

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Plzni
Ústav farmakologie a toxikologie**

MUDr. Metoděj Kolek

**OXIDAČNÍ STRES NAVOZENÝ ŽELEZEM A JEHO
OVLIVNĚNÍ FLAVONOIDY A BISFOSFONÁTY**

Autoreferát dizertační práce k získání
akademického titulu PhD.

Vědní obor: farmakologie

Plzeň 2005

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného doktorského studia
na Ústavu farmakologie a toxikologie Lékařské fakulty UK v Plzni.

Uchazeč: MUDr. Metoděj Kolek
Ústav farmakologie a toxikologie
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Školitel: Prof. MUDr. Vladislav Eybl, DrSc.
Ústav farmakologie a toxikologie
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Oponenti: Doc. MUDr. Radomír Hrdina, CSc.
Katedra farmakologie a toxikologie
Univerzita Karlova v Praze,
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Doc. MUDr. Vlastimil Habermann, CSc.
Ústav lékařské chemie a biochemie
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Stanovisko k dizertaci vypracoval: Ústav farmakologie a toxikologie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze.

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne v hodin před komisí pro obhajoby dizertačních prací v oboru farmakologie na Ústavu farmakologie a toxikologie Lékařské fakulty UK v Plzni.

S dizertační prací je možné se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty UK v Plzni.

Předseda komise pro obhajoby dizertačních prací ve vědním oboru farmakologie:
Doc. MUDr. Jaroslav Koutenský, CSc.
Ústav farmakologie a toxikologie
Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Prof. MUDr. Vladislavu Eyblovi, DrSc. za vydatnou oporu nejen z odborného hlediska během celého postgraduálního studia. Bez jeho všestranného přispění by tato práce těžko vznikla.

Poděkování patří také Ing. Daně Kotyzové za rady a pomoc v experimentálních a analytických otázkách, a při přípravě publikací.

Dále děkuji vedoucímu Ústavu farmakologie a toxikologie LF UK v Plzni Doc. MUDr. Jaroslavu Koutenskému, CSc. za vstřícnost a podporu v postgraduálním studiu na pracovišti.

Stejně tak patří poděkování ostatním spolupracovníkům za vynikající pracovní prostředí a všem mým blízkým za podporu a vytrvalost.

OBSAH:

1 ÚVOD.....	5
2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY.....	5
3 CÍL PRÁCE.....	14
4 MATERIÁL A POUŽITÉ METODY.....	14
5 VÝSLEDKY.....	16
5.1 Vliv různého množství železa v dietě na toxicitu kadmia.....	16
5.2 Vliv quercetinu na oxidační stres.....	20
5.3 Vliv silibininu na oxidační stres.....	26
5.4 Vliv bisfosfonátů na oxidační stres.....	30
6 DISKUSE.....	37
7 SHRNUÍ.....	40
PŘEHLED PUBLIKACÍ.....	42
LITERATURA.....	43
SUMMARY.....	49

1 ÚVOD

V posledních třech desetiletích jsou volné kyslíkové radikály intenzivně studovány ve vztahu k řadě onemocnění. Jsou popsána onemocnění ze všech lékařských oborů, v jejichž patogenezi a progresi se předpokládá významná účast volných radikálů. První studie vkládaly do radikálových reakcí naději, že se jedná o specifický patogenetický děj, ale v tomto ohledu je spíš na místě skepse, protože působení volných radikálů v lidském těle je obecný mechanismus.

Radikály provázejí lidské tělo od jeho narození po smrt. Jejich patogenetický účinek - oxidační stres buněk a tkání - nastává ve dvou situacích:

1. při jejich zvýšené tvorbě
2. při nedostatečné antioxidační ochraně organismu

Významná účast oxidačního stresu se předpokládá například u diabetu, aterosklerózy nebo při ischemicko-reperfučním poškození. Také mechanismus poškození při otravách těžkými kovy se vysvětluje oxidačním stresem (Zima et al, 1996; Hirayama a Yasutake, 1998).

Lidský organismus je k inaktivaci volných radikálů a reparaci vzniklého poškození vybaven antioxidačními systémy. Tyto systémy se rozdělují na antioxidační enzymy jako jsou superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza a kataláza, a antioxidační substráty jako například tokoferoly, karotenoidy, kyselina askorbová, glutathion, tioly a transferin.

2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

2.1 ŽELEZO A OXIDAČNÍ STRES

2.1.1 Úvod

Železo je pro živé organismy nezbytný prvek a jako součást enzymů a jiných buněčných komponent se účastní významných fyziologických dějů. Je důležité pro vazbu kyslíku jak v červených krvinkách, tak v myoglobinu, nebo pro funkci enzymů jako jsou například cytochrom P450, peroxidáza, kataláza, cyklooxygenáza a ribonukleotid reduktáza (Galey, 1997). Pro organismus je ovšem důležitá kontrola celkového množství železa v těle, protože železo patří mezi přechodné kovy a může tak vstupovat do Fentonovy reakce, jejímž výsledkem je vznik vysoce toxických volných radikálů. Zvládnutí stavů spojených s hromaděním železa v organismu se tedy částečně zaměřuje na snížení tvorby volných radikálů a tím na omezení oxidačního stresu.

2.1.2 Metabolismus a toxicita železa

V těle průměrného muže je obsaženo 4.5 g železa. Asi 65% železa je vázáno na hemoglobin, 10% je součástí myoglobinu, cytochromů a enzymů obsahujících železo a 20 až 30% je vázáno na zásobní proteiny feritin a hemosiderin. Dalším proteinem zapojeným do homeostázy železa je transferin, jenž přenáší železo v krevní plazmě. Předpokládá se, že jenom stopové množství tohoto kovu zůstává volně jako nevázané, nebo volně vázané železo. (Fraga a Oteiza, 2002). Průměrný denní příjem železa u člověka je 1 až 3 mg. Přibližně stejné množství se z těla ztrácí deskvamací buněk převážně z gastrointestinálního traktu, ale i z kůže, dále močí a žlučí, a u žen i menstruační krví. Železo se vstřebává ve střevu a je transportováno na transferin. Buňky, které potřebují železo, nesou na svém povrchu transferinový receptor. Po vstupu do buňky se železo redukuje a jako železnatý ion je vázán feritinem a zpětně oxidován (Galey, 1997).

U savců se vyvinuly četne navzájem propojené mechanismy regulace metabolismu železa, které předcházejí možným poruchám zdraví na základě jak nedostatku, tak hromadění železa v organismu.

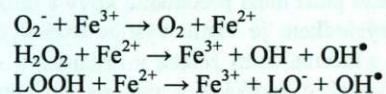
K chronické kumulaci železa může docházet při:

1. primární hemochromatóze
2. zvýšeném příjmu železa v jídle
3. častých krevních transfúzích (často nutné v léčbě určitých rezistentních anémií jako je thalasemia major)

Případy akutní otravy jsou vzácné a projevují se především postižením jater (Fraga a Oteiza, 2002).

2.1.3 Železo a volné radikály

Změny buněčných struktur a funkcí způsobené nahromaděným železem zřejmě podstatně souvisí s poškozením buněčných částí volnými radikály. Jelikož železo je přechodný kov, může vstupovat do Fentonovy reakce. Železnatý ion může katalyzovat rozklad peroxidů za vzniku hydroxylového radikálu z peroxidu vodíku, nebo alkoxylového radikálu, pokud je substrátem reakce organický peroxid (LOOH):



Účast železa je tedy zásadní pro:

1. vznik hydroxylového radikálu, který může následovně iniciovat oxidaci lipidů nebo oxidovat téměř každou molekulu v biologických systémech
2. rozvoj reakce volných radikálů rozkladem peroxidů

Železem katalyzované reakce *in vivo* jsou díky zanedbatelné dostupnosti „volného“ katalytického železa omezené. Zvýšená produkce superoxidového aniontu může nicméně usnadňovat uvolňování železa z feritinu a proteinů, a peroxid vodíku může degradovat hem z proteinů, kterých je součástí, a také uvolňovat železo (Halliwell a Gutteridge, 1999).

2.1.4 Antioxidancia a toxicita železa

Antioxidans je jakákoliv látka schopná zabránit oxidaci. Protože železo je schopné spustit oxidaci jednak redukcí a jednak rozkladem vzniklých peroxidů, antioxidant, které zabraňuje toxickým účinkům železa, je látka, která je schopna:

1. tvořit se železem cheláty a bránit reakci s kyslíkem a peroxidem
2. vázat železo a udržovat je v takovém redoxním stavu, v kterém není schopno redukovat molekulární kyslík
3. vychytávat již vzniklé radikály

Proteiny, které se účastní metabolismu železa, mohou izolovat železo a tím zabránit reakcím, jejichž výsledkem je vznik volných radikálů. Několik dalších látek, jak přírodních, tak syntetických, je schopno vázat železo *in vivo* a omezovat jeho účast v reakcích s volnými radikály (Fraga a Oteiza, 2002).

2.1.5 Thalasemia major a látky vázající železo v klinické praxi

Jednou z příčin zvýšeného množství železa v organismu jsou časté krevní transfúze u některých typů anémií. Příkladem takové anémie je thalasemia major. Léčba této nemoci je komplexní a spočívá v pravidelných transfúzích vedoucích k akumulaci železa v organismu, vyžadující podávání chelátoru železa. Přestože transfúze a chelatační terapie významně prodlužuje život pacientů s thalasemia major, kardiomyopatie způsobená nahromaděním železa v srdci zůstává stále nejčastější příčinou smrti u těchto pacientů (Cohen et al, 2004). Mezi další sekundární patofyziologické stavy provázející toto onemocnění patří virová hepatitida C, zvýšené riziko trombózy, endokrinopatie a osteoporóza (Cohen et al, 2004; Voskaridou a Terpos, 2004).

V současnosti je jediným chelátorem železa rozšířeným v klinické praxi deferoxamin. Tento lék má ovšem mnoho nevýhod, např. vysoká cena, nutnost podávat ho v dlouho trvajících podkožních infuzích a nízká vstřebatelnost ze střeva (Richardson a Ponka, 1998). Slibným perorálně aktivním chelátorem železa je deferipron (L1), který vykazuje vysokou afinitu k železu (Diav-Citrin

a Koren, 1997). Některé výsledky bohužel ukázaly, že léčba s L1 má určitá omezení, a jeho účinnost ve snižování jaterního železa je sporná (Olivieri a Brittenham, 1997). Řada dalších chelátorů železa je v různých stádiích klinického a preklinického zkoušení.

2.2 FLAVONOIDY

2.2.1 Úvod

Flavonoidy představují širokou skupinu nízkomolekulárních biologicky aktivních látek charakterizovaných flavanovým jádrem, které mohou mít mnohonásobné prospěšné účinky na některá chronická onemocnění (Hollman, 2001; Kris-Etherton et al, 2002). Flavonoidy jsou polyfenolové sloučeniny, které jsou syntetizované v rostlinách. Pro člověka je zdrojem flavonoidů čaj, červené víno, šťáva z červených hroznů, kakaové výrobky, jablka, cibule a některé ořechy. Tyto látky hrají dvojí roli ve snižování oxidačních pochodů, protože mohou jednat vázat železo, a jednat vychytávat volné radikály (Heim et al, 2002).

Antioxidační aktivita flavonoidů a jejich metabolitů závisí na uspořádání funkčních skupin na flavanovém jádře. Z výzkumu vztahu mezi strukturou a aktivitou vyšlo několik ucelených teorií, které podporují úlohu specifických strukturních složek jako nástroje vychytávání volných radikálů, chelatace a oxidační aktivity.

2.2.2 Hydroxylové skupiny

Některé mechanismy antioxidační aktivity výrazně ovlivňuje jak konfigurace, tak celkový počet hydroxylových skupin (Cao et al, 1997; Sekher Pannala et al, 2001; Haenen et al, 1997; Burda a Oleszek, 2001). 3',4'-katecholová skupina na kruhu B výrazně posiluje inhibici lipoperoxidace (Mora et al, 1990; Ratty a Das, 1988; Dugas et al, 2000). Schopnost flavonoidů vychytávat volné radikály je vysoce závislá na volné hydroxylové skupině na uhlíku 3 (Burda a Oleszek, 2001).

1. vychytávání hydroxylových, peroxylových a syntetických radikálů
2. ukončení řetězové reakce v lipidové fázi, zahrnující peroxylové radikály a hydroperoxydy
3. chelataci dvoumocných kationtů sloužících k zahájení oxidačních pochodů *in vitro*
4. interakci s dalšími iniciátory, jako je kyselina askorbová, které mohou redukovat a recyklovat flavonoidové radikály a naopak

2.2.3 O-metylace

Rozdíly jak v hydrofobních vlastnostech tak v plochosti molekuly způsobují různou antioxidační aktivitu polyhydroxylovaných a polymetoxylovaných flavonoidů. Ačkoliv poměr hydroxylových a metoxylových skupin neurčuje nutně schopnost flavonoidů vychytávat volné radikály, kruh B je obzvláště citlivý k umístění metoxylových skupin.

2.2.4 2-3 dvojná vazba a 4-oxo skupina

Flavonoidy s dvojnou vazbou mezi uhlíkem 2 a 3 mají ve spojení s karbonylovou skupinou na uhlíku 4 silnější antioxidační účinek ve srovnání s flavonoidy se saturovanými heterocyklickými jádry (Cholbi et al, 1991). Ačkoliv je nutné brát v úvahu i další strukturní vlastnosti, vychytávání volných radikálů flavonoidy je přítomností obou strukturních prvků variabilně zvýšeno.

2.2.5 Cukerné zbytky

Aglykony mají silnější antioxidační účinek než jejich odpovídající glykosidy (Ratty a Das, 1988; Gao et al, 1999). Kromě prosté přítomnosti a celkového počtu hrají významnou roli také poloha a chemická struktura cukerného zbytku.

2.2.6 Stupeň polymerizace

Zdá se, že vyšší stupeň polymerizace zvyšuje účinnost procyanidinů proti mnoha typům radikálů (Heim et al, 2002).

2.2.7 Chelatační vlastnosti

Chelatační vlastnosti flavonoidů přispívají k jejich antioxidační aktivitě. Vazba s dvoumocnými kationty nemusí vždy znamenat inaktivaci flavonoidů, protože vzniklý komplex si uchovává schopnost vychytávat kyslíkové radikály (Arora et al, 1998; Kostyuk et al, 2001). Tyto komplexy mohou vznikat mezi hydroxylovou skupinou uhlíku 5 a karboxylovou skupinou uhlíku 4, nebo mezi hydroxylovými skupinami uhlíků 3' a 4' (Cheng a Breen, 2000). Díky svým schopnostem vázat kovy a vychytávat radikály jsou polyhydroxylované flavonoidy významné jako inhibitory Fentonovy reakce *in vivo*. Skutečnost, že polyfenoly často inhibují efektivněji oxidaci navozenou kovy, než jinak indukovanou oxidaci, podporuje roli chelatace kovů flavonoidy v inhibici tkáňového poškození volnými radikály, což může mít větší význam, než se dříve myslelo (Arora et al, 1998).

