da žučne kiseline podležu intenzivnoj enterohepatičkoj recirkulaciji kao i raloksifen, može se zaključiti da su natrijum-deoksiholat i raloksifen konkurisali međusobno za enterohepatičko kruženje, te da je zbog ometanja

reapsorpcije raloksifena iz creva došlo do povećane količine raloksifena u fecesu (Czock et al., 2005; Hofmann, 1976; Morello et al., 2003).

6.2. Biohemijska i toksikološka ispitivanja

6.2.1. Uticaj natrijum-deoksiholata i apigenina na biohemijske parametre u serumu nakon primene terapijske doze raloksifena

Ispitivan je uticaj raloksifena, datog *per os* i intravenski, kao i apigenina i natrijum-deoksiholata na biohemijske parametre, odnosno pokazatelje funkcije bubrega i jetre, kod pacova. Funkcija bubrega je ispitivana određivanjem koncentracije uree, mokraćne kiseline i kreatinina, dok je funkcija jetre ispitivana na osnovu aktivnosti ALP, ALT, AST, GGT i nivoa direktnog bilirubina.

Efekti na ispitivane parametre su bili slični u odgovarajućim grupama koje su dobijale raloksifen peroralno i intravenski, pri čemu su značajnije promene primećene u grupama tretiranim raloksifenom intravenski, što je očekivano s obzirom da je bioraspoloživost lekova veća nakon intravenske primene u odnosu na *per os* aplikaciju.

Intravenska primena terapijske doze raloksifena je dovela do statistički značajnog povećanja aktivnosti alkalne fosfataze (ALP), alanin i aspartat transaminaze (ALT, AST), gama-glutamil transferaze (GGT) u poređenju sa kontrolom. Iako se u većini radova navodi da nema podataka da raloksifen dovodi do hepatotoksičnosti, rezultati jedne studije slučaja ukazuju na povećanje enzima ALT i ALP kod primene terapijske doze raloksifena (Vilches et al., 1998). Aktivnost ALP u serumu pacova tretiranih kombinacijom raloksifena (i.v.) i natrijum-deoksiholata je značajno niža u poređenju sa aktivnošću ovog enzima kod grupe tretirane raloksifenom i nije statistički značajno različita od vrednosti u kontrolnoj grupi, te se može zaključiti da žučna kiselina može da vrati vrednosti enzima jetre u fiziološke granice. Prema

ranijim istraživanjima aktivnost ALP je značajno povišena kod oboljenja jetre i kostiju (Moss, 1982).

U grupi životinja koja je tretirana kombinacijom raloksifena (i.v.) i apigenina aktivnost ALT i AST su bile statistički značajno niže u odnosu na grupu tretiranu raloksifenom, dok je peroralna primena raloksifena u kombinaciji sa apigeninom dovela do značajnog smanjenja nivoa ALT u odnosu na grupu tretiranu raloksifenom. Rezultati ranije studije su pokazali da raloksifen dovodi do povećanja vrednosti ALT i AST (Takamura et al., 2007). Kao i u našem istraživanju, rezultati drugih studija ukazuju da apigenin sprečava porast aktivnosti serumskih transaminaza i alkalne fosfataze nastao primenom raloksifena (Ali et al., 2014).

Aktivnost ALP i ALT u serumu pacova tretiranih kombinacijom raloksifena (p.o.) i natrijum-deoksiholata je značajno niža u poređenju sa aktivnošću ovih enzima kod grupe tretirane raloksifenom. Ovaj nalaz bi se mogao objasniti pretpostavkom da natrijum-deoksiholat dovodi do veće distribucije raloksifena u druga tkiva u odnosu na jetru, zbog čega je onda i efekat raloksifena na enzime jetre smanjen. Međutim, ova pretpostavka zahteva dodatna istraživanja.

Aktivnost GGT u serumu pacova tretiranih kombinacijom apigenina i raloksifena je značajno viša nego u grupi tretiranoj samo raloksifenom. U istraživanju u kojem je ispitivan hepatoprotektivan uticaj flavonoida iz peršuna nakon primene CCl₄, utvrđeno je da apigenin i drugi flavonoidi prisutni u peršunu statistički značajno snižavaju nivo enzima ALP, ALT i AST, ali ne utiču značajno na nivo GGT, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom istraživanju (Khalil et al., 2015).

Koncentracija direktnog bilirubina u serumu pacova tretiranih kombinacijom natrijum-deoksiholata i raloksifena *per os* je bila značajno viša u poređenju sa grupom tretiranom

raloksifenom, dok je u grupi tretiranoj kombinacijom apigenina i raloksifena nivo direktnog bilirubina bio statistički značajno niži u odnosu na kontrolu. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjem gde je pokazano da apigenin i drugi flavonoidi snižavaju nivo bilirubina kod pacova kojima je prethodno povišen nivo bilirubina primenom CCl_4 (Khalil et al., 2015).

Kod višekratne peroralne primene raloksifena (14 dana) došlo je do značajnog smanjenja nivoa uree i kreatinina u poređenju sa kontrolom. Intravenska primena terapijske doze raloksifena je dovela do statistički značajnog smanjenja nivoa uree, mokraćne kiseline i kreatinina u serumu pacova u poređenju sa kontrolom. Nivo mokraćne kiseline u grupi pacova tretiranih kombinacijom raloksifena (i.v.) i natrijum-deoksiholata je statistički značajno viši u odnosu na grupu tretiranu raloksifenom i približno je jednak koncentraciji mokraćne kiseline u kontrolnoj grupi. Nivo mokraćne kiseline je značajno niži u grupi tretiranoj kombinacijom raloksifena (i.v.) i apigenina u poređenju sa grupom koja je dobijala raloksifen. Koncentracija uree u svim eksperimentalnim grupama je bila značajno niža u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je nivo kreatinina bio statistički značajno niži u grupama životinja koje su dobijale kombinacije raloksifen – natrijum-deoksiholat i raloksifen – apigenin u odnosu na kontrolu. Raloksifen nije doveo do značajnog poremećaja pokazatelja bubrežne funkcije, odnosno u većini eksperimentalnih grupa je došlo do sniženja nivoa uree, mokraćne kiseline i kreatinina u odnosu na kontrolu. Stoga sniženje parametara bubrežne funkcije koje je pokazano u grupama tretiranih kombinacijom raloksifena i apigenina nije dovoljno da bi se mogao izvesti zaključak o renoprotektivnom efektu apigenina. Snižen nivo pokazatelja bubrežne funkcije u grupi tretiranoj raloksifenom i apigeninom je u skladu sa istraživanjem Khalil i saradnika koji su utvrdili da

pretretman apigeninom i drugim flavonoidima iz peršuna smanjuje nivo uree, mokraćne kiseline i kreatinina nakon primene toksičnih doza CCl₄ (Khalil et al., 2015).

