

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

OXIDAČNÍ STRES NAVOZENÝ ŽELEZEM A JEHO OVLIVNĚNÍ  
FLAVONOIDY A BISFOSFONÁTY

DOKTORSKÁ DIZERTAČNÍ PRÁCE

Vypracoval: MUDr. Metoděj Koleček  
Školitel: Prof. MUDr. Vladislav Eybl, DrSc.

Plzeň 2005

Podkování:

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

Podkování patří také Ing. Daně Kotyzové za rady a pomoc v experimentálních a analytických otázkách, a zejména 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 podkování ostatním spolupracovníkům za vynikající pracovní prostředí a všem mým blízkým za podporu a vytrvalost.

Tato práce byla ešena v rámci grant GA R 305/02/1231 a 305/05/0344.  
Výsledky práce byly pr b žn publikovány:

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 stat and trace elements content in tissues of mice. *Biomarkers and Environment* 2004; 5(5):31-34.

Abstrakta:

Kolek M., Kotyzová D., Eybl V.: Interakce p írodních antioxida ních látek se železem v pokusu na myších. *eskoslovenská fyziologie* 2003; 52(4): A11.

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

Kolek M., Kotyzová D., Eybl V.: Vliv quercetinu na antioxida ní systém a hladinu stopových prvk v pokusu na myších. Sborník abstrakt, eské Bud jovice 8.-10.zá í 2004. *Folia PHOENIX, Supplementum 1/2005*, str. 22. 54th Czech and Slovák Annual Convention of Pharmacology.

## **OBSAH:**

1 ÚVOD.....	2
2 SOU ASNÝ STAV PROBLEMATIKY.....	3
2.1 Železo a oxida ní stres.....	3
2.2 Flavonoidy.....	8
2.3 Bisfosfonáty.....	18
3 CÍL PRÁCE.....	23
4 METODY A MATERIÁLY.....	24
5 VÝSLEDKY.....	27
5.1 Vliv r zného množství železa v diet na toxicitu kadmia.....	27
5.2 Vliv quercetinu na oxida ní stres.....	35
5.3 Vliv silibininu na oxida ní stres.....	49
5.4 Vliv bisfosfonát na oxida ní stres.....	61
6 DISKUSE.....	73
7 SHRNU TÍ.....	78
8 LITERATURA.....	80

## 1 ÚVOD

V posledních letech desetiletích jsou volné kyslíkové radikály intenzivně studovány ve vztahu k ad onemocn ní. Jsou popsána onemocn ní ze všech lékařských obor , v jejichž patogenezi a progresi se předpokládá významná ú ast volných radikál . První studie vkládaly do radikálových reakcí nad ji, že se jedná o specifický patogenetický d j, ale v tomto ohledu je spíš na místě skepse, protože p sobení volných radikál v lidském t le je obecný mechanismus.

Radikály provázejí lidské t lo od jeho narození po smrt. Jejich patogenetický ú inek - oxida ní stres bun k a tkání - nastává ve dvou situacích:

1. p i jejich zvýšené tvorby
2. p i nedostate né antioxida ní ochran organismu

Významná ú ast oxida ního stresu se předpokládá například u diabetu, aterosklerózy nebo p i ischemicko-reperfučním poškození. Také mechanismus poškození p i otravách t žkými kovy se vysv tluje oxida ním stresem (Zima et al, 1996; Hirayama a Yasutake, 1998).

Lidský organismus je k inaktivaci volných radikál a reparaci vzniklého poškození vybaven antioxida ními systémy. Tyto systémy se rozdují na antioxida ní enzymy jako jsou superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza a kataláza, a antioxida ní substráty jako například tokoferoly, karotenoidy, kyselina askorbová, glutathion, tioly a transferin.