2.2.8 Prooxidační aktivita

Ačkoliv antioxidační vlastnosti flavonoidů podporují jejich pozitivní roli ve výživě lidí a v prevenci onemocnění, některé studie popisují prooxidační aktivitu těchto látek *in vitro*. Zdá se, že některé shodné strukturální vlastnosti, které optimalizují antioxidační schopnost, mohou také vyvolat oxidační stres a poškození funkčních a strukturních molekul buňky. Ačkoliv flavonoidy s několika hydroxylovými skupinami jako je quercetin a podobné polyfenoly zvyšují buněčné poškození způsobené kyslíkovými radikály a jejich užití ve farmakologických dávkách je tak kontraindikováno, změny ve struktuře způsobené metabolismem mohou zmírňovat reaktivitu quercetinu a podobných látek *in vivo*.

2.2.9 Quercetin

Quercetin je flavonol, který patří mezi flavonoidy s nejsilnějšími antioxidačními vlastnostmi. Quercetin je vysoce účinným chelátorem přechodných kovů a je schopen inhibovat železem indukovanou lipoperoxidaci chelatací železa a vznikem komplexů, které nemají schopnost navodit lipoperoxidaci. Tyto komplexy se železem zároveň vychytávají volné radikály. Quercetin tedy inhibuje účinek volných radikálů na třech stupních: vznik superoxidového aniontu, tvorba hydroxylových radikálů ve Fentonově reakci a tvorba lipidoperoxylových radikálů (Afanas'ev et al, 1989). Cytoprotektivní účinek quercetinu testovaný na kulturách hepatocytů by mohl být připsán jeho široce známému účinku proti radikálům, ale také jeho schopností vázat železo (Morel et al, 1993). Quercetin vykazuje interakci s měďnatými a železitými ionty (Kuo et al, 1998). Quercetin rušil železem indukované oxidační poškození buněk Caco-2 v pokusech *in vitro* (Nunez et al, 2001). Bylo ukázáno, že quercetin chelatací kovových iontů a vychytáváním volných radikálů chrání DNA před zlomy způsobené tert-butylhydroperoxidem a menadionem (Aherne a O'Brien, 2000). Bylo prokázáno, že quercetin snižuje v závislosti na dávce lipoperoxidaci navozenou nejen železem, ale i mědí, vanadem a kadmii (Sugihara et al, 1999). Quercetin vstupuje do erytrocytů a brání lipoperoxidaci a hemolýze. Zdá se, že tento efekt je způsoben nitrobuněčnou chelatací železa (Ferrali et al, 1997). Na základě pokusů s tert-butylhydroperoxidem vyplynulo, že hlavní mechanismus aktivity quercetinu spočívá v chelataci železa (Sestili et al, 1998). Na druhé straně bylo ukázáno, že quercetin vykazuje také prooxidační účinky. Fentonovou reakci indukovanou peroxidací ethyl linoleátu (H_2O_2 , Fe^{2+}) byla zastavena nízkými koncentracemi quercetinu, avšak vysoké koncentrace téže látky vedly ke zvýšené peroxidaci pravděpodobně recyklací vázaného inaktivního Fe^{3+} na aktivní Fe^{2+} (Stadler et al, 1995). Quercetin navozoval významnou lipoperoxidaci buněčných jader v závislosti na dávce a současně způsoboval degradaci DNA.

Tyto účinky byly zesíleny železem a mědí. Výsledky tedy naznačují, že kyslíkové radikály formované autooxidací quercetinu, katalyzované železem a mědí, jsou zodpovědné za lipoperoxidaci a poškození DNA buněčných jader hepatocytů potkanů (Sahu a Washington, 1991).

2.2.10 Silibinin

Silibinin (silybin) je složka silymarinu, extraktu z rostliny *Silybum Marianum* (Ostropestřec mariánský). Potenciometrické, elektrochemické a spektroskopické studie komplexů silybinu a Fe^{3+} ukazují, že tato přírodní látka je silný ligand železa (Borsari et al, 2001). Silymarin a silybin, stejně jako quercetin, bránily lipoperoxidaci vyvolanou doxorubicinem a závislou na železe na mikrozomech a mitochondriích potkaního srdce. Silybin na rozdíl od quercetinu nevázal ve vodném roztoku železo. Výsledky naznačují, že silymarin možná zabraňuje doxorubicinem vyvolanému poškození membrán potkaního srdce především vychytáváním volných radikálů (Psotova et al, 2002). Silymarin snižoval lipoperoxidaci jater navozenou předávkováním železem (Bhattacharya et al, 2000). Dihemisukcinát silybinu rychle reagoval s hydroxylovými radikály a také snad vázal Fe^{2+} v roztoku. Dihemisukcinát silybinu a silibin-fosfátidylcholinový komplex známý jako IdB 1016 snižoval lipoperoxidaci jaterních mikrozomů vyvolanou Fe^{2+} . Tyto výsledky podporují antioxidační vlastnosti silybinu a jeho schopnost vychytávat volné radikály (Basaga et al, 1997). Ústní podání silybinu chrání před toxickými účinky železa na játra *in vivo* a zdá se, že tento účinek je způsoben významnou antioxidační aktivitou této látky (Pietrangelo et al, 1995). Ve studii s jaterními mikrozomy potkana bylo ukázáno, že dihemisukcinát silibininu má inhibiční účinek na lipoperoxidaci navozenou Fe^{3+} a kyselinou askorbovou, a že tento účinek je závislý na koncentraci dihemisukcinátu silibininu a velikosti lipoperoxidace (Mira et al, 1994). Podání silybinu zabránilo biochemickému a funkčnímu postižení jater způsobenému předávkováním železem *in vivo* (Pietrangelo et al, 2002).

2.3 BISFOSFONÁTY

2.3.1 Úvod

Bisfosfonáty dnes zaujímají významné postavení v léčbě celé řady metabolických onemocnění skeletu pro svoji účinnost, bezpečnost i farmakoekonomiku léčby. Jsou to syntetické látky strukturně příbuzné pyrofosfátům (Vyskočil a Kutílek, 2004).

2.3.2 Vlastnosti

Společnou vlastností bisfosfonátů je vazba fosfor-uhlík-fosfor, a liší se pouze substituenty na postranních řetězcích, které určují jejich relativní potenci. K fyzikálně-chemickým vlastnostem bisfosfonátů patří odolnost proti enzymatické hydrolyze v gastrointestinálním traktu, afinita ke krystalům hydroxyapatitu, inhibice tvorby, shlukování a rozpouštění krystalů fosforečnanu vápenatého a vytváření rozpustných i nerozpustných komplexů a agregátů s vícemocnými ionty kovů (Vyskočil a Kutílek, 2004).

2.3.3 Farmakologické účinky

Nejdůležitějším účinkem bisfosfonátů je inhibice aktivovaných osteoklastů. Děje se tak útlumem proteosyntézy, poklesem uvolňování lysozomálních enzymů, snížením aktivity endogenní pyrofosfatázy, poklesem tvorby prostaglandinů, poklesem glykolýzy a snížením tvorby kyseliny mléčné, která upravuje pH v mikroprostředí na hodnoty optimální pro resorpci kostí. Zároveň je pozorován i kvantitativní pokles počtu osteoklastů přímým cytotoxickým účinkem na osteoklasty a také inhibicí dozrávání prekurzorů osteoklastů. Bisfosfonáty ve svém důsledku brání odbourávání kostní hmoty. Selektivita bisfosfonátů je důležitá pro afinitu ke kosti, tzn. že působí výhradně v oblasti skeletu, a to především v oblasti zvýšené resorpce (Vyskočil a Kutílek, 2004).

2.3.4 Biodegradace a eliminace

Důležitou charakteristikou bisfosfonátů je jejich nízká biologická dostupnost, která se v naprosté většině případů pohybuje mezi 1 a 3%. Vstřebatelnost bisfosfonátů je výrazně snížena, jestliže jsou podávány s potravou, a to nejvíce s jídly obsahujícími ionty vápníku nebo železa (Vyskočil a Kutílek, 2004; Osterman et al, 1994). Až 60% vstřebených bisfosfonátů je zabudováno do kostní tkáně, zbytek je rychle vyloučen močí. Bisfosfonáty jsou zabudovány v kostní tkáni člověka déle než 10 let. Zásah bisfosfonátů do kostní resorpce a formace je spojen s celkovými změnami metabolismu vápníku. Dochází k mírnému poklesu sérových koncentrací vápníku, stimulaci sekrece parathormonu a ke zvýšení produkce kalcitriolu v ledvinách. Tím pak dochází ke zvýšení tubulární reabsorpce a střevní absorpce vápníku. Tyto adaptační změny zajišťují, že nedochází k rozvoji symptomatické hypokalcémie.

2.3.5 Indikace bisfosfonátů

Bisfosfonáty jsou nejčastěji používány v léčbě postmenopauzální osteoporózy, glukokortikosteroidy vyvolané osteoporózy, senilní osteoporózy, mužské osteoporózy, Pagetovy choroby, nádorem vyvolané hyperkalcémie a osteolytických kostních metastáz.

Dále se zvažuje možnost podávání bisfosfonátů u osteogenesis imperfecta, fibrózní dysplazie, při prevenci uvolňování implantátů v ortopedii a stomatologii, a při prevenci ztráty kosti u chronických onemocnění spojených s imobilitou pacienta. Bisfosfonáty se aplikují parenterálně nebo perorálně jako tablety (Vyskočil a Kutílek, 2004).

2.3.6 Antioxidační vlastnosti

V léčbě osteoporózy u pacientů s thalasemia major se používají bisfosfonáty. Kromě jejich známého účinku na kostní tkáň se uvažuje i o jejich antioxidačním účinku. Tento fakt by mohl být významný ve spojení s hromaděním železa po opakovaných transfúzích v léčbě thalasemia major, kde se železem navozený oxidační stres tkání dá očekávat. (Voskaridou a Terpos, 2004).

Bisfosfonáty inhibovaly v pokusech *in vitro* lipoperoxidaci a snižovaly produkci hydroxylových radikálů Fentonovou reakcí. Protože ve Fentonově reakci hrají důležitou roli ionty železa, je možné, že antioxidační účinek bisfosfonátů je dán schopností chelatace železa (Dombrecht et al, 2003). Interakci mezi bisfosfonáty a ionty kovů podporují i výsledky dalších studií. Současné podání clodronatu a síranu železnatého vedlo k výraznému snížení absorpce clodronatu (Osterman et al, 1994). Clodronat tvoří komplexy se železem hemolyzovaných erytrocytů a akumuluje se posléze v makrofázích sleziny a jater (Monkkonen et al, 1991). Zdá se, že právě vazba clodronatu se železem je důležitým předpokladem pro následnou akumulaci v makrofázích (Monkkonen et al, 1989). Přidání vápníku a železa do plazmy zvyšuje vazbu pamidronatu na plazmatické bílkoviny, zatímco EDTA a deferoxamin tuto vazbu snižují. Elektroforéza plazmatických bílkovin prokázala vazbu pamidronatu na transferin a globulinovou frakci (Daley-Yates et al, 1992). Vazba mezi alendronatem a železitými ionty je dokonce podmínkou k analytickému měření koncentrace alendronatu v tabletách (Kuljanin et al, 2002). Bisfosfonáty inhibují aktivitu metaloproteináz a tato inhibice by mohla být částečně způsobena chelatací zinku, který je součástí těchto enzymů. (Clézardin et al, 2003). Etidronat a deferoxamin snížily postižení erytrocytů volnými radikály po indukci emulzí lipidů (Kljuchnikov et al, 1993). Nově syntetizovaný bisfosfonát TRK-530 inhiboval akumulaci superoxidového aniontu v polymorfonukleárech (Tanahashi et al, 1998).

V této práci byl zkoumán antioxidační účinek tří bisfosfonátů: clodronat, etidronat a risedronat.

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

1. Ověřit oxidační účinky železa a zjistit jeho úlohu v toxicitě jiných kovů (kadmia).
2. Posoudit antioxidační vlastnosti dvou flavonoidů (quercetinu a silibininu) a tří bisfosfonátů (clodronatu, etidronatu a risedronatu) *in vivo* v pokusech na myších.
3. Posoudit účinek výše uvedených látek na oxidační stres navozený podáním železa a zjistit, zda se na mechanismu účinku těchto látek podílí chelatační vlastnosti.

Dílčí cíle jednotlivých pokusů:

- I. Posoudit vliv obsahu železa v dietě na oxidační stres, hladinu stopových prvků a toxicitu kadmia
- II. Posoudit vliv dávky a délky podávání quercetinu a silibininu na jejich anti- nebo prooxidační vlastnosti.
- III. Posoudit účinek quercetinu a silibininu na oxidační stres vyvolaný železem a zjistit vliv na distribuci železa v organismu.
- IV. Posoudit antioxidační vlastnosti clodronatu, etidronatu a risedronatu a jejich účinek na oxidační stres vyvolaný železem.
- V. Zjistit vliv clodronatu, etidronatu a risedronatu na distribuci železa a některých stopových prvků v organismu.

4 MATERIÁL A METODY

Všechny pokusy byly provedeny na myších samcích (CD-1, Charles River, hmotnost 25 až 35 g). Zvířata byla chována v klimatizované místnosti s teplotou $21 \pm 2^\circ\text{C}$ při umělém světelném režimu 12 hodin světlo/12 hodin tma.

Pro odběr vzorků byla zvířata usmrcována v éterové anestezii podstřížením krčních tepen. Vytékající krev byla okamžitě zachycena do připravených zkumavek a následovalo vyjmutí orgánů pro analýzu.

Krev se odebírala do skleněných zkumavek předem naplněných roztokem 2M EDTA, aby se předešlo jejímu srážení. Roztok EDTA byl ze zkumavky odstraněn těsně před vlastním odběrem krve. Z každého vzorku se odebralo 0.5 ml krve do další skleněné zkumavky předem ošetřené roztokem 2M EDTA. Následovalo odstředění erytrocytů při 3000 otáčkách za minutu a 4°C po dobu 10 minut. Plasma se odtáhla a erytrocyty se promyly ve fyziologickém roztoku o teplotě 4°C . Erytrocyty se opět odstředily za stejných podmínek a použitý fyziologický roztok se odsál. Promývání se opakovalo třikrát vždy s ještě nepoužitým fyziologickým roztokem o teplotě 4°C .