U istraživanju koje su sprovedli Ishani i saradnici utvrđeno je da raloksifen nije značajno promenio klirens kreatinina u odnosu na kontrolnu grupu, ali da ne postoji dovoljno dokaza o bezbednosti raloksifena za primenu kod pacijenata sa teškom insuficijencijom bubrega (Ishani et al., 2008). U uputstvu za upotrebu leka raloksifen navedeno je da nema dovoljno podataka o bezbednosti raloksifena kada se primenjuje kod pacijenata koji imaju ozbiljno oštećenu funkciju bubrega ili jetre i da je potreban oprez kod primene raloksifena kod ove dve grupe pacijenata (Eli Lilly and Company, 1997; EMEA, 2009).

S obzirom da su u ovom ispitivanju apigenin i natrijum-deoksiholat primenjeni u kombinaciji sa raloksifenom kako bi poboljšali njegovu bioraspodivnost, što je i potvrđeno u radu, time se može objasniti i činjenica da je uticaj raloksifena na pojedine parametre funkcije jetre i bubrega bio izraženiji u kombinaciji sa apigeninom i natrijum-deoksiholatom.

Vrednosti svih ispitivanih parametara (ALP, ALT, AST, GGT, uree, mokraćne kiseline i direktnog bilirubina), izuzev kreatinina za koji nisu dobijeni rezultati, u serumu pacova tretiranih trojnom kombinacijom raloksifena (bilo primenjenog *per os* ili intravenski), natrijum-deoksiholata i apigenina bile su statistički značajno niže u poređenju sa vrednostima ovih parametara u kontrolnoj grupi i grupi tretiranoj raloksifenom, što ukazuje na potencijalno sinergističko hepatoprotektivno delovanje apigenina i natrijum-deoksiholata. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodno navedenim istraživanjima (Ali et al., 2014; Khalil et al., 2015).

6.2.2. Uticaj apigenina na biohemijske parametre seruma nakon primene toksične doze paracetamola

S obzirom da je apigenin ispoljio pozitivne efekte na parametre funkcije jetre i, donekle,

bubrega kod životinja tretiranih terapijskom dozom raloksifena, dodatno je ispitano i potencijalno hepatoprotektivno i renoprotektivno delovanje apigenina kod životinja tretiranih toksičnom dozom paracetamola. Prema literaturnim podacima, pacovi predstavljaju vrstu sisara koja je manje osetljiva na prooksidantno delovanje paracetamola u odnosu na druge animalne modele, npr. miševe (Kobayashi et al., 2015; McGill et al., 2012).

U sprovedenom ispitivanju, toksična doza paracetamola je dovela do značajnog porasta aktivnosti serumskih transaminaza i do povećanja koncentracije direktnog bilirubina. Nakon primene paracetamola životinjama koje su prethodno tokom 6 dana pretretirane apigeninom, vrednosti pomenutih biohemijskih parametara se nisu značajnije razlikovale u odnosu na vrednosti izmerene kod kontrolne grupe životinja. U prethodnim istraživanjima ispitivan je uticaj apigenina na biohemijske pokazatelje funkcije jetre kod pacova izloženih N-nitrozodietilaminu, supstance koja se često koristi za izazivanje hepatotoksičnog efekta. Prema rezultatima pomenute studije, apigenin je sprečio porast aktivnosti aspartat (AST) i alanin (ALT) transaminaze, kao i aktivnosti alkalne fosfataze i laktat dehidrogenaze (Ali et al., 2014). Kada se uporede rezultati pomenutog istraživanja sa rezultatima iz ovog rada, uočava se da u oba slučaja primena apigenina sprečava nastanak poremećaja biohemijskih parametara, pokazatelja funkcije jetre u serumu pacova.

Ciklosporin predstavlja imunosupresivni lek čija primena izaziva oštećenje funkcije bubrega, kao najčešće dozno zavisno neželjeno delovanje (Kahan, 1989; Kopp and Klotman, 1990; Naesens et al., 2009). U ispitivanju sprovedenom od strane Xiao i saradnika, ispitivana je uloga prirodnih antioksidanasa kao što su sulfatni polisaharidi, polifenoli prisutni u čaju, apigenin i kurkumin na apoptozu renalnih epitelnih ćelija izloženih ciklosporinu. Primena pomenutih supstanci je značajno sprečila oštećenje renalnih epitelnih ćelija tj. njihovu apoptozu i

dovela je do značajnog produženja preživljavanja renalnih ćelija u *in vitro* uslovima (Xiao et al., 2013). U ispitivanju koje su sproveli Zhong i saradnici utvrđeno je da biljni polifenoli značajno smanjuju oštećenja bubrega nastala primenom ciklosporina i takrolimusa (Zhong et al., 2006).

U našem istraživanju, koncentracije uree i mokraćne kiseline su bile značajno niže kod grupe životinja koje su, pre toksične doze paracetamola, bile pretretirane apigeninom. Zbog toga se apigenin može smatrati ne samo hepatoprotektivnom, već i supstancom koja ima izražen renoprotektivni potencijal.

6.3. Ispitivanje uticaja na parametre hemostaze

Terapijska doza raloksifena primenjenog *per os* dovela je do statistički značajnog skraćenja aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (aPTT) i pada vrednosti D-dimera, kao i do statistički značajnog povećanja nivoa fibrinogena u odnosu na kontrolu. Prema rezultatima Eilertsena i sar. očekivan je pad vrednosti D-dimera nakon primene terapijske doze raloksifena (Eilertsen et al., 2006). U studiji u koju su bile uključene 33 žene u postmenopauzi, primena raloksifena u periodu od 3 meseca je dovela do statistički značajnog pada nivoa fibrinogena (Roqué et al., 2011).

Kombinacija natrijum-deoksiholata i raloksifena (p.o.) dovela je do statistički značajnog skraćenja aPTT izraženog u sekundama u odnosu na kontrolu, kao i do skraćenja protrombinskog vremena (PT) u odnosu na kontrolnu grupu i grupu tretiranu raloksifenom. Može se izvesti zaključak da natrijum-deoksiholat potencira efekte raloksifena na parametre hemostaze.