## 2 SOUASNÝ 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 důležitě pro vazbu kyslíku jak v červených krvinkách, tak v myoglobinu, nebo pro funkci enzymů jako jsou například cytochrom P450, peroxidáza, kataláza, cyklooxygenáza a ribonukleotid reductáza (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 stav spojených s hromaděním železa v organismu se tedy řádně 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 ferritin 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 volné jako nevázané, nebo volně vázané železo. (Fraga a Oteiza, 2002). Průměrný denní příjem železa u člověka je 1 až 3 mg. Podobně 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, glykoprotein s dvěma místy vysoké afinity k železitým iontům. Za normálních okolností je transferin nasycen pouze ze 20 až 30%

a koncentrace volných železitých iontů v plazmě je tedy velmi nízká. Buky, které potěbují železo, nesou na svém povrchu transferinový receptor. Po vstupu do buky se železo redukuje a jako železnatý ion je vázán feritinem a zpětně oxidován (Galey, 1997).

U savců se vyvinuly genetické navzájem propojené mechanismy regulace metabolismu železa, které předcházejí možným poruchám zdraví na základě jak nedostatku, tak hromadění železa v organismu. Nedostatek železa je velmi rozšířený stav, který postihuje přibližně 500 milión lidí na světě. Jeho následky se mohou rozšířit od anémie až po mentální retardaci u dětí (Fraga a Oteiza, 2002).

Kumulace železa v organismu je méně rozšířenou poruchou. Vysoký obsah železa je ovšem spojen s několika patologickými stavy jako jsou onemocnění jater a srdce (Rasmussen et al, 2001; Milman et al, 2001; Yang et al, 1998), nádorová onemocnění (Beckman et al, 1999; Parkkila et al, 2001), neurodegenerativní poruchy (Sayre et al, 2000; Berg et al, 2001), diabetes (Ellervik et al, 2001; Parkkila et al, 2001; Perez de Nanclares, 2000), hormonální poruchy (Wilkinson, 1996) a poruchy imunitního systému (Li et al, 2000; Walker a Walker, 2000).

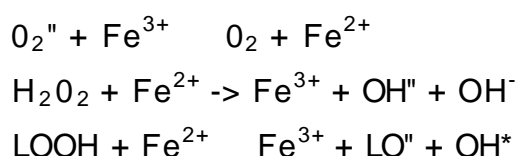
K chronické kumulaci železa může docházet při:

1. primární hemochromatóze (genetická porucha s následkem zvýšeného vstřebávání železa ze stravy)
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

Rozsáhlé, volnými radikály způsobené poškození tkání je považováno za hlavní mechanismus náhodných otrav a vzniku určitých chronických chorob. 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 iont může katalyzovat rozklad peroxidu 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 peroxidu

Železem katalyzované reakce *in vivo* jsou díky zanedbatelné dostupnosti „volného“ katalytického železa omezené. Zvýšená produkce superoxidového aniontu může nicméně usnadňovat uvolnění 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. V aerobních organismech probíhají škodlivé oxidační procesy způsobené volnými radikály jako výsledek normálního metabolismu kyslíku. Protože železo je schopné spustit oxidaci jednak redukcí a jednak rozkladem vzniklých peroxidů,



antioxidans, ktoré zabrauje toxickým účinkom železa, je látka, ktorá je schopna:

1. tvoriť s železom cheláty a brániť reakcii s kyslíkom a peroxidom
2. väzať železo a udržiavať je v takovom redoxnom stave, v ktorom není schopno redukovať molekulárny kyslík
3. vylučovať už vzniklé radikály

Obrovské množstvo látok je schopno väzať železo a mnoho z nich se vyskytuje v biologických systémoch. Proteíny, ktoré se úastní metabolizmu železa, môžu izolovať železo a tým zabrániť reakciám, ktorých výsledkom je vznik voľných radikálov. Feritín, transferrín a niekoľko enzýmov obsahujúcich železo, ako kataláza, udržiavajú železo v trojmocnom stave, ktorý není tak reaktívny, aby mohl iniciovať a/alebo ďalej rozvíjať reakciu voľných radikálov. Niekoľko ďalších látok, ako prírodných, tak syntetických, je schopno väzať železo *in vivo* a obmedzovať jeho úast v reakciách s voľnými radikálmi (Fraga a Oteiza, 2002).