Odstředěné erytrocyty se doplnily redestilovanou vodou (4°C) do objemu 2 ml (přibližně 1.75 ml redestilované vody na vzorek) a nechaly se zlyzovat při teplotě 4°C (alespoň 45 minut, do vzniku homogenního hemolyzátu). V hemolyzátu byla měřena aktivita superoxid dismutázy.

V jednotlivých pokusech byla odebírána játra, ledviny, slezina, srdce, pravý femur, mozek a varlata. Ve všech orgánech byl stanoven obsah stopových prvků a kadmia, pokud bylo v pokuse aplikováno. V játrech se navíc měřila hladina lipoperoxidace, obsah redukovaného glutationu, aktivita glutation peroxidázy a katalázy.

Vzorky pro stanovení glutationu byly vkládány do kádinek s ledovým roztokem 0.02M Na_2EDTA a okamžitě analyzovány. Ostatní vzorky byly ihned po odběru zmrazeny na -20°C a potom až do analýzy uchovávány při -70°C .

Pro stanovení hladiny lipoperoxidace, obsahu glutationu a aktivity glutation peroxidázy a katalázy byly použity tkáňové homogenáty.

Hladina lipoperoxidace byla měřena jako koncentrace malondialdehydu (MDA). Pro jeho stanovení byl použit test s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) (Uchiyama, 1978).

Hladina redukovaného glutationu byla stanovena spektrofotometricky metodou s Ellmanovým činidlem (Sedlak a Lindsay, 1968).

Aktivita glutation peroxidázy [EC 1.11.1.9] byla měřena podle Günzlera (Günzler et al, 1974).

Aktivita katalázy [EC 1.11.1.6] byla měřena spektrofotometricky na základě úbytku H_2O_2 , který je přidáván do reakční směsi jako substrát (Aebi, 1972).

Pro měření aktivity superoxid dismutázy [EC 1.15.1.1] byl použit set RANSOD.

Pro stanovení obsahu stopových prvků a kadmia byly tkáně zváženy a mineralizovány suchou cestou v platinových kelímcích při teplotě 450 až 500°C po dobu 18 až 24 hodin. Popel byl rozpuštěn v 3M HCl. Příslušně zředěné vzorky byly potom analyzovány atomovou absorpční spektrometrií, buď technikou atomizace v plameni nebo v grafitové kyvetě.

Ke statistické analýze byl použit Studentův *t*-test. S výjimkou pokusu s kadmíem jsou v práci následovně označeny jednotlivé hladiny významnosti:

* $p < 0.05$ proti kontrole	# $p < 0.05$ proti železu
** $p < 0.01$ proti kontrole	## $p < 0.01$ proti železu
*** $p < 0.001$ proti kontrole	### $p < 0.001$ proti železu

5 VÝSLEDKY

5.1 VLIV RŮZNÉHO MNOŽSTVÍ ŽELEZA V DIETĚ NA TOXICITU KADMIA

Kadmium je těžký kov, který je významný z hlediska znečištění životního prostředí. Kadmium způsobuje oxidační poškození tkání (Bal a Kasprzak, 2002) a předpokládá se, že v těchto procesech je významná účast železa (Casalino et al, 1997; Eybl et al, 1996). Cílem následujícího pokusu bylo zjistit vliv diet s různým obsahem železa na kadmii navozené oxidační poškození. Dále byl sledován vliv na hladinu stopových prvků ve vybraných orgánech.

Zvířata byla rozdělena po šestnácti do tří skupin. Každá ze skupin byla po dobu 4 týdnů krmena odlišnou dietou: skupina A dostávala standardní dietu (180 mg železa na kilogram diety), skupina B dostávala dietu se zvýšeným obsahem železa (860 mg železa ve formě 0,5% TMH-ferocenu na kilogram diety) a skupina C dostávala dietu se sníženým obsahem železa (méně než 10 mg železa na kilogram diety). Po 4 týdnech bylo osmi zvířatům z každé skupiny aplikováno subkutánně kadmium ve formě CdCl₂ v dávce 0,03 mmol na kilogram váhy. Zbylých osm zvířat z každé skupiny dostalo fyziologický roztok.

24 hodin po aplikaci kadmia byly myši dekapitovány a odebrány játra, ledviny, mozek a varlata. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace, hladina redukováného glutationu a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. Hladina stopových prvků a kadmia byla stanovena ve všech vybraných orgánech. Statistické hladiny významnosti:

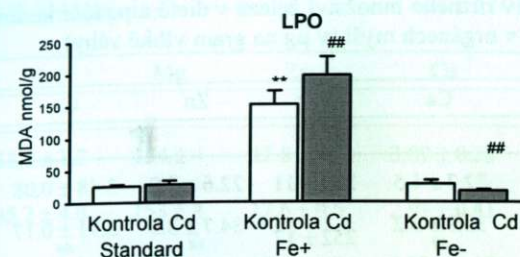
*p < 0.05, **p < 0.01 proti kontrole krmené standardní dietou
#p < 0.05, ##p < 0.01 proti skupině krmené equivalentní dietou

Výsledky:

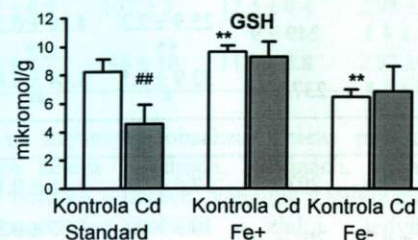
Lipoperoxidace v jaterním homogenátu byla významně zvýšená u zvířat krmených dietou se zvýšeným obsahem železa (p < 0.01). Míra lipoperoxidace u této skupiny byla ještě vyšší po podání kadmia (p < 0.01 proti kontrolním zvířatům téže skupiny). Kadmium naopak nemělo vliv na lipoperoxidaci u skupiny krmené standardní dietou. Lipoperoxidace byla nižší po podání kadmia u skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa (Graf 5.1).

Hladina redukováného glutationu byla zvýšená u skupiny krmené dietou se zvýšeným obsahem železa a snižena u skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa. Podání kadmia vedlo k depleci redukováného glutationu pouze u skupiny krmené standardní dietou (p < 0.01, Graf 5.2).

Aktivita glutation peroxidázy byla snižena u skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa. Podání kadmia neovlivnilo aktivitu glutation peroxidázy ani v jedné skupině. Aktivita katalázy byla snižena u zvířat krmených dietou se zvýšeným obsahem železa. Podání kadmia vedlo k poklesu aktivity katalázy u skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa.



Graf 5.1: Vliv různého množství železa v dietě a podání kadmia na lipoperoxidaci (LPO) v játrech myši



Graf 5.2: Vliv různého množství železa v dietě a podání kadmia na hladinu redukováného glutationu (GSH) v játrech myši

Koncentrace kadmia byla vyšší v mozku u skupiny krmené dietou se zvýšeným obsahem železa a nižší ve varlatech u skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa ve srovnání se skupinou krmenou standardní dietou. V ledvinách byla nižší koncentrace kadmia u skupin krmených dietou se zvýšeným a sníženým obsahem železa než u skupiny krmené standardní dietou. Koncentrace kadmia v játrech nebyla různými dietami ovlivněna (Tabulka 5.1).

Tabulka 5.1 - Vliv různého množství železa v dietě na koncentraci kadmia v orgánech myši (v µg na gram vlhké váhy).

	JÁTRA	LEDVINY	MOZEK	VARLATA
Skupina A	12.5 ± 1.3	11.8 ± 3.0	0.067 ± 0.005	0.24 ± 0.04
Skupina B	11.2 ± 1.3	8.5 ± 0.8*	0.078 ± 0.010*	0.21 ± 0.04
Skupina C	12.4 ± 1.4	8.1 ± 1.9*	0.065 ± 0.011	0.20 ± 0.02*

Tabulka 5.2 - Vliv různého množství železa v dietě a podání kadmia na koncentraci stopových prvků v orgánech myši (v µg na gram vlhké váhy)

	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe
JÁTRA					
A. Kontrola	22.7 ± 1.5	239 ± 11	22.6 ± 0.9	3.48 ± 0.08	82 ± 14
A. Cd	33.3 ± 8.2 ##	252 ± 17	34.7 ± 3.3 ##	3.91 ± 0.17 ##	134 ± 36 ##
B. Kontrola	23.9 ± 5.9	251 ± 12 *	21.4 ± 1.4	3.57 ± 0.29	4390 ± 544 **
B. Cd	21.4 ± 1.5	255 ± 8	27.9 ± 1.4 ##	3.87 ± 0.49	4759 ± 392
C. Kontrola	21.8 ± 4.1	249 ± 9	25.9 ± 2.3 **	4.20 ± 0.20 **	47 ± 5 **
C. Cd	24.7 ± 4.8	237 ± 14	33.9 ± 9.5 #	3.64 ± 0.41 ##	42 ± 12
LEDVINY					
A. Kontrola	37.4 ± 2.4	203 ± 7	17.6 ± 0.5	3.48 ± 0.11	39 ± 4
A. Cd	39.8 ± 4.5	201 ± 10	18.9 ± 0.6 ##	3.85 ± 0.31 ##	45 ± 3 #
B. Kontrola	41.7 ± 3.8 *	193 ± 5 **	16.5 ± 0.7 **	3.38 ± 0.20	120 ± 29 **
B. Cd	39.8 ± 2.9	194 ± 3	18.1 ± 0.6 ##	3.52 ± 0.12	109 ± 11
C. Kontrola	47.4 ± 11.5 *	205 ± 13	17.9 ± 1.5	3.62 ± 0.29 *	37 ± 2
C. Cd	41.1 ± 4.7	194 ± 4 ##	19.4 ± 0.6	3.70 ± 0.09	33 ± 2 #
VARLATA					
A. Kontrola	36.2 ± 2.6	156 ± 5	20.0 ± 0.5	1.13 ± 0.09	15.4 ± 1.2
A. Cd	124 ± 17 ##	61 ± 5 ##	14.6 ± 0.8 ##	0.93 ± 0.05 ##	60.6 ± 53 #
B. Kontrola	41.4 ± 9.5	155 ± 7	20.0 ± 1.3	1.27 ± 0.05 **	44 ± 15 **
B. Cd	136 ± 13 ##	67 ± 5 ##	15.4 ± 0.7 ##	1.14 ± 0.07 ##	49 ± 9
C. Kontrola	35.2 ± 4.1	159 ± 7	21.1 ± 0.8 *	1.42 ± 0.06 **	11.5 ± 0.8 **
C. Cd	122 ± 6.4 ##	68 ± 2 ##	15.6 ± 0.7 ##	1.15 ± 0.05 ##	30.2 ± 17.2 #

Tabulka 5.2 – Pokračování

	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe
MOZEK					
A. Kontrola	33.7 ± 1.7	154 ± 4	12.8 ± 0.4	3.09 ± 0.28	14.0 ± 1.1
A. Cd	35.2 ± 4.0	153 ± 4	12.6 ± 0.5	2.93 ± 0.41	14.0 ± 0.6
B. Kontrola	34.3 ± 2.8	155 ± 4	12.6 ± 0.3	3.19 ± 0.17	16.6 ± 2.9*
B. Cd	39.3 ± 10.6	153 ± 4	12.7 ± 1.1	3.19 ± 0.27	16.7 ± 2.3
C. Kontrola	33.3 ± 0.9	152 ± 3	12.4 ± 0.4	2.98 ± 0.30	13.4 ± 0.9
C. Cd	35.5 ± 7.7	146 ± 10	11.9 ± 0.8	2.77 ± 0.28	12.6 ± 1.0

Krmení dietou se zvýšeným obsahem železa po dobu čtyř týdnů vedlo ke zvýšení koncentrace železa v játrech, ledvinách, varlatech i v mozku. Byla zvýšena koncentrace hořčíku v játrech, vápníku v ledvinách a mědi ve varlatech. Došlo ke snížení koncentrace hořčíku a zinku v ledvinách. Krmení dietou se sníženým obsahem železa po dobu čtyř týdnů vedlo ke snížení koncentrace železa v játrech a varlatech. Byla zvýšena koncentrace zinku a mědi v játrech a varlatech, a vápníku a mědi v ledvinách. Podání kadmia vedlo ke zvýšené koncentraci vápníku, zinku, mědi a železa v játrech, zinku, mědi a železa v ledvinách, vápníku a železa ve varlatech, a ke snížení koncentrace hořčíku, zinku a mědi ve varlatech u skupiny krmené standardní dietou. U skupiny krmené dietou se zvýšeným obsahem železa vedlo podání kadmia ke zvýšené koncentraci zinku v játrech a ledvinách, vápníku ve varlatech, a ke snížení koncentrace hořčíku, zinku a mědi ve varlatech. U skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa vedlo podání kadmia ke zvýšené koncentraci zinku v játrech, vápníku a železa ve varlatech, a ke snížení koncentrace mědi v játrech, hořčíku a železa v ledvinách, a hořčíku, zinku a mědi ve varlatech. Koncentrace stopových prvků v mozku nebyla ovlivněna podáním kadmia (Tabulka 5.2).

Závěr:

Dieta se zvýšeným obsahem železa vedla k indukci lipoperoxidace v játrech. Účinek kadmia závisel na obsahu železa v dietě. Zatímco u skupiny krmené dietou se zvýšeným obsahem železa kadmium ještě zvýraznilo železem indukovanou lipoperoxidaci, ve skupině krmené dietou se sníženým obsahem železa byla lipoperoxidace po podání kadmia nižší, než u kontrolních zvířat téže skupiny. Obsah železa v dietě měl také vliv na hladinu redukováného glutationu. Ta byla zvýšená u skupiny krmené dietou se zvýšeným obsahem železa

a naopak snižená u skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa. Podání kadmia vedlo ke snížení hladiny redukovaného glutationu pouze u skupiny krmené standardní dietou. Zvýšený obsah železa v dietě neovlivnil aktivitu glutation peroxidázy, která byla ovšem nižší u skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa. Podání kadmia nemělo vliv na aktivitu glutation peroxidázy. Zvýšený obsah železa v dietě vedl ke snížení aktivity katalázy. Podání kadmia vedlo ke snížení aktivity katalázy u skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa.