U grupi životinja tretiranoj trojnom kombinacijom natrijum-deoksiholata, apigenina i raloksifena (p.o.) došlo je do statistički značajnog skraćenja aPTT, kao i do značajnog povećanja nivoa fibrinogena u odnosu na kontrolu. U poređenju sa grupom tretiranom raloksifenom, trojna kombinacija nije pokazala značajne razlike ni kod jednog parametra.

Kombinacija apigenina i raloksifena (p.o.) je dovela do statistički značajnog skraćenja aPTT i smanjenja nivoa Ddi u odnosu na kontrolu. Vrednosti svih parametara u grupi tretiranoj kombinacijom apigenina i raloksifena su približno iste vrednostima u grupi tretiranoj raloksifenom, te se može zaključiti da apigenin nije imao dodatni uticaja na parametre hemostaze kada je primenjen u kombinaciji sa raloksifenom.

Nakon hronične primene raloksifena *per os* (14 dana) došlo je do statistički značajnog povećanja nivoa fibrinogena u odnosu na kontrolu. Hronična primena raloksifena dovela je do skraćenja aPTT i PT i pada nivoa D-dimera, ali ove razlike nisu bile statistički značajne. Ovakvi rezultati su u skladu sa ranijim istraživanjima (Eilertsen et al., 2006).

Raloksifen primenjen intravenski doveo je do statistički značajnog povećanja fibrinogena u odnosu na kontrolu. Kod ostalih parametara hemostaze nije bilo značajnih razlika između kontrolne grupe i grupe tretirane raloksifenom.

U grupi tretiranoj kombinacijom natrijum-deoksiholata i raloksifena (i.v.), kao i u grupi tretiranoj trojnom kombinacijom natrijum-deoksiholata, apigenina i raloksifena došlo je do statistički značajnog skraćenja aPTT i protrombinskog vremena i značajnog povećanja nivoa fibrinogena u odnosu na kontrolu. Pored toga, protrombinsko vreme je bilo statistički značajno kraće nakon primene kombinacije natrijum-deoksiholata i raloksifena (i.v.), kao i nakon primene trojne kombinacije, u odnosu na grupu tretiranu raloksifenom.

Kombinacija apigenina i raloksifena (i.v.) je dovela do statistički značajnog skraćenja protrombinskog vremena i smanjenja nivoa fibrinogena u odnosu na kontrolnu i grupu tretiranu raloksifenom. Kombinacija apigenina i raloksifena je pokazala približno iste vrednosti svih parametara hemostaze kao i kombinacija natrijum-deoksiholata i raloksifena.

S obzirom da je najozbiljnije neželjeno dejstvo raloksifena venska tromboembolija, očekivan je njegov uticaj na ispitivane parametre hemostaze (Cosman et al., 2005). Prema dostupnoj literaturi ne postoje podaci da žučne kiseline i apigenin utiču na ove parametre. U ovom ispitivanju je pokazano da natrijum-deoksiholat i apigenin mogu da utiču na povećanu bioraspoloživost raloksifena, te je očekivano da ova promena u farmakokinetici raloksifena utiče i na njegovu farmakodinamiku. Time se mogu objasniti rezultati ispitivanja parametara hemostaze u ovom radu, koji ukazuju da su kombinacije apigenina i natrijum-deoksiholata sa raloksifenom dovele do statistički značajne razlike parametara hemostaze u odnosu na grupe tretirane samo raloksifenom.

6.4. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti apigenina

U cilju zaštite i održanja homeostaze, tokom evolucije je razvijen endogeni antioksidativni odbrambeni sistem aerobne ćelije. Antioksidativni odbrambeni sistem ima sposobnost neutralizacije nastalih reaktivnih kiseoničnih vrsta, čime se prevenira pojava oštećenja i doprinosi reparaciji već nastalih. Celularna zaštita od oksidativnog stresa uključuje prevenciju, antagonizam i reparaciju. Prevencijom se smanjuje produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta putem helacije ili inaktivacije toksičnih supstanci, pre svega teških metala. Antagonizam se ostvaruje preko antioksidativno delujućih enzima, odnosno razgradnjom reaktivnih kiseoničnih vrsta ili neenzimskim mehanizmima, direktnim stupanjem u reakciju i neutralizacijom reaktivnih kiseoničnih vrsta. Među neenzimskim antioksidativnim supstancama nalaze se endogene supstance (glutation, transferin, feritin), vitamini, kao i flavonoid apigenin, čija je antioksidativna aktivnost u ovom radu ispitana (Kohen and Nyska, 2002; Kooti et al., 2014; Marnet, 2000; Muller et al., 2007).

Lipidna peroksidacija je jedan od osnovnih mehanizama oštećenja tkiva, koje je izazvano slobodnim radikalima (Esterbauer et al., 1990). Malondialdehid (MDA) je sekundarni produkt lipidne peroksidacije, koji se koristi kao indikator oštećenja ćelijske membrane. U ovom radu je pokazana sposobnost apigenina da spreči paracetamolom indukovano povećanje nivoa MDA, što ukazuje na potencijal apigenina da očuva ćelijski integritet. U istraživanju Singh i saradnika pokazano je da primena apigenina kod pacova kojima je hepatokarcinogeneza indukovana posredstvom NDEA (N-nitrozodietilamin) i fenobarbitona može da smanji nivo lipidne peroksidacije (Singh et al., 2004). Prethodna istraživanja su pokazala da hidrogenizacija dvostruke veze između C₂ i C₃ atoma u prstenu smanjuje antiperoksidativni efekat (Cholbi et al., 1991; Mora et al., 1990). Ovaj efekat se može objasniti potencijalom apigenina da hvata slobodne radikale, ili da indukuje antioksidativne enzime u ćelijama jetre. Iako precizan mehanizam antioksidativnog efekta nije utvrđen, rezultati u radu ukazuju da apigenin može da prekine lančanu reakciju lipidne peroksidacije i zaštititi ćelijsku membranu od oštećenja. Endogeni antioksidativni sistem može da stupi u interakciju sa RKV i smanji nivo oksidativnog stresa. Antioksidativna odbrana organizma neutrališe efekte RKV različitim enzimskim i neenzimskim mehanizmima (Seifried et al., 2007).