#### 2.1.5 Thalasemia majora látka väzajúca železo v klinickej praxi

Jednou z príčin zvýšeného množstva železa v organizme jsou úastné krvné transfúzie u niektorých typov anémií. Príkladom takejto anémie je thalasemia majora, hereditárna hemoglobínopatia spôsobená neschopnosťou erytroblastov syntetizovať z beta hemoglobínu dospelého jedinca. Léba tejto nemoci je komplexná a spočíva v pravidelných transfúziách vedúcich k akumulácii železa v organizme, vyžadujúca podávanie chelátora železa. Pretože transfúzie a chelátorná terapia významne predlžujú život pacienta s thalasemia majora, kardiomyopatie spôsobená nahromadením železa v srdci zstávajú stále nejúastejšou príčinou smrti u týchto pacientov (Cohen et al, 2004). Medzi ďalšími sekundárnymi patofyziologickými stavmi provádzajúcimi toto ochorenie patívajú vírusová hepatitída C, zvýšené riziko trombózy, endokrinné ochorenie a osteoporóza (Cohen et al, 2004; Voskaridou a Terpos, 2004).

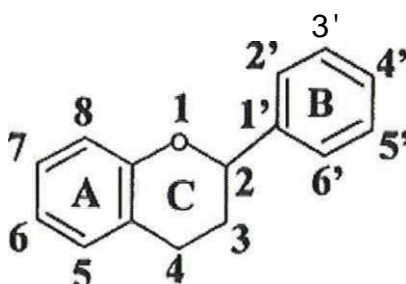
V súčasnosti je jediným chelátorm železa rozšíreným v klinickej praxi deferoxamín. Tento lék má ovšem mnoho nevýhod, napríklad vysoká cena, nutnosť

podávat ho v dlouho trvajících podkožních infuzích a nízká vstřebatelnost ze stěvy (Richardson a Ponka, 1998). Slibným perorálně aktivním chelátorem železa je deferipron (L1), který vykazuje vysokou afinitu k železu (Diav-Citrin a Ko en, 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). Výsledky jiné studie naznačují, že L1 má výraznější kardioprotektivní účinek než deferoxamin (Piga et al, 2003). Další chelátory 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 a které mohou živočišné organismy přijímat v potravě. V současné době bylo identifikováno přes 4 000 flavonoidů. Tyto látky chrání rostliny před ultrafialovým zářením, patogeny a býložravci. Pro člověka je zdrojem flavonoidů čaj, červené víno, šávele z červených hroznů, kakaové výrobky, jablka, cibule a některé ořechy. Tyto látky hrají dvojí roli ve snižování oxidací pochopitelně, protože mohou jednak vázat železo, a jednak vychytávat volné radikály (Heim et al, 2002).



*Struktura flavonoidů: Flavonoidy se vyznačují uspořádáním hydroxylových skupin, konjugací mezi aromatickými kruhy, glykosidickými zbytky a methoxyskupinami. Polymerizací základní struktury vznikají taniny a další komplexní sloučeniny, které se vyskytují v červeném víně, hroznovém víně a černém čaji.*

Flavonoidy jsou deriváty benzo- $\gamma$ -pyronu a skládají se z fenolového a pyranového kruhu. Jsou klasifikovány podle typu substitucí na základním flavanovém jádru. Flavonoidy ve stravě se liší uspořádáním hydroxylových

a methoxyskupin, postranních glykosidických skupin, a v konjugaci mezi kruhy A a B. B hem metabolismu mohou být hydroxylové skupiny přidávány nebo metylovány, dochází ke konjugaci se sírany nebo kyselinou glukuronovou. Flavonoidy se v potravě vyskytují primárně jako 3-O-glykosidy nebo polymery (Hammerstone et al, 2000). Existuje několik typů vyšších struktur a polymery tvoří značnou část potravinou přijímaných flavonoidů. Podle uspořádání různých substituentních skupin na flavanovém jádru se flavonoidy klasifikují do několika tříd. Příkladem jsou flavonoly (quercetin), flavony (rutin), flavanoly ((+)-katechin), flavanony (naringin), isoflavony (genistin) a anthocyanidiny (cyanidin) (Heim et al, 2002).