Zvýšený obsah železa v dietě vedl ke kumulaci železa ve všech sledovaných orgánech, nejvýrazněji však v játrech. Změny koncentrace ostatních stopových prvků nepřesahovaly 10% hodnot skupiny krmené standardní dietou. Snižovaný obsah železa v dietě se projevil v nižší koncentraci železa v játrech a varlatech, která byla doprovázena zvýšenou koncentrací zinku a mědi v těchto orgánech.

Změny koncentrací stopových prvků navozené podáním kadmia ve skupině krmené dietou se zvýšeným a sníženým obsahem železa byly většinou stejné (varlata), nebo o něco méně vyjádřené (játra, ledviny) vzhledem ke skupině krmené standardní dietou. V mozku nebyly sledovány žádné změny v koncentraci stopových prvků.

5.2 VLIV QUERCETINU NA OXIDAČNÍ STRES

V několika studiích, především *in vitro*, bylo ukázáno, že quercetin má antioxidační vlastnosti (Nunez et al, 2001; Aherne a O'Brien, 2000). Cílem následujících pokusů bylo zjistit vliv quercetinu na antioxidační systém myši. Dále jsme chtěli posoudit, zda afinita quercetinu k různým kovům (Sugihara et al, 1999; Kuo et al, 1998) pozitivně ovlivňuje oxidační stres způsobený železem, a také byl sledován vliv quercetinu na hladinu některých prvků ve vybraných orgánech.

Quercetin (Sigma-Aldrich) byl podáván per os v různých dávkách ve formě disperze v 0.25% roztoku metylcelulózy. Železo jako síran železnatý bylo aplikováno intraperitoneálně v dávce 10 mg železa na kilogram váhy ve vodném roztoku. Všechny roztoky byly připraveny čerstvě před aplikací.

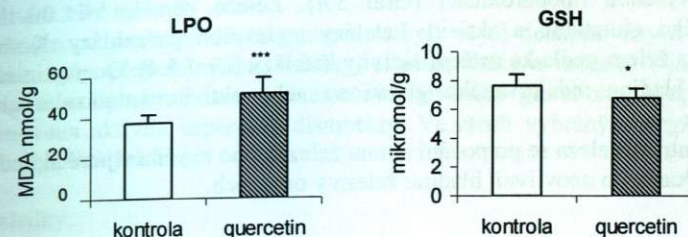
5.2.1 Quercetin 8.5 mg na kilogram váhy po dobu 21 dní

V tomto pokuse byl podáván quercetin v dávce 8.5 mg na kilogram váhy jednou denně po dobu 21 dní. Kontrolní skupina dostávala 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš. V obou skupinách bylo po osmi zvířatech.

24 hodin po poslední dávce byly myši dekapitovány a odebrány játra, ledviny a mozek. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace, hladina redukovaného glutationu a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. Hladina prvků byla stanovena ve všech vybraných orgánech.

Výsledky:

Lipoperoxidace v jaterním homogenátu byla významně zvýšená po podání quercetinu ($p < 0.001$, Graf 5.3). Hladina redukovaného glutationu byla naopak významně nižší u quercetinové skupiny vzhledem ke kontrolním zvířatům ($p < 0.05$, Graf 5.3). Aktivita katalázy a glutation peroxidázy nebyla podáním quercetinu nijak ovlivněna. Quercetin zvýšil hladinu hořčičku v játrech, snížil obsah zinku v ledvinách a ořčiku v mozku.



Graf 5.3: Vliv quercetinu v dávce 8.5 mg/kg po dobu 21 dní na lipoperoxidaci (LPO, vlevo) a hladinu redukovaného glutationu (GSH, vpravo) v játrech myši

Závěr:

Výsledky tohoto pokusu ukazují, že quercetin v dávce 8.5 mg na kilogram váhy po dobu 21 dní per os navozuje v játrech zvýšení lipoperoxidace. Hladina redukovaného glutationu v játrech byla snížena na přibližně 89% kontrolních hodnot. Quercetin neměl vliv na aktivitu jaterní katalázy a glutation peroxidázy. Změny koncentrací hořčičku v játrech a mozku, a zinku v ledvinách byly statisticky významné, nicméně velmi mírné.

5.2.2 Interakce mezi quercetinem a železem po šestidenní aplikaci quercetinu

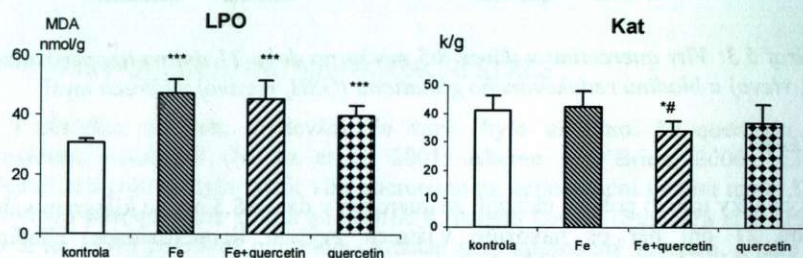
Myši byly rozděleny do dvou skupin po 14 jedincích. Jedné skupině byl podáván quercetin per os v dávce 8.5 mg na kilogram váhy jednou denně po dobu 6 dní. Kontrolní skupina dostávala 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš. Od čtvrtého dne byl sedmi jedincům z každé skupiny aplikován intraperitoneálně síran železnatý (10 mg železa na kilogram váhy) jednou denně po tři dny. Druhá polovina z každé skupiny sloužila jako kontrola a dostávala 0.3 ml fyziologického roztoku intraperitoneálně po tři dny.

24 hodin po poslední dávce quercetinu byly myši dekapitovány a odebrány játra, ledviny, slezina, srdce a mozek. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace, hladina redukováného glutationu, a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. Ve všech vybraných orgánech byla stanovena hladina železa.

Výsledky:

Lipoperoxidace v jaterním homogenátu byla významně zvýšená po aplikaci železa ($p < 0.001$). Quercetin sám také zvýšil lipoperoxidaci, ale dále neměl vliv na železem zvýšenou lipoperoxidaci (Graf 5.4). Železo nemělo vliv na hladinu redukováného glutationu a aktivitu katalázy a glutation peroxidázy. Kombinace quercetinu a železa vedla ke snížení aktivity katalázy (Graf 5.4). Quercetin samotný neovlivnil hladinu redukováného glutationu nebo aktivitu katalázy a glutation peroxidázy.

Koncentrace železa se po podání síranu železnatého zvýšila v játrech, ledvinách a slezině. Quercetin neovlivnil hladinu železa v orgánech.



Graf 5.4: Vliv quercetinu v dávce 8.5 mg/kg po dobu 6 dní a železa v dávce 10 mg/kg po dobu 3 dní na lipoperoxidaci (LPO, vlevo) a aktivitu katalázy (Kat, vpravo) v játrech myši

Závěr:

Výsledky ukazují, že podání železa v dávce 10 mg na kilogram váhy intraperitoneálně významně zvýšilo míru lipoperoxidace v jaterním homogenátu (přibližně 1.5 krát). Tato dávka však neměla vliv na hladinu redukováného glutationu a aktivitu katalázy a glutation peroxidázy. Quercetin také zvýšil lipoperoxidaci, ale neměl vliv na železem zvýšenou lipoperoxidaci. Quercetin samotný neovlivnil hladinu redukováného glutationu a aktivitu katalázy a glutation peroxidázy. Ačkoliv železo a quercetin nezměnily aktivitu katalázy, jejich kombinace vedla ke snížení aktivity katalázy.

Koncentrace železa se po podání síranu železnatého zvýšila v játrech, ledvinách a slezině. Quercetin neovlivnil hladinu železa v orgánech.

5.2.3 Interakce mezi quercetinem a železem po třídenní aplikaci quercetinu

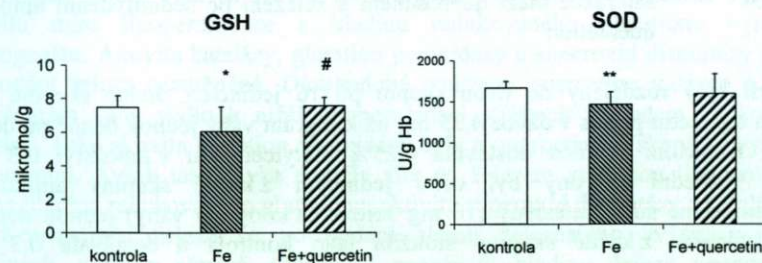
Myši byly rozděleny do tří skupin po 8 jedincích. Dvě skupiny dostávaly intraperitoneálně síran železnatý (10 mg železa na kilogram váhy) jednou denně po tři dny. Třetí skupina sloužila jako kontrola a dostávala 0.3 ml fyziologického roztoku intraperitoneálně po tři dny. Po dvoudenní pauze byl jedné ze skupin, která dostávala železo, podáván quercetin per os v dávce 8.5 mg na kilogram váhy jednou denně po dobu tří dnů. Zbylé dvě skupiny dostávaly 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš.

24 hodin po poslední dávce quercetinu byly myši dekapitovány a zachycena krev. Dále byly odebrány játra, ledviny, slezina, srdce a mozek. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace a hladina redukováného glutationu. V erythrocytech byla stanovena aktivita superoxid dismutázy. Ve všech vybraných orgánech byla stanovena hladina železa.

Výsledky:

Aplikace železa vedla ke zvýšení lipoperoxidace v jaterním homogenátu ($p < 0.01$) a ke snížení hladiny redukováného glutationu ($p < 0.05$, Graf 5.5). Aktivita superoxid dismutázy v erythrocytech byla snížena po podání železa ($p < 0.05$, Graf 5.5). Quercetin neměl vliv na železem zvýšenou lipoperoxidaci. Quercetin srovnal snížené hladiny redukováného glutationu na kontrolní hodnoty (Graf 5.5). Aktivita superoxid dismutázy nebyla quercetinem ovlivněna (Graf 5.5).

Koncentrace železa se po podání síranu železnatého zvýšila v játrech, srdci a slezině. Quercetin snížil hladinu železa v játrech. Kombinace železa a quercetinu zvýšila koncentraci železa v ledvinách (Tabulka 5.3).



Graf 5.5: Vliv železa v dávce 10 mg/kg po dobu 3 dní a quercetinu po dvoudenní pauze v dávce 8.5 mg/kg po dobu 3 dní na hladinu redukováného glutationu (GSH, vlevo) v játrech myši a aktivitu superoxid dismutázy (SOD v na gram hemoglobinu, vpravo) v erythrocytech myši

Tabulka 5.3 - Vliv železa v dávce 10 mg/kg po dobu 3 dní a quercetinu v dávce 8,5 mg/kg po dobu 3 dní na koncentraci železa v orgánech myši (v μg na gram vlhké váhy)

	JÁTRA	LEDVINY	SLEZINA	SRDCE	MOZEK
Kontrola	104 ± 18	43.2 ± 3.0	323 ± 75	55.7 ± 0.9	17.1 ± 1.3
Fe	183 ± 18 ***	46.2 ± 5.7	532 ± 124 **	61.0 ± 3.1 ***	17.2 ± 1.6
Fe + Quercetin	160 ± 15#	48.3 ± 5.2 *	683 ± 204 ***	60.2 ± 3.7 **	16.7 ± 1.7

Závěr:

Podání železa v dávce 10 mg na kilogram váhy intraperitoneálně významně zvýšilo míru lipoperoxidace v jaterním homogenátu. Dále došlo k poklesu redukovaného glutationu a snížení aktivity superoxid dismutázy v erythrocytech. Quercetin měl pozitivní vliv na snížené hladiny redukovaného glutationu, které se vrátily ke kontrolním hodnotám u skupiny léčené quercetinem. Na druhé straně quercetin neměl vliv na železem zvýšenou lipoperoxidaci, ani na sníženou aktivitu superoxid dismutázy.

Koncentrace železa se po podání síranu železnatého zvýšila v játrech, srdci a slezině. Podání quercetinu vedlo ke snížení koncentrace železa v játrech. Ačkoliv koncentrace železa nebyla zvýšená v ledvinách u skupiny, které byl aplikován samotný síran železnatý, podání quercetinu po třech dávkách železa vedlo k mírnému zvýšení hladin železa v ledvinách. Quercetin neovlivnil hladinu železa v ostatních orgánech.

5.2.4 Interakce mezi quercetinem a železem po sedmítýdenní aplikaci quercetinu

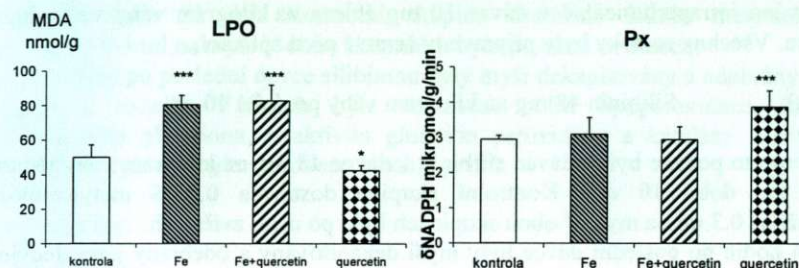
Myši byly rozděleny do dvou skupin po 16 jedincích. Jedné skupině byl podáván quercetin per os v dávce 4.25 mg na kilogram váhy jednou denně po dobu 49 dní. Kontrolní skupina dostávala 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš. Poslední tři dny byl osmi jedincům z každé skupiny aplikován intraperitoneálně síran železnatý (10 mg železa na kilogram váhy) jednou denně. Druhá polovina z každé skupiny sloužila jako kontrola a dostávala 0.3 ml fyziologického roztoku intraperitoneálně po tři dny.

24 hodin po poslední dávce quercetinu byly myši dekapitovány a zachycena krev. Dále byly odebrány játra, ledviny, slezina, srdce a mozek. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace, hladina redukovaného glutationu, a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. V erythrocytech byla stanovena aktivita superoxid dismutázy. Ve všech vybraných orgánech byla stanovena hladina železa.

Výsledky:

Aplikace železa vedla ke zvýšení lipoperoxidace v jaterním homogenátu ($p < 0.001$, Graf 5.6) a ke zvýšení hladiny redukovaného glutationu ($p < 0.01$). Železo nemělo vliv na aktivitu superoxid dismutázy, katalázy a glutation peroxidázy. Quercetin snížil lipoperoxidaci, ale neměl vliv na železem indukovanou lipoperoxidaci (Graf 5.6). Aktivita glutation peroxidázy se zvýšila po podání quercetinu (Graf 5.6). Quercetin neovlivnil hladinu redukovaného glutationu nebo aktivitu katalázy a superoxid dismutázy.

Koncentrace železa se po podání síranu železnatého zvýšila v játrech, ledvinách, srdci a slezině. Quercetin neovlivnil hladinu železa v orgánech.