U ovom radu aktivnost antioksidativnih enzima je značajno promenjena nakon primene paracetamola. Antioksidantni enzimi glutation peroksidaza (GPx) i katalaza (CAT) katališu reakciju redukcije peroksida do alkohola i vode, dok glutation reduktaza (GR) redukuje glutation disulfid, proizvod redukcije peroksida, u sulfhidrilnu formu glutationa (GSH) (Zhu et al., 2012). Toksične doze paracetamola izazvale su značajan pad aktivnosti enzima CAT i GR, što može biti posledica prekomerne produkcije slobodnih radikala i inaktivacije enzima. Rezultati u ovom radu pokazuju da apigenin primenjen u kombinaciji sa paracetamolom može da vrati vrednosti enzima

CAT i GR u fiziološke granice, odnosno približno nivou enzima u kontrolnoj grupi. Sa druge strane, primena paracetamola je dovela do neočekivanog porasta aktivnosti enzima GPx, što nije u skladu sa rezultatima slične studije, gde je takođe ispitivan antioksidativni potencijal apigenina, i u kojoj je paracetamol doveo do pada aktivnosti GPx (Singh et al., 2004). Moguće objašnjenje za ovaj neočekivani porast aktivnosti enzima GPx nakon toksične doze paracetamola je činjenica da se u uslovima oksidativnog stresa može javiti ushodna regulacija GPx, kao adaptivni odgovor hepatocita na oksidativno oštećenje, što za posledicu ima povećanje aktivnosti enzima (Halliwell and Gutteridge, 1984).

6.5. Patohistološka ispitivanja

U prethodnim istraživanjima za izazivanje oksidativnog stresa je korišćena izrazito prooksidativna supstanca, ugljen-tetrahlorid (Rašković et al., 2014). Rezultati ove studije su pokazali da ugljen-tetrahlorid izaziva ireverzibilno histološko oštećenje tkiva jetre, koje se ne može sprečiti ili ublažiti pretretmanom nekom od antioksidantnih supstanci. Zbog toga je u ovom ispitivanju korišćen drugi model prooksidativnog oštećenja parenhimatoznih organa, primenom toksičnih doza paracetamola, koje dovode do patohistoloških, ali ne i do nekrotičnih primena, čiji nastanak je teško sprečiti primenom antioksidantnih supstanci.

Analizom uzoraka jetre bojenih metodom hematoksilin-eozin utvrđeno je da je apigenin sprečio pojavu parenhimatozne degeneracije hepatocita, uočljive u grupi životinja koje su tretirane samo toksičnom dozom paracetamola. Rezultati drugih autora objašnjavaju sprečavanje strukturnih promena tkiva primenom apigenina činjenicom da bioflavonoidi, u koje spada i apigenin, ugrađivanjem u dvostruke lipoproteinske strukture membrane, onemogućavaju njihovu lipidnu peroksidaciju i dalja oštećenja (Ahlenstiel et al., 2003; El Swefy et al., 2016).

7. ZAKLJUČCI

Natrijumova so deoksiholne kiseline i flavonoid apigenin ispoljavaju značajan efekat na farmakokinetiske i farmakodinamske osobine raloksifena.

Natrijum-deoksiholat i apigenin snižavaju koncentraciju raloksifena u krvi, ali dovode do povećanja distribucije ovog leka u periferne kompartmane, čime značajno produžavaju njegovo poluvreme eliminacije i srednje vreme zadržavanja u organizmu.

S obzirom da natrijum-deoksiholat i apigenin značajno produžavaju poluvreme eliminacije i vreme zadržavanja raloksifena, kao i da povećavaju volumen distribucije, ove supstance mogu biti predmet daljih istraživanja formulacija raloksifena, ali i drugih lekova, koje bi kao depo preparati, produženjem intervala doziranja, mogle značajno uticati na komplijansu i kvalitet života pacijenata.

U istraživanju je dokazano antioksidantno, hepatoprotektivno i renoprotektivno delovanje apigenina. Flavonoid apigenin smanjuje nivo lipidne peroksidacije, povećava enzimske antioksidativne mehanizme odbrane i sprečava oštećenje jetre i bubrega kod pacova izloženih toksičnoj dozi paracetamola.

Pretretman apigeninom i natrijum-deoksiholatom potencira dejstvo raloksifena na parametre hemostaze što je najverovatnije posledica njegove povećane biorasploživosti do koje dovode apigenin i natrijum-deoksiholat. Zbog toga je u daljim istraživanjima farmakoloških osobina raloksifena u formulacijama sa apigeninom i natrijum-deoksiholatom neophodno odrediti doze ove dve supstance koje bi zadržale korisna farmakodinamska delovanja, a da pri tome ne dovode do promena parametara hemostaze koje bi mogle ispoljiti negativan efekat na bezbednost njegove primene.

S obzirom da apigenin i natrijum-deoksiholat sprečavaju poremećaj parametara funkcije jetre u serumu životinja tretiranih raloksifenom, formulacije raloksifena sa apigeninom i natrijum-deoksiholatom predstavljaju osnovu za dalja istraživanja čiji cilj je povećanje bezbednosti primene ovog leka.

8. LITERATURA

1. Aebi H, Catalase BH. *Methods of Enzymatic Analysis*, 1974, 673-684. Verlag Chemic, Weinheim.
2. Ahlenstiel T, Burkhardt G, Köhler H, Kuhlmann MK. Bioflavonoids attenuate renal proximal tubular cell injury during cold preservation in Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. *Kidney Int* 2003; 63(2):554-63.
3. Ali F, Rahul SJ, Fatima A, Khanam S, Naz F, Siddique YH. Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014; 767:13-20.
4. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, Jacobson A, Crowther M, Palareti G. *Pharmacology and management of the vitamin K antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. *Chest*. 2008 Jun; 133(6 Suppl):160S-198S. doi: 10.1378/chest.08-0670.
5. Ali F, Rahul SJ, Fatima A, Khanam S, Naz F, Siddique YH. Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2014; 767:13-20.
6. Azevedo GD, Franco RF, Baggio MS, Maranhão TM, Ferriani RA, Silva de Sa MF. Effects of raloxifene therapy on the anticoagulant system in postmenopausal women. *Climacteric*. 2003 Jan 1; 6(2):140-5.
7. Bates SM, Weitz JI, Johnston M, Hirsh J, Ginsberg JS. Use of a fixed activated partial thromboplastin time ratio to establish a therapeutic range for unfractionated heparin. *Archives of internal medicine*. 2001 Feb 12; 161(3):385-91.

8. BBC Research Nutraceuticals: Global Markets and Processing Technologies. 2011, http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/nutraceuticals_markets-processing-technologies-fod013d.html.
9. Beers RFJ, Sizer JW. Spectrophotometric Method for Measuring of Breakdown of Hydrogen Peroxide by Catalase. *J. Biol. Chem.* 1950; 195:133-140.
10. Bhakuni GS, Bedi O, Bariwal J, Deshmukh R, Kumar P. Animal models of hepatotoxicity. *Inflamm. Res.* 2016; 65:13-24.
11. Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, Cullinan GJ, Bendele R, Kauffman RF, Bensch WR, et al. Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest.* 1994 Jan; 93(1):63-9.
12. Bryant HU, Glasebrook AL, Yang NN, Sato M. An estrogen receptor basis for raloxifene action in bone. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999 Apr-Jun; 69(1-6):37-44.
13. Cauley JA, El-Hajj FG, Arabi A, et al. Official Positions for FRAX(R) clinical regarding international differences from Joint Official Positions Development Conference of the International Society for Clinical Densitometry and International Osteoporosis Foundation on FRAX(R). *J Clin Densitom* 2011; 14:240–262.
14. Chen Y, Jia X, Chen J, Wang J, Hu M. The Pharmacokinetics of Raloxifene and its Interaction with Apigenin in Rat. *Molecules*, 2010; 15:8478-8487.
15. Choi J, Park K-H, Kim SZ, Shin JH, Jang S-I. The ameliorative effects of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Molecules* 2013; 18(3):3467-3478.

16. Cholbi M, Paya M, Alcaraz M. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl₄-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia* 1991; 47:195-9.
17. Cook NS, Ubben D. Fibrinogen as a major risk factor in cardiovascular disease. *Trends in pharmacological sciences* 1990; 11(11):444-451.
18. Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int.* 1992; 2(6):285-9.
19. Cooper J, Douglas AS. Fibrinogen level as a predictor of mortality in survivors of myocardial infarction. *Fibrinolysis* 1991; 5(2):105-108.
20. Corsini A, Bortolini M. Drug - Induced Liver Injury: The Role of Drug Metabolism and Transport. *J. Clin. Pharmacol.* 2013; 53:463-74.
21. Cosman F, Baz-Hecht M, Cushman M, Vardy MD, Cruz JD, Nieves JW, Zion M, Lindsay R. Short-term effects of estrogen, tamoxifen and raloxifene on hemostasis: a randomized-controlled study and review of the literature. *Thrombosis research.* 2005 Dec 31; 116(1):1-3.
22. Czock D, Keller F, Heringa M, Rasche FM. Raloxifene pharmacokinetics in males with normal and impaired renal function. *British journal of clinical pharmacology.* 2005; 59(4):479-82.
23. Dalvie D, Kangm P, Zientek M, Xiangm C, Zhou S, Obach R.S. Effect of intestinal glucuronidation in limiting hepatic exposure and bioactivation of raloxifene in humans and rats, *Chem. Res. Toxicol.* 2008; 21:2260-2271.
24. Dean RL. Kinetic studies with alkaline phosphatase in the presence and absence of inhibitors and divalent cations. *Biochemistry and Molecular Biology Education.* 2002 Nov 1; 30(6):401-7.

25. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, Draper M, Christiansen C. Effect of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations and uterine endometrium in postmenopausal women. *New Engl. J. Med.* 1997; 337:1641-1647.
26. Dempfle CE. Validation, calibration, and specificity of quantitative D-dimer assays. *Semin Vasc Med.* 2005; 5(4):315-20.
27. Dodge JA, Lugar CW, Cho S, Short LL, Sato M, Yang NN, Spangle LA, Martin MJ, Phillips DL, Glasebrook AL. Evaluation of the major metabolites of raloxifene as modulators of tissue selectivity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1997; 61:97-106.
28. Eikelboom JW, Hirsh J. Monitoring unfractionated heparin with the aPTT: time for a fresh look. *Thromb Haemost.* 2006 Nov; 96(5):547-52.
29. Eilertsen AL, Qvigstad E, Andersen TO, Sandvik L, Sandset PM. Conventional-dose hormone therapy (HT) and tibolone, but not low-dose HT and raloxifene, increase markers of activated coagulation. *Maturitas.* 2006 Oct 20; 55(3):278-87.
30. El Dib RA, Gaara AH, El-Shenawy SM, Micky JA, Mohammed AA, Marzouk MS. Leaf extract of *Markhamia platycalyx*: polyphenolic profile, acute toxicity, anti-inflammatory, hepatoprotective and in vitro antioxidant activities. *Drug Res (Stuttg).* 2014; 64(12):680-9.
31. El Swefy S, Hasan RA, Ibrahim A, Mahmoud MF. Curcumin and hemopressin treatment attenuates cholestasis-induced liver fibrosis in rats: role of CB1 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2016; 389(1):103-116.
32. Eli Lilly and Company. Raloxifene. Package insert. Indianapolis 1997.
33. Enhsen A, Kramer W, Wess G. Bile acids in drug discovery. *Drug Discovery Today.* 1998 Sep 1; 3(9):409-18.

34. Esterbauer H, Schaur RJr, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 1990; 11:81-128.
35. European Medicines Agency (EMA). European public assessment report (EPAR) Evista. 2009.
36. Fitzpatrick RW. Praktična farmakokinetika. In: Walker R, Edwards C, editors. *Klinička farmacija i terapija*. Zagreb: Školska knjiga; 2004. pp. 6-7.
37. Forouzandeha H, Ebrahim Azemib M, Rashidic I, Goudarzia M, Kalantarid H. Study of the protective effect of *Teucrium polium* L. extract on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.* 2013; 12(1):123-129.
38. Gavrilović D. Role and importance of MDCT in diagnostic protocol in patients with suspected acute pulmonary embolism. *PONS-medicinski časopis.* 2012; 9(1):8-12.
39. Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia.* 1974 Jun 15; 30(6):665-7.
40. Golocorbin-Kon S, Mikov M, Arafat M, Lepojevic Z, Mikov I, Sahman-Zaimovic M, Tomic Z. Cefotaxime pharmacokinetics after oral application in the form of 3 α , 7 α -dihydroxy-12-keto-5 β -cholanate microvesicles in rat. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2009; 34(1):31-36.
41. Gu X, Manautou JE. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert Rev. Mol. Med.* 2012; 14:e4.
42. Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W, Uchida K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free radical research.* 2010 Oct 1; 44(10):1098-124.