Graf 5.6: Vliv železa v dávce 10 mg/kg po dobu 3 dní a quercetinu v dávce 4.25 mg/kg po dobu 49 dní na lipoperoxidaci (LPO, vlevo) a aktivitu glutation peroxidázy (Px, vpravo) v játrech myši

Závěr:

Podání železa v dávce 10 mg na kilogram váhy intraperitoneálně významně zvýšilo míru lipoperoxidace a hladinu redukovaného glutationu v jaterním homogenátu. Aktivita katalázy, glutation peroxidázy a superoxid dismutázy zůstala po podání železa nezměněná. Dlouhodobé podávání quercetinu v dávce 4.25 mg na kilogram váhy vedlo k nižší lipoperoxidaci v játrech vzhledem ke kontrolní skupině. Také aktivita glutation peroxidázy byla u quercetinové skupiny vyšší než u kontrolní. Avšak tato dávka neměla vliv na železem zvýšenou lipoperoxidaci, ani na hladinu redukovaného glutationu, aktivitu superoxid dismutázy a katalázy.

Koncentrace železa se po podání síranu železnatého zvýšila v játrech, ledvinách, srdci a slezině. Quercetin neovlivnil hladinu železa ve vybraných orgánech.

5.3 VLIV SILIBININU NA OXIDAČNÍ STRES

Podobně jako quercetin, také silibinin je látka s antioxidačním potenciálem. Některé studie dokazují jeho antioxidační účinek a předpokládá se, že silibinin je spíše vyčytávačem volných radikálů, ačkoliv jeho afinita k železu může také mít význam (Psotova et al, 2002; Bhattacharya et al, 2000). Cílem následujících pokusů bylo zjistit vliv silibininu na antioxidační systém myši. Dále jsme chtěli posoudit, zda afinita silibininu k železu (Borsari et al, 2001) pozitivně ovlivňuje oxidační stres způsobený železem, a také byl sledován vliv silibininu na hladinu některých prvků ve vybraných orgánech.

Silibinin (Sigma-Aldrich) byl podáván per os v různých dávkách ve formě disperze v 0.25% roztoku metylcelulózy. Železo jako síran železnatý bylo aplikováno intraperitoneálně v dávce 10 mg železa na kilogram váhy ve vodném roztoku. Všechny roztoky byly připraveny čerstvě před aplikací.

5.3.1 Silibinin 48 mg na kilogram váhy po dobu 10 dní

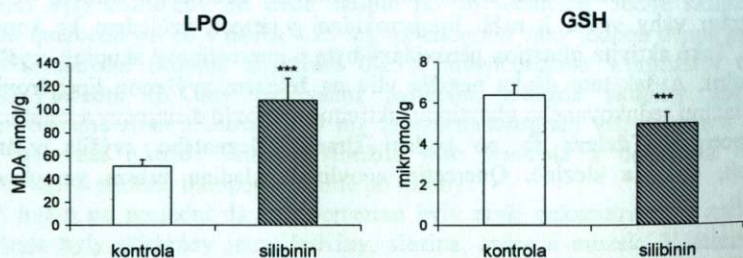
V tomto pokuse byl podáván silibinin v dávce 48 mg na kilogram váhy jednou denně po dobu 10 dní. Kontrolní skupina dostávala 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš. V obou skupinách bylo po osmi zvířatech.

24 hodin po poslední dávce byly myši dekapitovány a odebrány játra, ledviny a mozek. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace a hladina redukováného glutationu. Koncentrace prvků byla stanovena ve všech vybraných orgánech.

Výsledky:

Lipoperoxidace v jaterním homogenátu byla významně zvýšená po podání silibininu ($p < 0.001$, Graf 5.7). Hladina redukováného glutationu byla naopak významně nižší u silibininové skupiny vzhledem ke kontrolním zvířatům ($p < 0.001$, Graf 5.7).

Silibinin zvýšil hladinu zinku a mědi v játrech, a železa v ledvinách.



Graf 5.7: Vliv silibininu v dávce 48 mg/kg po dobu 10 dní na lipoperoxidaci (LPO, vlevo) a hladinu redukováného glutationu (GSH, vpravo) v játrech myši

Závěr:

Silibinin v dávce 48 mg na kilogram váhy po dobu deseti dní výrazně zvýšil míru lipoperoxidace v játrech (více než dvojnásobek kontrolních hodnot). Dále došlo k významnému poklesu hladin redukováného glutationu (78% kontrolních hodnot).

Změny koncentrací zinku a mědi v játrech, a železa v ledvinách byly statisticky významné, nicméně velmi mírné.

5.3.2 Silibinin 12 mg na kilogram váhy po dobu 21 dní

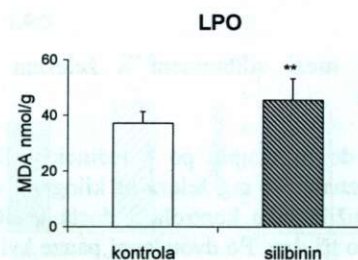
V tomto pokuse byl podáván silibinin v dávce 12 mg na kilogram váhy jednou denně po dobu 21 dní. Kontrolní skupina dostávala 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš. V obou skupinách bylo po osmi zvířatech.

24 hodin po poslední dávce silibininu byly myši dekapitovány a odebrány játra, ledviny a mozek. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace, hladina redukováného glutationu, a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. Ve všech vybraných orgánech byla stanovena hladina prvků.

Výsledky:

Lipoperoxidace v jaterním homogenátu byla zvýšená po podání silibininu z kontrolních ($p < 0.01$, Graf 5.8). Silibinin neměl vliv na hladinu redukováného glutationu a aktivitu katalázy a glutation peroxidázy.

Došlo ke zvýšení koncentrace mědi v ledvinách a hořčíku v mozku.



Graf 5.8: Vliv silibininu v dávce 12 mg/kg po dobu 21 dní na lipoperoxidaci (LPO) v játrech myši

Závěr:

Silibinin v dávce 12 mg na kilogram váhy po dobu 21 dní významně zvýšil míru lipoperoxidace v játrech. Tato dávka však neovlivnila hladinu redukováného glutationu, a aktivitu katalázy a glutation peroxidázy.

Změny koncentrací mědi v ledvinách a hořčiku v mozku byly statisticky významné, nicméně velmi mírné.

5.3.3 Silibinin 6 mg na kilogram váhy po dobu sedmi týdnů

V tomto pokuse byl podáván silibinin v dávce 6 mg na kilogram váhy jednou denně po dobu sedmi týdnů. Kontrolní skupina dostávala 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš. V obou skupinách bylo po osmi zvířatech.

24 hodin po poslední dávce silibininu byly myši dekapitovány a zachycena krev. Dále byly odebrány játra, ledviny, slezina, srdce a mozek. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace, hladina redukovaného glutationu, a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. V erythrocytech byla stanovena aktivita superoxid dismutázy. Ve všech vybraných orgánech byla stanovena hladina prvků.

Výsledky:

Lipoperoxidace, hladina redukovaného glutationu, a aktivita katalázy, glutation peroxidázy a superoxid dismutázy nebyly ovlivněny podáním silibininu. Koncentrace hořčiku v srdci a mědi v mozku byla po podání silibininu snížena.

Závěr:

Dlouhodobé podávání silibininu v dávce 6 mg na kilogram váhy nemělo vliv na žádný ze sledovaných parametrů (lipoperoxidace, hladina redukovaného glutationu, aktivita katalázy, glutation peroxidázy a superoxid dismutázy). Ačkoliv pokles koncentrace mědi v mozku a hořčiku v srdci byl statisticky významný, tato změna byla velice mírná.

5.3.4 Interakce mezi silibininem a železem po třídenní aplikaci silibininu

Myši byly rozděleny do tří skupin po 8 jedincích. Dvě skupiny dostávaly intraperitoneálně síran železnatý (10 mg železa na kilogram váhy) jednou denně po tři dny. Třetí skupina sloužila jako kontrola a dostávala 0.3 ml fyziologického roztoku intraperitoneálně po tři dny. Po dvoudenní pauze byl jedné ze skupin, která dostávala železo, podáván silibinin per os v dávce 12 mg na kilogram váhy jednou denně po dobu tří dnů. Zbylé dvě skupiny dostávaly 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš.

24 hodin po poslední dávce silibininu byly myši dekapitovány a zachycena krev. Dále byly odebrány játra, ledviny, slezina, srdce a mozek. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace a hladina redukovaného glutationu.

V erythrocytech byla stanovena aktivita superoxid dismutázy. Ve všech vybraných orgánech byla stanovena hladina železa.

Výsledky:

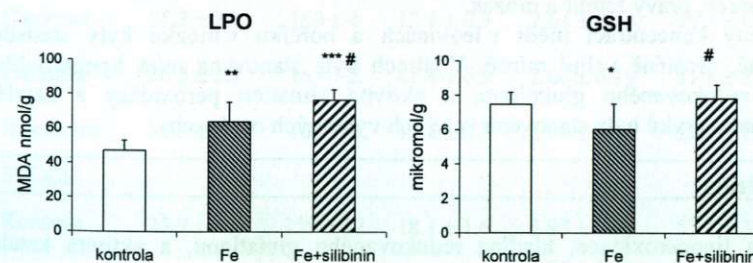
Aplikace železa vedla ke zvýšení lipoperoxidace v jaterním homogenátu ($p < 0.01$, Graf 5.9) a ke snížení hladin redukovaného glutationu ($p < 0.05$, Graf 5.9). Aktivita superoxid dismutázy v erythrocytech byla snížena po podání železa ($p < 0.05$). Silibinin ještě více zvýraznil železem indukovanou lipoperoxidaci ($p < 0.05$ vůči skupině se železem, Graf 5.9). Silibinin srovnal snížené hladiny redukovaného glutationu na kontrolní hodnoty (Graf 5.9). Aktivita superoxid dismutázy nebyla silibininem ovlivněna.

Koncentrace železa se po podání síranu železnatého zvýšila v játrech, srdci a slezině. Silibinin neovlivnil hladinu železa ve vybraných orgánech.

Závěr:

Podání železa v dávce 10 mg na kilogram váhy intraperitoneálně významně zvýšilo míru lipoperoxidace v jaterním homogenátu. Dále došlo k poklesu redukovaného glutationu a snížení aktivity superoxid dismutázy v erythrocytech. Silibinin měl pozitivní vliv na snížené hladiny redukovaného glutationu, které se vrátily ke kontrolním hodnotám u skupiny léčené silibininem. Na druhé straně silibinin ještě zvýšil železem indukovanou lipoperoxidaci a neměl vliv na železem sníženou aktivitu superoxid dismutázy.

Koncentrace železa se po podání síranu železnatého zvýšila v játrech, srdci a slezině. Silibinin neovlivnil hladinu železa ve vybraných orgánech.



Graf 5.9: Vliv železa v dávce 10 mg/kg po dobu 3 dní a silibininu po dvoudenní pauze v dávce 12 mg/kg po dobu 3 dní na lipoperoxidaci (LPO, vlevo) a hladinu redukovaného glutationu (GSH, vpravo) v játrech myši

5.4 VLIV BISFOSFONÁTŮ NA OXIDAČNÍ STRES

Bisfosfonáty dnes zaujímají významné postavení v léčbě celé řady metabolických onemocnění skeletu. Ačkoliv jejich hlavním mechanismem účinku je inhibice osteoklastů, zdá se, že mezi jejich další aktivity by mohly patřit také antioxidační účinky (Dombrecht et al, 2003; Kljuchnikov et al, 1993). Cílem následujících pokusů bylo zjistit vliv bisfosfonátů na antioxidační systém myši. Dále jsme chtěli posoudit, zda vybrané bisfosfonáty mají nějaký vliv na oxidační stres způsobený železem, a také byl sledován vliv bisfosfonátů na hladinu stopových prvků ve vybraných orgánech.

Byli vybráni tři zástupci bisfosfonátů, kteří se lišili jednak v chemické struktuře, jednak ve své relativní potenci inhibovat kostní resorpci v následujícím pořadí: risedronat > clodronat > etidronat (Vyskočil a Kutílek, 2004). Risedronat (Actonel® 35 mg), clodronat (Bonefos® 400 mg) a etidronat (Didronate® 200 mg) byly podávány per os v dávce 100 mg (odpovídá přibližně 0.35 mmol) na kilogram váhy ve formě disperze v 0.25% roztoku metylcelulózy. Železo jako síran železnatý bylo aplikováno intraperitoneálně v dávce 10 mg železa na kilogram váhy ve vodném roztoku. Všechny roztoky byly připraveny čerstvě před aplikací.

5.4.1 Vliv bisfosfonátů na antioxidační systém myši

Vybrané bisfosfonáty byly podávány per os v dávce 100 mg na kilogram váhy jednou denně po dobu 5 dní. Kontrolní skupina dostávala 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš. Ve všech skupinách bylo po osmi zvířatech.

24 hodin po poslední dávce byly myši dekapitovány a odebrány játra, ledviny, slezina, srdce, pravý femur a mozek.

Změny koncentrací mědi v ledvinách a hořčíku v mozku byly statisticky významné, nicméně velmi mírné. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace, hladina redukovaného glutationu, a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. Koncentrace prvků byla stanovena ve všech vybraných orgánech.

Výsledky:

Míra lipoperoxidace, hladina redukovaného glutationu, a aktivita katalázy a glutation peroxidázy v jaterním homogenátu nebyly bisfosfonáty ovlivněny.

Clodronat snížil koncentraci vápníku v játrech, zinku v ledvinách a femuru, a hořčíku a mědi v srdci. Etidronat snížil koncentraci vápníku v játrech a femuru, zinku v ledvinách a femuru, hořčíku v srdci, a mědi v srdci a ve slezině. Risedronat zvýšil koncentraci zinku v játrech a snížil koncentraci mědi v srdci (Tabulka 5.4).

Tabulka 5.4 - Vliv clodronatu, etidronatu a risedronatu v dávce 100 mg/kg po dobu 5 dní na koncentraci stopových prvků v orgánech myši (v µg na gram vlhké váhy).

	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe
JÁTRA					
Kontrola	28.6 ± 1.5	238 ± 6	20.6 ± 1.8	4.69 ± 0.51	68.8 ± 8.9
Clodronat	25.8 ± 2.1 **	239 ± 6	21.0 ± 1.7	4.48 ± 0.98	76.3 ± 19.3
Etidronat	25.6 ± 2.6 *	237 ± 7	21.5 ± 1.1	4.53 ± 0.53	72.8 ± 18.6
Risedronat	27.2 ± 2.0	240 ± 4	23.5 ± 2.1 **	4.70 ± 0.85	71.9 ± 11.2
LEDVINY					
Kontrola	37.2 ± 2.3	206 ± 13	17.3 ± 1.0	3.49 ± 0.30	34.2 ± 3.3
Clodronat	36.1 ± 3.0	195 ± 10	16.0 ± 1.2 *	3.28 ± 0.27	33.7 ± 2.6
Etidronat	36.1 ± 2.4	193 ± 15	15.8 ± 1.3 **	3.21 ± 0.30	33.4 ± 2.5
Risedronat	36.7 ± 1.7	206 ± 16	17.1 ± 1.6	3.50 ± 0.20	39.2 ± 4.2
MOZEK					
Kontrola	37.1 ± 2.7	162 ± 2	12.7 ± 0.3	2.70 ± 0.17	12.5 ± 1.0
Clodronat	35.3 ± 2.0	160 ± 4	12.6 ± 0.3	2.61 ± 0.15	11.7 ± 0.5
Etidronat	36.5 ± 2.1	163 ± 2	12.8 ± 0.3	2.66 ± 0.19	11.8 ± 1.1
Risedronat	36.8 ± 1.4	163 ± 3	12.6 ± 0.3	2.76 ± 0.14	12.9 ± 1.2
SRDCE					
Kontrola	25.9 ± 4.2	259 ± 12	18.1 ± 1.6	5.93 ± 0.30	57.1 ± 3.9
Clodronat	24.9 ± 4.7	245 ± 7*	17.1 ± 0.7	5.50 ± 0.16 **	55.0 ± 4.2
Etidronat	26.1 ± 2.4	245 ± 7*	17.9 ± 1.3	5.57 ± 0.20 *	54.5 ± 3.1
Risedronat	24.7 ± 3.6	250 ± 12	17.6 ± 1.5	5.64 ± 0.19 *	57.3 ± 2.3

Tabulka 5.4 - Pokračování

	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe
SLEZINA					
Kontrola	28.0 ± 3.1	256 ± 12	21.2 ± 1.4	1.39 ± 0.18	154 ± 14
Clodronat	28.9 ± 4.1	257 ± 9	21.2 ± 1.4	1.23 ± 0.15	152 ± 27
Etidronat	26.9 ± 4.5	246 ± 7	20.3 ± 0.9	1.22 ± 0.05 *	143 ± 12
Risedronat	26.1 ± 4.2	249 ± 20	21.5 ± 1.7	1.31 ± 0.14	141 ± 24
FEMUR					
Kontrola	123 ± 11	1.39 ± 0.15	95.4 ± 7.7	3.09 ± 0.36	40.9 ± 7.2
Clodronat	114 ± 12	1.30 ± 0.17	88.4 ± 4.2 *	2.97 ± 0.26	38.6 ± 6.7
Etidronat	106 ± 11 *	1.26 ± 0.21	78.2 ± 6.8 ***	2.91 ± 0.35	43.1 ± 4.1
Risedronat	129 ± 8	1.49 ± 0.13	96.7 ± 7.5	3.38 ± 0.25	48.0 ± 3.2

Závěr:

Podávání bisfosfonátů v dávce 100 mg na kilogram váhy neovlivnilo ani jeden ze sledovaných parametrů oxidačního poškození (lipoperoxidace, redukováný glutation, aktivita katalázy a glutation peroxidázy).

Změny v koncentraci prvků se nejvíce týkaly zinku (ledviny a femur) a až na výjimky byly na hranici statistické významnosti.

5.4.2 Interakce mezi bisfosfonáty a železem

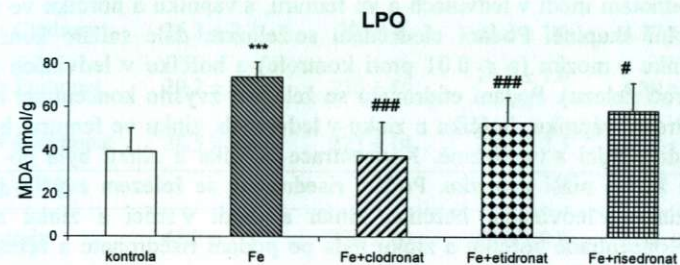
Myši byly rozděleny do pěti skupin po 8 jedincích. Clodronat, etidronat a risedronat byly podávány v dávce 100 mg na kilogram váhy po dobu pěti dní. Dvě skupiny dostávaly po stejnou dobu 0.3 ml 0.25% metylcelulózy na myš. Železo bylo aplikováno od třetího dne v dávce 10 mg na kilogram váhy po dobu tří dnů všem skupinám s bisfosfonáty a jedné kontrolní. Zbylá skupina dostávala 0.3 ml fyziologického roztoku na myš po dobu tří dnů a sloužila jako kontrola.

24 hodin po poslední dávce byly myši dekapitovány a odebrány játra, ledviny, slezina, srdce, pravý femur a mozek. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace, hladina redukováného glutationu, a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. Koncentrace prvků byla stanovena ve všech vybraných orgánech.

Výsledky:

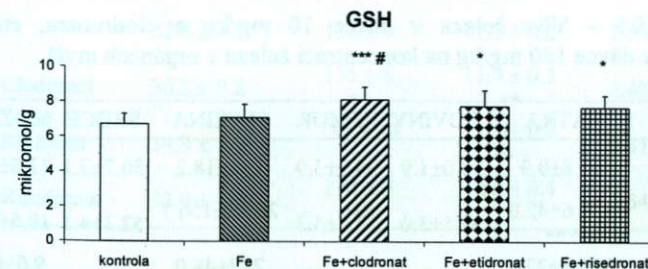
Podání železa vedlo k zvýšení lipoperoxidace v jaterním homogenátu ($p < 0.001$, graf 5.10), ale neovlivnilo hladinu redukováného glutationu (Graf 5.11), nebo aktivitu katalázy a glutation peroxidázy.

Clodronat, etidronat a risedronat významně snížily železem indukovanou lipoperoxidaci, která se v případě clodronatu rovnala kontrolním hodnotám (Graf 5.10). Hladina redukováného glutationu byla zvýšená po podání všech bisfosfonátů se železem (Graf 5.11). Ani jeden bisfosfonát neměl vliv na aktivitu katalázy a glutation peroxidázy.



Graf 5.10: Vliv železa v dávce 10 mg/kg a clodronatu, etidronatu a risedronatu v dávce 100 mg/kg na lipoperoxidaci (LPO) v játrech myši

Podání síranu železnatého zvýšilo koncentraci železa v játrech a slezině. Podání risedronatu se železem vedlo k dalšímu zvýšení koncentrace železa v játrech ($p < 0.01$). Podání etidronatu nebo clodronatu se železem nemělo vliv na zvýšené hladiny železa v játrech. Ani jeden bisfosfonát se železem nezměnil zvýšené hladiny železa ve slezině. Podání etidronatu nebo risedronatu se železem zvýšilo koncentraci železa v ledvinách, femuru a srdci. Všechny bisfosfonáty v kombinaci se železem snížily hladinu železa v mozku (Tabulka 5.5).



Graf 5.11: Vliv železa v dávce 10 mg/kg a clodronatu, etidronatu a risedronatu v dávce 100 mg/kg na hladinu redukováného glutationu (GSH) v játrech myši

Podání síranu železnatého zvýšilo koncentraci železa v játrech a slezině. Podání risedronatu se železem vedlo k dalšímu zvýšení koncentrace železa v játrech ($p < 0.01$). Podání etidronatu nebo clodronatu se železem nemělo vliv na zvýšené hladiny železa v játrech. Ani jeden bisfosfonát se železem nezměnil zvýšené hladiny železa ve slezině. Podání etidronatu nebo risedronatu se železem zvýšilo koncentraci železa v ledvinách, femuru a srdci. Všechny bisfosfonáty v kombinaci se železem snížily hladinu železa v mozku (Tabulka 5.5).

Po podání železa byla snižená hladina mědi v ledvinách a femuru, a vápníku a hořčíku ve femuru. Risedronat vrátil hladinu mědi v ledvinách a ve femuru, a vápníku a hořčíku ve femuru ke kontrolním hodnotám. Podání etidronatu vedlo k vyšším hodnotám mědi v ledvinách a ve femuru, a vápníku a hořčíku ve femuru proti kontrolní skupině. Podání clodronatu se železem dále snížilo koncentraci hořčíku a zinku v mozku ($p < 0.01$ proti kontrole) a hořčíku v ledvinách a srdci ($p < 0.05$ proti železu). Podání etidronatu se železem zvýšilo koncentraci hořčíku a zinku v játrech, vápníku, hořčíku a zinku v ledvinách, zinku ve femuru, hořčíku, zinku a mědi v srdci a ve slezině. Koncentrace hořčíku a zinku byla po podání etidronatu a železa nižší v mozku. Podání risedronatu se železem zvýšilo hladinu vápníku a zinku v ledvinách, hořčíku, zinku a mědi v srdci a zinku a mědi ve slezině. Koncentrace hořčíku a zinku byla po podání risedronatu a železa nižší v mozku (Tabulka 5.6).

Závěr:

Podání bisfosfonátů v dávce 100 mg na kilogram váhy po dobu 5 dní snížilo železem navozenou lipoperoxidaci v játrech. Clodronat dokonce vrátil lipoperoxidaci ke kontrolním hodnotám. Ačkoliv podání samotného síranu železnatého neovlivnilo hladiny redukovaného glutationu v játrech, kombinace s bisfosfonáty zvýšila koncentraci redukovaného glutationu. Aktivita katalázy a glutation peroxidázy nebyla ovlivněna ani železem, ani bisfosfonáty.

Tabulka 5.5 - Vliv železa v dávce 10 mg/kg a clodronatu, etidronatu a risedronatu v dávce 100 mg/kg na koncentraci železa v orgánech myši

	JÁTRA	LEDVINY	FEMUR	SLEZINA	SRDCE	MOZEK
Kontrola	63.8±9.9	30.0±1.9	34.2±3.9	133±18.2	50.7±3.1	11.0±0.4
Fe	133.6±42.0 ***	30.5±3.0	32.8±5.3	285.2±156.7 *	52.3±4.1	10.5±1.2
Fe + Clodronat	140.3±23.4 ***	31.2±3.0	36.2±5.3	217±48.0 ***	49.1±4.4	9.6±0.7 ***#
Fe + Etidronat	159.6±35.1 ***	39.6±4.3 ***###	50.1±6.1 ***###	257.6±49.8 ***	63.7±6.4 ***###	9.7±1.0 **
Fe + Risedronat	201.2±33.6 ***##	37.8±4.6 ***##	46.0±7.9 ***##	262.2±33.0 ***	58.3±4.7 **#	10.3±0.6 *

Tabulka 5.6 - Vliv železa v dávce 10 mg/kg a clodronatu, etidronatu a risedronatu v dávce 100 mg/kg na koncentraci stopových prvků v orgánech myši (v μg na gram vlhké váhy).

	Ca	Mg	Zn	Cu
JÁTRA				
Kontrola	27.4 ± 2.8	226 ± 6	23.6 ± 1.2	4.50 ± 0.85
Fe	26.6 ± 2.3	222 ± 8	22.3 ± 1.2	4.32 ± 0.99
Fe + Clodronat	26.3 ± 2.7	225 ± 8	23.3 ± 1.4	4.17 ± 0.69
Fe + Etidronat	29.2 ± 2.8	230 ± 4#	24.7 ± 1.6 ##	4.80 ± 0.63
Fe + Risedronat	28.5 ± 2.8	223 ± 18	23.6 ± 2.5	4.11 ± 0.95
LEDVINY				
Kontrola	41.2 ± 1.3	206 ± 10	17.2 ± 0.8	3.59 ± 0.25
Fe	41.3 ± 2.4	207 ± 15	16.8 ± 0.8	3.31 ± 0.12 *
Fe + Clodronat	41.5 ± 1.9	191 ± 11 *#	16.3 ± 0.8	3.39 ± 0.22
Fe + Etidronat	49.0 ± 2.4 ***###	227 ± 9 ***##	18.8 ± 0.6 ***###	4.03 ± 0.21 ***##
Fe + Risedronat	46.6 ± 1.7 ***###	208 ± 11	17.7 ± 0.7 #	3.78 ± 0.25 ###
MOZEK				
Kontrola	34.5 ± 1.9	145 ± 4	12.7 ± 0.6	2.60 ± 0.16
Fe	32.4 ± 1.7	138 ± 9	12.2 ± 0.8	2.59 ± 0.32
Fe + Clodronat	36.2 ± 9.2	135 ± 6 **	11.9 ± 0.5 **	2.41 ± 0.28
Fe + Etidronat	34.9 ± 7.7	135 ± 10 *	12.2 ± 0.4 *	2.51 ± 0.20
Fe + Risedronat	33.0 ± 1.0	134 ± 5 ***	12.0 ± 0.4 *	2.54 ± 0.12

Tabulka 5.6 - Pokračování

	Ca	Mg	Zn	Cu
SRDCE				
Kontrola	27.4 ± 3.4	213 ± 10	17.9 ± 1.2	5.60 ± 0.11
Fe	27.8 ± 3.9	220 ± 8	17.9 ± 1.0	5.63 ± 0.26
Fe + Clodronat	25.6 ± 2.8	208 ± 10 #	17.5 ± 1.3	5.46 ± 0.29 **
Fe + Etidronat	33.2 ± 8.9	256 ± 18 ***###	21.1 ± 1.2 ***###	6.56 ± 0.32 ***###
Fe + Risedronat	27.6 ± 1.8	235 ± 20 *	19.5 ± 1.4 *#	5.95 ± 0.34 *
SLEZINA				
Kontrola	26.1 ± 10.8	251 ± 8	17.1 ± 0.7	1.08 ± 0.18
Fe	46.8 ± 33.0	260 ± 19	16.9 ± 0.6	1.10 ± 0.14
Fe + Clodronat	32.4 ± 10.6	249 ± 13	16.5 ± 0.6	1.03 ± 0.11
Fe + Etidronat	34.1 ± 6.8	300 ± 14 ***###	20.4 ± 0.9 ***###	1.34 ± 0.16 *##
Fe + Risedronat	34.6 ± 4.6	260 ± 13	18.1 ± 0.9 *#	1.31 ± 0.23 *#
FEMUR				
Kontrola	104.5 ± 7.9	1.52 ± 0.14	81.9 ± 4.4	2.82 ± 0.19
Fe	93.8 ± 7.2 *	1.31 ± 0.14 *	77.5 ± 7.8	2.50 ± 0.18 **
Fe + Clodronat	91.4 ± 6.9 **	1.29 ± 0.13 **	73.2 ± 5.8	2.48 ± 0.14 **
Fe + Etidronat	134.7 ± 10.1 ***###	1.92 ± 0.26 ***###	99.9 ± 13.5 ***###	3.56 ± 0.31 ***###
Fe + Risedronat	107.9 ± 13.2 #	1.58 ± 0.18 ##	81.8 ± 9.8	2.93 ± 0.28 ##

Po podání síranu železnatého byla zvýšená koncentrace železa v játrech a slezině. Zatímco clodronat a etidronat neměly na zvýšenou koncentraci železa v těchto orgánech vliv, risedronat ještě výrazněji zvýšil koncentraci železa v játrech (ve srovnání se skupinou, které bylo aplikováno železo), ale neměl vliv na hladinu železa ve slezině. Kombinace železa s etidronatem nebo risedronatem vedla ke zvýšení koncentrace železa ve femuru, ledvinách a srdci, ačkoliv samotný síran železnatý hladinu železa ve zmíněných orgánech nezměnil. Kombinace železa s clodronatem, etidronatem nebo risedronatem snížila hladinu železa v mozku, ačkoliv samotný síran železnatý tuto hodnotu nezměnil.