43. Halliwell B, Gutteridge J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984; 219:1.
44. Heringa M. Review on raloxifene: profile of a selective estrogen receptor modulator. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2003 Aug; 41(8):331-45.
45. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. *Archives of osteoporosis* 2013; 8(1-2), 1-115.
46. Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med.* 1995; 155:381–386. [PubMed: 7848021]
47. Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest.* 2004 Sep; 126(3 Suppl):188S-203S.
48. Hochner-Celnikier D. Pharmacokinetics of raloxifene and its clinical application. *Eur. J. Obst. Gyn. Rep. Bio.* 1999; 85:23-29.
49. Hofmann AF. The enterohepatic circulation of bile acids in man. *Adv Intern Med* 1976; 21:501–34.
50. Ingawale DK, Mandlik SK, Naik SR. Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): a critical discussion. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014 Jan; 37(1):118-33.

51. Ishani A, Blackwell T, Jamal SA, Cummings SR, Ensrud KE, more investigators. The effect of raloxifene treatment in postmenopausal women with CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008 Jul 1; 19(7):1430-8.
52. Jakovljević V. Eksperimentalna farmakologija u naučno-istraživačkom radu. Alfa graf, Novi Sad, 2006; str.6.
53. Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, Harryvan JL, Hovenier R, Hollman PC, Katan MB. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr*. 1998; 67:255–262. [PubMed: 9459373]
54. Jelikić Stankov M, Đurđević P, Stankov D. Determination of uric acid in human serum by an enzymatic method using N-methyl-N-(4-aminophenyl)-3- methoxyaniline reagent. *J Serb Chem Soc* 2003; 68:691–698.
55. Jeong EJ, Lin H, Hu M. Disposition mechanisms of raloxifene in the human intestinal Caco-2 model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004, 310, 376-385.
56. Jeong EJ, Liu Y, Lin HM, Hu M. Species and disposition model-dependent metabolism of raloxifene in gut and liver: Role of UGT1A10, *Drug Metab.Dispos.* 2005; 33, 785-794.
57. Juliano RL. Factors affecting the clearance kinetics and tissue distribution of liposomes, microspheres and emulsions. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1988 Oct 31; 2(1):31-54.
58. Kahan BD. Cyclosporine. *New England Journal of Medicine*. 1989 Dec 21; 321(25):1725-38.
59. Kamal AH, Tefferi A, Pruthi RK. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. *Mayo Clin Proc*. 2007 Jul; 82(7):864-73.

60. Kanis JA, Johnell O, De Laet C, Johansson H, Oden A, Delmas PD, Eisman JA, Fujiwara S, Garnero P, Kroger H, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. A meta-analysis of previous fracture and subsequent fracture risk. *Bone* 2004; 35(2):375-82.
61. Kemp DC, Fan PW, Stevens JC. Characterization of raloxifene glucuronidation in vitro: contribution of intestinal metabolism to presystemic clearance, *Drug Metab Dispos.* 2002 Jun; 30(6):694-700.
62. Khalil AF, Elkatry HO, El Mehairy HF. Protective effect of peppermint and parsley leaves oils against hepatotoxicity on experimental rats. *Annals of Agricultural Sciences.* 2015 Dec 31; 60(2):353-9.
63. Kobayashi A, Kondo K, Sugai S. Investigation of Predisposition Biomarkers to Identify Risk Factors for Drug-induced Liver Injury in Humans: Analyses of Endogenous Metabolites in an Animal Model Mimicking Human Responders to APAP-induced Hepatotoxicity. *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 2014) 135(5): 655-662.
64. Kohen R, Nyska A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology* 2002; 30(6):620–650.
65. Kooti W, Mansouri E, Ghasemiboroon M, Harizi M, Ashtary-Larky D, Afrisham R. The Effects of Hydroalcoholic Extract of *Apium graveolens* Leaf on the Number of Sexual Cells and Testicular Structure in Rat. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.* 2014 Oct 11; 9(4):e17532. eCollection 2014.

66. Kopp JB, Klotman PE. Cellular and molecular mechanisms of cyclosporin nephrotoxicity. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1990 Aug 1; 1(2):162-79.
67. Kosaka K, Sakai N, Endo Y, Fukuhara Y, Tsuda-Tsukimoto M, Ohtsuka T, Kino I, Tanimoto T, Takeba N, Takahashi M, Kume T. Impact of intestinal glucuronidation on the pharmacokinetics of raloxifene, *Drug Metab Dispos*. 2011 Sep; 39(9):1495-502.
68. Krishna RD, Tushar NM. LC-MS/MS Method for the Determination of Raloxifene and its Glucuronide Metabolites from Human Plasma Using SPE Micro Elution. Thermo Fischer Scientific 2014.
69. Kumar AU, Basavaiah K, Tharpa K, Vinay KB. Determination of raloxifene hydrochloride in human urine by LC-MS-MS. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly/CICEQ* 2009; 15(3):119-23.
70. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World J*. 2013; 2013:162750.
71. Lalić-Popović M, Vasović V, Milijašević B, Goločorbin-Kon S, Al-Salami H, Mikov M. Deoxycholic Acid as a Modifier of the Permeation of Gliclazide through the Blood Brain Barrier of a Rat. *J Diabetes Res* 2013;2013:598603. doi: 10.1155/2013/598603. Epub 2013 Mar 13.
72. Lalošević D, Somer Lj, Đolai M, Lalošević V, Mažibrada J, Krnolejac D. Mikroskopska laboratorijska tehnika u medicini. *Medicinski fakultet Novi Sad* 2005; 49-50.
73. Landis JB, Pardue HL. Kinetics of the reactions of unconjugated and conjugated bilirubins with p-diazobenzenesulfonic acid. *Clinical chemistry*. 1978 Oct 1; 24(10):1690-9.
74. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiol Rev* 2009; 89 (1): 147-191.