Bisfosfonáty významně ovlivnily koncentrace stopových prvků ve vybraných orgánech. Podání risedronatu vrátilo železem snížené koncentrace vápníku, hořčíku a mědi ve femuru, a mědi v ledvinách na kontrolní hodnoty, zatímco podání etidronatu vedlo dokonce k vyšším koncentracím těchto prvků ve zmíněných orgánech než u kontrolní skupiny. Clodronat neměl na železem změněné koncentrace prvků ve femuru a v ledvinách vliv. Zdá se, že nejaktivnějším bisfosfonátem z hlediska změn stopových prvků ve vybraných orgánech byl etidronat, a zinek a hořčík byly nejvíce citlivé na působení bisfosfonátů.

6 DISKUSE

Jako model oxidačního stresu jsme v našich pokusech použili intraperitoneální aplikaci železa ve formě síranu železnatého v dávce 10 mg po dobu tří dnů nebo zvýšený přísun železa v dietě (860 mg železa na kilogram diety) po dobu čtyř týdnů. V obou případech železo vyvolalo oxidační stres. Především docházelo k indukci lipoperoxidace v játrech. V několika případech jsme také pozorovali pokles hladiny redukovaného glutationu a sníženou aktivitu superoxid dismutázy po intraperitoneální aplikaci železa. Naopak zvýšený přísun železa v dietě měl na hladinu redukovaného glutationu opačný vliv a podobný výsledek, tedy zvýšenou hladinu redukovaného glutationu, jsme pozorovali v jednom případě i po aplikaci železa intraperitoneálně. Aktivita katalázy byla snížena jen pokud bylo železo podáváno v dietě. Nepozorovali jsme vliv podání železa na aktivitu glutation peroxidázy. Naopak dieta s nižším obsahem železa aktivitu glutation peroxidázy mírně snížila a také hladina redukovaného glutationu byla u této skupiny nižší.

Po aplikaci železa intraperitoneálně se zvýšily jeho koncentrace především v játrech a ve slezině. V některých případech jsme pozorovali také akumulaci železa v ledvinách a srdci. V játrech a ledvinách se hromadilo železo i po zvýšeném přísunu dietou, kdy jsme sledovali nárůst jeho koncentrace také ve varlotech a mírně v mozku.

Vliv železa na koncentraci ostatních stopových prvků ve vybraných orgánech byl různorodý v závislosti na způsobu podání a nelze odvodit jednoduché obecné pravidlo, které by charakterizovalo působení železa na hladinu stopových prvků. Přesto jsme sledovali spíše pokles obsahu hořčíku, mědi a zinku po aplikaci železa ať už intraperitoneálně nebo v dietě. Dieta se sníženým obsahem železa hladinu zinku a mědi zvýšila. Dále jsme mohli sledovat určitou korelaci mezi hladinou železa a vápníku v játrech a slezině, kdy zvýšená koncentrace železa v těchto orgánech byla spojena i s větším obsahem vápníku. Vliv zvýšeného příjmu železa na depleci zinku byl popsán (Valko et al, 2005).

V našich pokusech jsme pozorovali jak antioxidantní, tak prooxidantní účinek quercetinu v závislosti na dávce a délce podávání. Dávka 8.5 mg po dobu 21 nebo šesti dnů vedla k nárůstu lipoperoxidace v játrech. Avšak dávka 4.25 mg po dobu 49 dní lipoperoxidaci v játrech naopak snížila. Nicméně quercetin v žádné podané dávce neovlivnil železem indukovanou lipoperoxidaci. Antioxidantní a prooxidantní účinky quercetinu v závislosti na dávce byly popsány v dalších studiích (Stadler et al, 1995; Sahu a Washington, 1991).

Hladina redukováného glutationu byla snížena po podání 8.5 mg quercetinu po dobu 21 dní. Na druhou stranu jsme pozorovali, jak železem snížená hladina redukováného glutationu byla srovnána ke kontrolní skupině po přidání stejné dávky quercetinu po dobu tří dnů.

Nejnižší zkoušená dávka quercetinu (4.25 mg) po dobu 7 týdnů zvýšila aktivitu glutathion peroxidázy. Nepozorovali jsme vliv quercetinu na aktivitu superoxid dismutázy nebo katalázy. Avšak dávka 8.5 mg po dobu šesti dnů spolu se železem vedla k snížení aktivity katalázy.

Několik publikací uvádí chelatační vlastnosti *in vitro* a jejich význam v antioxidantním působení quercetinu (Afanas'ev et al, 1989; Morel et al, 1993 a Sestili et al, 1998). V našich pokusech jsme pouze jednou pozorovali mírné snížení nahromaděného železa v játrech quercetinem. Nicméně lipoperoxidace indukovaná železem zůstala i zde neovlivněna quercetinem a quercetin neovlivnil koncentraci železa v ostatních orgánech.

Quercetin velmi mírně zasáhl do koncentrace hořčíku v játrech a mozku, a zinku v ledvinách. Na rozdíl od některých studií (Kuo et al, 1998 a Sugihara et al, 1999) jsme nepozorovali interakce mezi železem a mědí.

Výsledky našich pokusů *in vivo* se poněkud rozcházejí s charakteristikou quercetinu jako významného antioxidanta a látky s chelatačními vlastnostmi (Afanas'ev et al, 1989; Morel et al, 1993; Sestili et al, 1998 aj.). Quercetin neměl vliv na železem vyvolaný oxidační stres, s výjimkou pozitivního účinku na železem snížené hladiny redukováného glutationu. Působení samotného quercetinu je však závislé na dávce, kdy vyšší dávky mají prooxidantní účinek (indukce lipoperoxidace), zatímco nižší dávky lipoperoxidaci snižují a také zvyšují aktivitu glutathion peroxidázy. Takováto závislost účinku na dávce byla několikrát popsána (Stadler et al, 1995; Sahu a Washington, 1991).

V našich pokusech jsme sledovali jak antioxidantní tak prooxidantní účinek silibininu a tento účinek byl závislý na dávce podáváného silibininu. Silibinin v dávce 48 mg po dobu deseti dní výrazně indukoval lipoperoxidaci v játrech. Tato indukce byla menší po podání 12 mg silibininu po dobu 21 dní a teprve dávka 6 mg po dobu 49 dní nezměnila míru lipoperoxidace v játrech. Navíc silibinin ještě více prohloubil železem indukovanou lipoperoxidaci. Tyto výsledky nepodporují publikované vlastnosti silibininu jako antioxidantní látky (Psotova et al, 2002; Bhattacharya et al, 2000; Basaga et al, 1997).

Účinek silibininu na hladinu redukováného glutationu byl méně výrazný než na lipoperoxidaci. Pouze nejvyšší dávka (48 mg) po dobu deseti dní snížila hladiny redukováného glutationu. Na druhou stranu jsme pozorovali, že dávka 12 mg po dobu tří dní vrátila železem sníženou hladinu redukováného glutationu na kontrolní hodnoty, což naznačuje protektivní antioxidantní účinek silibininu publikovaný v několika pracích (Basaga et al, 1997; Mira et al, 1994).

V našich pokusech jsme nepozorovali vliv silibininu na aktivitu katalázy a glutathion peroxidázy. Ani aktivita superoxid dismutázy snížená po podání železa nereagovala na silibinin.

Předpokládá se, že antioxidantní účinek silibininu spočívá ve schopnosti vychytávat volné radikály (Psotova et al, 2002), ačkoliv v několika pracích silibinin snížil oxidační poškození vyvolané železem (Bhattacharya et al, 2000) a vysoká afinita silibininu k železu byla také doložena (Borsari et al, 2001). V našich pokusech pouze nejvyšší dávka silibininu 48 mg podávaná deset dní zvýšila koncentraci železa v ledvinách. V ostatních pokusech jsme nesledovali vliv silibininu na koncentraci železa v orgánech ani po aplikaci síranu železnatého.

Silibinin mírně zvýšil koncentraci zinku a mědi v játrech, snížil koncentraci mědi v ledvinách a mozku, a hořčíku v mozku a srdci.

Výsledky našich pokusů *in vivo* ukazují význam dávky silibininu na jeho účinky. Vyšší dávky působily výrazně oxidačně, zatímco nízké nezpůsobovaly oxidační stres, i když výrazné antioxidantní účinky silibininu v souvislosti se železem se nám také nepodařilo prokázat. To se rozchází s výsledky jiných studií *in vivo* (Pietrangelo et al, 1995 a 2002), ve kterých autoři pozorovali protektivní účinek silibininu proti poškození způsobenému železem u potkanů a tarbiků, a ve kterých byla použita dávka 100 mg silibininu, čili nesporně vyšší než dávka, která v našich pokusech měla prooxidantní účinek.

V části studující antioxidantní účinky bisfosfonátů na oxidační stres vyvolaný podáním železa jsme zjistili, že lipoperoxidace indukovaná železem byla výrazně snížena všemi třemi bisfosfonáty. V případě clodronatu se tento parametr dokonce srovnal s kontrolními hodnotami. Dalším pozitivním účinkem bisfosfonátů byl vliv na hladinu redukováného glutationu, která sice nebyla ovlivněna podáním železa, ale byla významně vyšší po podání bisfosfonátů.

Sporná je role chelatačních vlastností bisfosfonátů v jejich antioxidačním působení. Clodronat a etidronat snížily lipoperoxidaci v játrech, ale neměly vliv na zvýšenou koncentraci železa v tomto orgánu. Na druhou stranu risedronat obsah železa v játrech zvýšil. Navíc jeho vliv na lipoperoxidaci byl ze všech tří bisfosfonátů nejnižší. Zdá se ale, že alespoň v případě etidronatu a risedronatu jsme určitě chelatační vlastnosti prokázali, jak dokládají zvýšené koncentrace železa v ledvinách, srdci a femuru. Afinitu bisfosfonátů k železu dokládá několik studií (Daley-Yates et al, 1992 a Kuljanin et al, 2002). Na druhou stranu Osterman et al, 1994 uvádí, že současné podání železa perorálně vede ke sníženému vstřebávání clodronatu, který v našich pokusech neměl na hladinu železa v orgánech vliv. Jistou výjimkou byl mozek, ve kterém podání všech tří bisfosfonátů vedlo k velmi mírnému snížení koncentrace železa.

Lze tedy odvodit, že bisfosfonáty působí antioxidačně, avšak mechanismus jejich antioxidačního účinku zřejmě nespočívá pouze v chelataci (Dombrecht et al, 2003), ale další možnosti jako inhibice akumulace superoxidového aniontu (Tanahashi et al, 1998) nebo námi prokázané zvýšení hladin redukovaného glutationu přicházejí v úvahu.

V našem modelu *in vivo* jsme nepozorovali účinek bisfosfonátů na aktivitu katalázy nebo glutation peroxidázy. Nicméně ani podání železa nemělo na aktivitu těchto enzymů vliv.

Sledováním hladin stopových prvků ve vybraných orgánech jsme zjistili, že bisfosfonáty vykazují afinitu i k dalším kovům. Nejvíce ovlivněným prvkem byl v našich pokusech zinek. Jeho hladina po podání například etidronatu byla významně zvýšená v játrech, ledvinách, srdci, femuru a slezině. O chelataci zinku se zmiňuje ve své studii i Clézardin et al, 2003, když předpokládá, že bisfosfonáty inhibovaná aktivita metaloproteináz by mohla být částečně způsobena chelatací zinku, který je součástí těchto enzymů. Bisfosfonáty dále významně ovlivnily železem snížené koncentrace vápníku, hořčíku a mědi ve femuru, a mědi v ledvinách. Afinita bisfosfonátů nejen ke stopovým prvkům ale i k těžkým kovům jako je olovo byla popsána (Aaseth et al, 1999).

7 SHRNUÍ

7.1 ŽELEZO

Železo aplikované intraperitoneálně nebo jeho zvýšený obsah v dietě vyvolal u myši oxidační stres (zvýšená lipoperoxidace, v jednotlivých případech nižší hladina redukovaného glutationu a snížená aktivita superoxid dismutázy a glutation peroxidázy).

Různý obsah železa v dietě ovlivnil oxidační účinky kadmia, které byly výraznější u zvířat krmených dietou se zvýšeným obsahem železa (zvýrazněná lipoperoxidace).

7.2 QUERCETIN

V závislosti na dávce byl prokázán jak antioxidační, tak prooxidační účinek quercetinu u myši.

Vysoké dávky způsobily oxidační poškození (indukce lipoperoxidace a pokles redukovaného glutationu), zatímco nízké dávky podávané dlouhodobě působily antioxidačně (nižší lipoperoxidace, zvýšená aktivita glutation peroxidázy).

Quercetin neměl výrazný vliv na oxidační stres navozený podáním železa, kromě úpravy železem snížené hladiny redukovaného glutationu. Snížení kumulace železa v játrech podporuje chelatační vlastnosti quercetinu.

7.3 SILIBININ

U silibininu byl prokázán převládající prooxidační účinek v závislosti na dávce v pokusech na myších.

Tento účinek byl charakterizován indukcí lipoperoxidace a snížením redukovaného glutationu.

Silibinin prohloubil lipoperoxidaci navozenou podáním železa a neměl vliv na jeho distribuci v organismu.

Jistý antioxidační účinek silibininu byl pozorován (úprava železem snížené hladiny redukovaného glutationu).