75. Lefort EC, Blay J. Apigenin and its impact on gastrointestinal cancers. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013; 57:126-44.
76. Leszek O, Joanna F, Waldemar J, Grzegorz G, Katarzyna K. Differential effects of genistein, estradiol and raloxifene on rat osteoclasts in vitro. *Pharmacol. Rep.* 2005; 57:352-359.
77. Leung LLK. Perioperative evaluation of bleeding diathesis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 457-61.
78. Lindstrom TD, Whitaker NG, Whitaker GW. Disposition and metabolism of a new benzothiophene antiestrogen in rats, dogs and monkeys, *Xenobiotica*, 1984; 14, 841-847.
79. Liu Y, Hu M. Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perfused rat intestinal model, *Drug Metab. Dispos.* 2002; 31:370-377.
80. Madrigal-Santillán E, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, Sumaya-Martínez MT, Gutiérrez-Salinas J, Bautista M, Morales-González Á, García-Luna Y, González-Rubio M, Aguilar-Faisal JL, Morales-González JA. Review of natural products with hepatoprotective effects. *World J Gastroenterol.* 2014 Oct 28; 20(40):14787-804.
81. Majkić-Singh N, Spasić S, Stojanov M, Jelić-Ivanović Z, Kalimanovska-Spasojević V. *Medicinska biohemija: principi i metodi. Praktikum.* Beograd, Srbija, 1995.
82. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21:361–70.
83. McGill MR, Williams CD, Xie Y, Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicology and applied pharmacology* 2012; 264(3):387-394.

84. Medić-Stojanoska M, Mitić G, Mitić I, Spasić DT, Ćurić N, Pekić S, Kovačev-Zavišić B, Popović V. The influence of hyperprolactinemia on coagulation parameters in females with prolactinomas. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo* 2014; 142(5-6):314-9.
85. Melton III LJ, Atkinson EJ, Cooper C, O'Fallon WM, Riggs BL. Vertebral fractures predict subsequent fractures. *Osteoporosis Int* 1999; 10:214-21.
86. Melton III LJ, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL: Perspective: How many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res* 1992;7:1005-10.
87. Mikov M, Kuhajda K, Kandrač J. Current aspects in pharmacologic use of bile acids. *Med Pregl* 2003; 56(5-6):237-42. Serbian.
88. Mikov M, Kevrešan S, Kuhajda K, Jakovljević V, Vasović V. $3\alpha, 7\alpha$ -dihydroxy-12-oxo- 5β -cholanate as blood-brain barrier permeator. *Pol J Pharmacol* 2004; 56 (3):367-371.
89. Mizuma T. Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: a study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9, and 1A10, *Int J Pharm.* 2009 Aug 13; 378(1-2):140-1.
90. Mora A, Paya M, Rios J, Alcaraz M. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 1990; 40:793-7.
91. Morello KC, Wurz GT, DeGregorio MW. Pharmacokinetics of selective estrogen receptor modulators. *Clinical pharmacokinetics.* 2003; 42(4):361-72.
92. Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clinical Chemistry.* 1982 Oct 1; 28(10):2007-16.

93. Mrestani Y, Bretschneider B, Härtl A, Neubert RH. In vitro and in vivo studies of cefpirom using bile salts as absorption enhancers. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55(12):1601-1606.
94. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology & Medicine* 2007; 43:477–503.
95. Nabavi SM, Seyed, Habtemariam S, Daglia M, Nabavi SF. Apigenin and breast cancers: from chemistry to medicine. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)* 2015; 15(6):728-35.
96. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2009 Feb 1; 4(2):481-508.
97. Niketić V. Uputstva za vežbe iz biohemije za studente hemije smera istraživanje i razvoj. Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet. Beograd 2007; p.51.
98. Olson JD, Arkin CF, Brandt JT, Cunningham MT, Giles A, Koepke JA, Witte DL. College of American Pathologists Conference XXXI on laboratory monitoring of anticoagulant therapy: laboratory monitoring of unfractionated heparin therapy. *Arch Pathol Lab Med*. 1998 Sep; 122(9):782-98.
99. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH, et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med*. 2002; 137(12):947-54.
100. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1967 Jul 1; 70(1):158-69.
101. Palareti G, Maccaferri M. Specific assays of hemostasis proteins: fibrinogen. *Research in Clinic and Laboratory*. 1990 Apr 1; 20(2):167-76.

- 102.Pandit A, Sachdeva T, Bafna P. Drug-induced hepatotoxicity: a review. *J. Appl. Pharm. Sci.*02(05) 2012; 233–243.
- 103.Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol.* 2007; 30:233–245. [PubMed: 17143534]
- 104.Patel JMA. Review of potential health benefits of flavonoids. *Lethbridge Undergraduate Research Journal.* 2008; 3(2).
- 105.Persijn JP, Van der Slik W. A new method for the determination of γ -glutamyltransferase in serum. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 1976; 14(1-12):421-8.
- 106.Petrović M, Dopsaj V, Rajić M, Milojević Z. *Laboratorijska hematologija.* Beograd: Farmaceutski fakultet. 2002; 8:201-207.
- 107.Poller L. The prothrombin time. WHO/LAB/98.3. 1998.
- 108.Quick AJ, Stanley-Brown M, Bancroft FW. A study of the coagulation defect in haemophilia and in jaundice. *Am J Med Sci.* 1935; 190:501-11.
- 109.Ram K. Jha, Sanjay Tiwari, Brahmeshwar Mishra. Bioadhesive microspheres for bioavailability enhancement of raloxifene hydrochloride: Formulation and pharmacokinetic evaluation, *AAPS PharmSciTech.* June 2011; Vol. 12, No.2.
- 110.Randell A, Sambrook PN, Nguyen TV, Lapsey H, Jones G, Kelly PJ, Eisman JA. Direct clinical and welfare costs of osteoporotic fractures in elderly men and women. *Osteoporosis Int* 1995; 5:427-32.
- 111.Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Farmakologija.* Urednik srpskog izdanja Todorović Z, Beograd, Data Status, 2005.

112. Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Čebović T, Vukmirović S, Mikov M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement Altern Med* 2014; 14:225.
113. Rašković A, Pavlović N, Kvirgić M, et al. Effects of pharmaceutical formulations containing thyme on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *BMC Complement. Altern. Med.* 2015; 15:1.
114. Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: A still increasing prevalence. *Bone* 2006; 38:S4-S9.
115. Righini M, Perrier A, De Moerloose P, Bounameaux H. D-dimer for venous thromboembolism diagnosis: 20 years later. *J Thromb Haemost* 2008; 6:1059–1071.
116. Robinson HW, Hogden CG. The biuret reaction in the determination of serum proteins: A study of the conditions necessary for the production of a stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration. *J. Biol. Chem.* 1940; 135:707.
117. Roqué M, Sitges M, Sala J, Delgado V, Morales M, Marrugat J, Vila J, Subirana I, Tàssies D, Reverter JC, Castro M. Effects of raloxifene on endothelial function and hemostasis in women with ischemic heart disease. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*. 2011 Jul 31; 64(7):572-8.
118. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22:19–34. [PubMed: 12055336]
119. Samstein R, Perica K, Balderrama F, Look M, Fahmy T. The use of deoxycholic acid to enhance the oral bioavailability of biodegradable nanoparticles, *Biomaterials*, 2008 Feb; 29(6):703-708.
120. Sayani A.P, Chien Y.W. Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1996; 13 (1-2):85-184.

- 121.Scott JA, Da Camarat CC, Early JE. Raloxifene: A selective estrogen receptor modulator. *Am. Fam. Physician* 1999; 60:1131-1138.
- 122.Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J. Nutr. Biochem.* 2007; 18:567-79.
- 123.Setchell K.D, Brown N.M, Desai P.B, Zimmer-Nechimias L, Wolfe B, Jakate A.S, Creutzinger V, Heubi J.E. Bioavailability, disposition and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes, *J. Nutr.* 2003; 133:1027-1035.
- 124.Sheu A, Diamond T. Bone mineral density: testing for osteoporosis. *Aust Prescr.* 2016 Apr; 39(2):35-9.
- 125.Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm.Res.* 2010; 27:962.
- 126.Singh D, Cho WC, Upadhyay G. Drug-Induced Liver Toxicity and Prevention by Herbal Antioxidants: An Overview. *Frontiers in Physiology.* 2015; 6:363.
- 127.Singh JPV, Selvendiran K, Banu SM, Padmavathi R, Sakthisekaran D. Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. *Phytomedicine* 2004; 11:309-14.
- 128.Snyder KR, Sparano N, Malinowski JM. Raloxifene hydrochloride. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 2000; 57, 1669-1678.
- 129.Spasić S, Jelić-Ivanović Z, Kalimanovska-Spasojević V. *Medicinska biohemija.* Beograd, Srbija, 2003.

130. Stiehl A, Walker S, Stiehl L, Rudolph G, Hofmann WJ, Theilmann L. Effect of ursodeoxycholic acid on liver and bile duct disease in primary sclerosing cholangitis. A 3-year pilot study with a placebo-controlled study period. *J Hepatol* 1994; 20(1):57-64.
131. Stojančević M, Pavlović N, Goločorbin-Kon S, Mikov M. Application of bile acids in drug formulation and delivery. *Frontiers in Life Science* 2013; 7(3-4): 112-122.
132. Suvajdzic L, Stojakovic N, Mikov M, Satara SS, Skrbic R, Vidic B, Dankuc D, Suvajdzic Z. Influence of bile acids on rat gut microflora deterioration induced by oral ampicillin treatment. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2015 Jun 17; 43(1):1-5.
133. Takamura T, Shimizu A, Komura T, Ando H, Zen Y, Minato H, Matsushita E, Kaneko S. Selective estrogen receptor modulator raloxifene-associated aggravation of nonalcoholic steatohepatitis. *Internal Medicine*. 2007; 46(9):579-81.
134. Trdan Lušin T, Trontelj J, Mrhar A. Raloxifene glucuronidation in human intestine, kidney, and liver microsomes and in human liver microsomes genotyped for the UGT1A1*28 polymorphism, *Drug Metab Dispos*. 2011 Dec; 39(12):2347-54.
135. Trdan Lušin T, Mrhar A, Stieger B, Kullak-Ublick GA, Marc J, Ostanek B, Zavratnik A, Kristl A, Berginc K, Delić K, Trontelj J. Influence of hepatic and intestinal efflux transporters and their genetic variants on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of raloxifene in osteoporosis treatment, *Transl Res*. 2012 Oct; 160(4):298-308.
136. Tsuji A, Tamai I. Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharmaceutical research*. 1996 Jul 1; 13(7):963-77.
137. Ugrešić N, Stepanović-Petrović R, Savić M. *Farmakoterapija za farmaceute*. Beograd: Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, 2011.

138. Vasović V, Vukmirović S, Mikov M, Mikov I, Budakov Z, Stilinović N, Milijašević B. Influence of bile acid derivates on morphine analgesic effect in mice. *Vojnosanit Pregl* 2014; 71(8):767-771.
139. Veng-Pedersen P. Mean time parameters in pharmacokinetics. *Clinical pharmacokinetics*. 1989 Nov 1; 17(5):345-66.
140. Vilches AR, Pérez V, Suchecki DE. Raloxifene-associated hepatitis. *The Lancet*. 1998 Nov 7; 352(9139):1524-5.
141. Wang H, Yang L, Zu Y, Zhao X. Microwave-Assisted Simultaneous Extraction of Luteolin and Apigenin from Tree Peony Pod and Evaluation of Its Antioxidant Activity. *ScientificWorldJournal*. 2014; 2014:506971.
142. WinNonlin program (version 5.0.1.). Pharsight Corporation Inc. Mountain View, CA, USA, 2005.
143. Xiao Z, Li CW, Shan J, Luo L, Feng L, Lu J, Li SF, Long D, Li YP. Interventions to improve chronic cyclosporine A nephrotoxicity through inhibiting renal cell apoptosis: a systematic review. *Chin Med J (Engl)* 2013; 126(19):3767-74.
144. Yang ZY, Zhang ZF, He XB, Zhao GY, Zhang YQ. Validation of a novel HPLC method for the determination of raloxifene and its pharmacokinetics in rat plasma. *Chromatografia* 2007; 65:197-201.
145. Yang L, Zhang H, Mikov M, Tucker IG. Physicochemical and biological characterization of monoketoholic acid, a novel permeability enhancer. *Mol Pharm* 2009; 6(2):448-456.
146. Yao LH, Jiang YM, Shi J, Tomás-Barberán FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum Nutr*. 2004; 59(3):113-22.

- 147.Zhang A, Sun H, Wang X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *Eur. J. Med. Chem.* 2013; 63:570-7.
- 148.Zhao L, Ding J, He P, Xiao C, Tang Z, Zhuang X, Chen X. An efficient pH sensitive oral insulin delivery system enhanced by deoxycholic acid. *Journal of Controlled Release.* 2011 Nov 30; 152:184-6.
- 149.Zheng QS, Sun XL, Xu B, Li G, Song M. Mechanisms of apigenin-7-glucoside as a hepatoprotective agent. *Biomed Environ Sci.* 2005; 18(1):65-70.
- 150.Zhong Z, Connor HD, Li X, Mason RP, Forman DT, Lemasters JJ, Thurman RG. Reduction of ciclosporin and tacrolimus nephrotoxicity by plant polyphenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2006; 58:1533–1543.
- 151.Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepatol. Res.* 2012; 42:741-9.