7.3 BISFOSFONÁTY

Testované bisfosfonáty prokázaly v pokusu na myších antioxidační působení proti železem vyvolanému oxidačnímu stresu (snížení lipoperoxidace indukované železem, zvýšení redukovaného glutationu).

Testované bisfosfonáty v různé míře ovlivnily distribuci železa, ale i ostatních stopových prvků v organismu.

PŘEHLED PUBLIKACÍ SE VZTAHEM K PROBLEMATICE:

Práce in extenso:

Kolek M., Kotyzová D, Eybl V.: Interaction of quercetin and silibinin with iron in experiment on mice. *Biomarkers and Environment* 2003; Supplement 1: 68-71.

Kolek M., Kotyzová D., Lešetický L., Eybl V.: The effect of dietary iron supplementation or restriction on cadmium-induced oxidative damage and trace element changes in mice. *Macro and Trace Elements, Mengen- und Spurenelemente – First Volume* – p.:888-893. 22nd Workshop – September, 24th and 25th 2004, Friedrich Schiller University Jena.

Kolek M., Kotyzová D., Eybl V.: The influence of silibinin on oxidative state and trace elements content in tissues of mice. *Biomarkers and Environment* 2004; 5(5):31-34.

Abstrakta:

Kolek M., Kotyzová D, Eybl V.: Interakce přírodních antioxidačních látek se železem v pokusu na myších. *Československá fyziologie* 2003; 52(4): A11.

Kolek M., Kotyzová D., Eybl V.: The influence of silibinin on oxidative state and trace elements content in tissues of mice. *Biomarkers and Environment* 2004; 8(2):53

Kolek M., Kotyzová D., Eybl V.: Vliv quercetinu na antioxidační systém a hladinu stopových prvků v pokusu na myších. *Sborník abstrakt, České Budějovice 8.-10.zář 2004. Folia PHOENIX, Supplementum 1/2005, str. 22.* 54th Czech and Slovak Annual Convention of Pharmacology

LITERATURA

Aaseth JA, Alexander J, Kotyzová D, Koutenský J, Míčková V, Eybl V., Effects of a bisphosphonate (sodium etidronate) on lead, cadmium and trace element levels in mice. *Toxicol Lett.* 1999;109(1)

Aebi H., Catalase. In: *Methods of enzymatic analysis.* H. U. Bergmeyer. Academic Press, Inc. New York 1972; 2: 673-84

Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovich AI., Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1989 Jun 1; 38 (11): 1763-9

Aherne SA, O'Brien NM., Mechanism of protection by flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadione-induced DNA single strand breaks in Caco-2 cells. *Free Radic Biol Med* 2000 Sep 15; 29 (6): 507-14

Arora A, Nair MG, Strasburg GM., Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in liposomal system. *Free Radic Biol Med* 1998 Jun; 24 (9): 1355-63

Bal W, Kasprzak KS., Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. *Toxicol Lett* 2002 Feb 28; 127 (1-3): 55-62

Basaga H, Poli G, Tekkaya C, Aras I., Free radical scavenging and antioxidant properties of silibinin complexes on microsomal lipid peroxidation. *Cell Biochem Funct* 1997 Mar; 15 (1): 27-33

Bhattacharya A, Ramanathan M, Ghosal S, Bhattacharya SK., Effect of *Withania somnifera* glycowithanolides on iron-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res* 2000 Nov; 14 (7): 568-70

Borsari M, Gabbi C, Ghelfi F, Grandi R, Saladini M, Severi S, Borella F., Silybin, a new iron-chelating agent. *J Inorg Biochem* 2001 Jun; 85 (2-3): 123-9

Burda S, Oleszek W., Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem* 2001 Jun; 49 (6): 2774-9

Cao G, Sofic E, Prior RL., Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997; 22 (5): 749-60

Casalino E, Sblano C, Landriscina C., Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1997 Oct 15; 346 (2): 171-9

Cheng IF, Breen K., On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals* 2000 Mar; 13 (1): 77-83

Cholbi MR, Paya M, Alcaraz MJ., Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl4-induced microsomal lipid peroxidation. *Experientia* 1991 Feb 15; 47 (2): 195-9

Clézardin P, Fournier P, Boissier S, Peyruchaud O., In vitro and in vivo antitumor effects of bisphosphonates. *Curr Med Chem* 2003 Jan; 10 (2): 173-80

Cohen AR, Galanello R, Pennell DJ, Cunningham MJ, Vichinsky E., Thalassemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2004;14-34

Daley-Yates PT, Cal JC, Cockshott A, Pongchaidecha M, Gilchrist K., Plasma protein binding of APD: role of calcium and transferrin. *Chem Biol Interact* 1992 Jan; 81 (1-2): 79-89

Diav-Citrin O, Koren G., Oral iron chelation with deferiprone. *Pediatr Clin North Am* 1997 Feb; 44 (1): 235-47

Dombrecht EJ, Cos P, Vanden Berghe D, Van Offel JF, Schuerwegh AJ, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS., Selective in vitro antioxidant properties of bisphosphonates. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 Feb 13; 314 (3): 675-80

Dugas AJ Jr, Castaneda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW., Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J Nat Prod* 2000 Mar; 63 (3): 327-31

Eybl V, Caisová D, Koutenský J, Kontoghiorghes KG., Effect of chelators on cadmium induced lipid peroxidation and GSH level in the liver tissue of mice. *Plz Lek Sborn* 1996; 71, 81-85

Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M., Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett* 1997 Oct 20; 416 (2): 123-9

Fraga CG, Oteiza PI., Iron toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2002 Oct 30; 180 (1): 23-32.

Galey JB., Potential use of iron chelators against oxidative damage. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 167-203

Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H., Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochim Biophys Acta* 1999 Nov 16; 1472 (3): 643-50

Günzler VA, Kremers H, Flohe L., An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9.) in blood. *Klin Chem Biochem* 1974 Oct; 12 (10): 444-8

Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A., Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Jul 30; 236 (3): 591-3

Halliwell B, Gutteridge JMC., Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-936

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ., Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002 Oct; 13 (10): 572-584

Hirayama K, Yasutake., Free radicals and trace elements. *J Trace Elem in Exp Med.* 1998; 11: 209-17

Hollman PCH., Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects. *J Sci Food Agric* 2001; 81: 842-52

Kljuchnikov S, Pitkanen O, Raivio KO, Andersson S., Haemolysis in adult and neonatal erythrocytes caused by autoxidation of lipid emulsion (Intralipid). *Acta Paediatr* 1993 Apr; 82 (4): 348-51

Kostyuk VA, Potapovich AI, Vladkovskaya EN, Korkina LG, Afanas'ev IB., Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Arch Biochem Biophys* 2001 Jan 1; 385 (1): 129-37

Kris-Etherton P, Keen CL., Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. *Curr Opin Lipidol* 2002 Feb; 13 (1): 41-9

Kuljanin J, Janković I, Nedeljković J, Prstojević D, Marinković V., Spectrophotometric determination of alendronate in pharmaceutical Casalino E,

formulations via complex formation with Fe(III) ions. *J Pharm Biomed Anal* 2002 Jun 15; 28 (6): 1215-20

Kuo SM, Leavitt PS, Lin CP., Dietary flavonoids interact with trace metals and affect metallothionein level in human intestinal cells. *Biol Trace Elem Res* 1998 Jun; 62 (3): 135-53

Mira L, Silva M, Manso CF., Scavenging of reactive oxygen species by silybinin dihemisuccinate. *Biochem Pharmacol* 1994 Aug 17; 48 (4): 753-9

Monkkonen J, Urtti A, Paronen P, Elo HA, Ylitalo P., The uptake of clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) by macrophages in vivo and in vitro. *Drug Metab Dispos* 1989 Nov-Dec; 17 (6): 690-3

Monkkonen J, Van Rooijen N, Ylitalo P., Effects of clodronate and pamidronate on splenic and hepatic phagocytic cells of mice. *Pharmacol Toxicol* 1991 Apr; 68 (4): 284-6

Mora A, Paya M, Rios JL, Alcaraz MJ., Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1990 Aug 15; 40 (4): 793-7

Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J., Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol* 1993 Jan 7; 45 (1): 13-9

Nunez MT, Osorio A, Tapia V, Vergara A, Mura CV., Iron-induced oxidative stress up-regulates calreticulin levels in intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Cell Biochem* 2001; 82 (4): 660-5

Olivieri NF, Brittenham GM., Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. *Blood* 1997 Feb 1; 89 (3): 739-61

Osterman T, Juhakoski A, Lauren L, Sellman R., Effect of iron on the absorption and distribution of clodronate after oral administration in rats. *Pharmacol Toxicol* 1994 Apr-May; 74 (4-5): 267-70

Pietrangelo A, Borella F, Casalgrandi G, Montosi G, Ceccarelli D, Gallesi D, Giovannini F, Gasparetto A, Masini A., Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology* 1995 Dec; 109 (6): 1941-9

Pietrangelo A, Montosi G, Garuti C, Contri M, Giovannini F, Ceccarelli D, Masini A., Iron-induced oxidant stress in nonparenchymal liver cells: Mitochondrial derangement and fibrosis in acutely iron-dosed gerbils and its prevention by silybin. *J Bioenerg Biomembr* 2002 Feb; 34 (1): 67-79

Psotova J, Chlopcikova S, Grambal F, Simanek V, Ulrichova J., Influence of silymarin and its flavonoids on doxorubicin-iron induced lipid peroxidation in rats heart microsomes and mitochondria in comparison with quercetin. *Phytother Res* 2002 Mar; 16 Suppl 1: S63-7

Ratty AK, Das NP., Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure activity relationship. *Biochem Med Metab Biol* 1988 Feb; 39 (1): 69-79

Richardson DR, Ponka P., Development of iron chelators to treat iron overload disease and their use as experimental tools to probe intracellular iron metabolism. *Am J Hematol* 1998 Aug; 58 (4): 299-305

Sahu SC, Washington MC., Quercetin-induced lipid peroxidation and DNA damage in isolated rat-liver nuclei. *Cancer Lett* 1991 Jun 14; 58 (1-2): 75-9

Sedlak J, Lindsay RH., Estimation of total, proteinbound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analyt Biochem* 1968 Oct; 25 (1): 192-205

Sekher Pannala A, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans CA., Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Apr 20; 282 (5): 1161-8

Sestili P, Guidarelli A, Dacha M, Cantoni O., Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Radic Biol Med* 1998 Jul 15; 25 (2): 196-200

Stadler RH, Markovic J, Turesky RJ., In vitro anti- and pro-oxidative effects of natural polyphenols. *Biol Trace Elem Res* 1995 Jan-Mar; 47 (1-3): 299-305

Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K., Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linoleic acid. *Free Radic Biol Med* 1999 Dec; 27 (11-12): 1313-23

Tanahashi M, Funaba Y, Tateishi A, Kawabe N, Nakadate-Matsushita T., TRK-530 inhibits accumulation of superoxide anions derived from human polymorphonuclear leucocytes and bone resorption induced by activated osteoclasts. *Pharmacology* 1998 Mar; 56 (3): 125-30

Uchiyama M, Mihara M., Determination of malondialdehyde precursors in tissues by thiobarbituric acid test. *Analyt Biochem* 1978 May; 86 (1): 271-8

Voskaridou E, Terpos E., New insights into the pathophysiology and management of osteoporosis in patients with beta thalassaemia. *Br J Haematol* 2004 Oct; 127 (2): 127-39

Valko M, Morris H, Cronin MTD., Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005; 12 (10): 1161-208.

Vyskočil V, Kutílek Š., Bisfosfonáty u metabolických onemocnění skeletu. *Remedia* 2004; 14 (1): 75-80

Zima T, Štípek S, Tesař V, Pláteník J, Crkovská J., Volné radikály - reaktivní formy kyslíku, antioxidační látky a antioxidační terapie. *Remedia* 1996; 6 (1): 35-58

SUMMARY:

Iron is an essential element for living organisms. However, as it is a transition metal, it can participate in Fenton reaction resulting in generation of free radicals and oxidative damage to tissues. Antioxidants may prevent possible iron toxicity by chelating free iron or scavenging free radicals.

Falvonoids are naturally occurring substances that are capable of formation of complexes with metals, including iron. They have been show to possess antioxidant activity, which depends on molecular complexity of numerous types of flavonoids, e.g. quercetin and silibinin.

Bisphosphonates are synthetic drugs used to treat various metabolic diseases of bones. Their principal effect is an inhibition of osteoclast activity leading to a decreased bone resorption. Bisphosphonates have been however shown to exert some antioxidant activity in *in vitro* experiments, too.

The aim of this PhD thesis was to investigate the role of iron in toxicity of other metals (cadmium) and the effect of flavonoids (quercetin and silibinin) and bisphosphonates (clodronate, etidronate and risedronate) on iron-induced oxidative damage *in vivo*.

Experiments were performed in male mice (CD-1, Charles River, 25-35 body weight). Iron was administered intraperitoneally or in the diet. Cadmium was administered subcutaneously. Flavonoids and bisphosphonates were administered orally. The level of lipoperoxidation, the content of glutathione in the liver and activities of catalase and glutathione peroxidase in the liver, and superoxide dismutase in erythrocytes were measured. Tissue content of cadmium, iron and trace elements was also evaluated.

Iron administration induced oxidative damage to tissues (increased lipoperoxidation and, in some cases, decreased glutathione level, decreased activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase). Diets with different content of iron influenced oxidative effects of cadmium (a pronounced lipoperoxidation by cadmium in animals fed diet with high iron content).

Both anti- and pro-oxidative effect of quercetin in dependence on the dose was shown. High doses led to oxidative damage (lipoperoxidation induction and decreased glutathione levels), whereas lower dose administered for a long period (7 weeks) had antioxidative effect (lower lipoperoxidation and increased activity of glutathione peroxidase). The influence of quercetin on iron-induced oxidative damage was low, if any. A positive effect on iron-decreased glutathione level was observed. A decrease in iron accumulation in the liver after quercetin administration may support chelating properties of quercetin.

Predominantly pro-oxidative activity of silibinin characterised by induced lipoperoxidation and decreased glutathione level was observed. Moreover, iron-induced lipoperoxidation was further increased by silibinin. Silibinin did not affect iron distribution in mice. A certain antioxidative effect of silibinin was demonstrated, however (a positive effect on iron-decreased glutathione level).

Bisphosphonates were shown to have antioxidant activity against iron-induced oxidative damage (decreased iron-induced lipoperoxidation and higher glutathione level). All bisphosphonates had significant effect on distribution of iron and other trace elements