Vedle struktury a chemickofyzikálních vlastností dané sloučeniny jsou pro biologické účinky v organismu rozhodující absorpce, farmakokinetika, biologická transformace a relativní aktivita metabolitů. Většina flavonoidů se v potravě vyskytuje v podobě O-glykosidů (Hammerstone et al, 2000). Nejběžnějším cukrem je glukóza, ale mezi další příklady patří glukorhamnóza, galaktóza, arabinóza a rhamnóza (Cook a Samman, 1996). V tenkém střevě byly specifikovány dvě (3-endoglukosidázy schopné hydrolyzovat glykosidické vazby flavonoidů. Jsou to laktáza-florizin hydroláza (Leese a Semenza, 1973; Day et al, 2000) a nespecifický cytosolický enzym, o kterém se soudí, že je schopen odštěpovat cukerné zbytky flavonoidů a uvolňovat tak místo pro konjugaci (Daniels et al, 1981; Gopalan et al, 1992). Umístění a struktura cukerného zbytku ovlivňuje biologickou dostupnost různých flavonoidů. Kinetika vstřebávání se výrazně liší u různých potravin díky rozmanitosti cukrů a dalších funkčních skupin na flavanovém jádru (Hollman et al, 1999, Hollman a Katan, 1999). Vstřebávání může také záviset na dávkování, typu vehikula při podávání, předchozí stravě, pohlavních rozdílech (Erlund et al, 2001) a mikroflóře trávníku. Různá místa vstřebávání mají také za následek rozdílný metabolismus rutinoidů oproti glukosidům, jelikož játra mohou hrát v této úloze v metabolismu flavonoidů, které se vstřebávají v tenkém střevě ve srovnání s metabolismem sloučenin, které se vstřebávají v trávníku. Kvůli velikosti molekul vyžaduje absorpce polymerických flavonoidů stěvním epitelem předchozí degradaci na menší, nízkomolekulární sloučeniny. Mikroflóra slepého střeva se kromě hydrolyzy glykosidů flavonoidů účastní i degradace polymerů a štěpení

monomerních flavonoidů na monofenolové kyseliny. Zdá se, že rozštěpení heterocyklického kruhu flavonoidů dává vznik sloučeninám s nižší aktivitou (Rice-Evans et al, 1996). Zvýšení počtu hydroxylových skupin po fázi I. metabolismu flavonoidů s relativně nízkou aktivitou může na druhé straně vést ke vzniku přechodných sloučenin s větší antioxidantní schopností, jelikož hydroxylové skupiny na aromatickém jádru jsou klíčovými prvky fenolových sloučenin ve schopnosti poskytovat vodík a vychytávat volné radikály (Ng et al, 2000). Výsledky sledování kinetiky předpokládají značnou biotransformaci flavonoidů ve tkáních a/nebo stěvním mikroflórou (Olthof et al, 2000; Walle et al, 2001; Warden et al, 2001). Konjugace fáze II. v játrech (Piskula a Terao, 1998) a v enterocytech (Spencer et al, 1999; Day et al, 1998; Day et al 2001) dává vznik glukuronidům (Crespy et al, 2001; Erlund et al, 2001), síranům (Cao a Prior, 1999; Deprez et al, 1999), metylkonjugátům (Spencer et al, 2001) a malému množství volných aglykonů (Erlund et al, 2000). Další složky potravy, jmenovitě proteiny a železo, mohou teoreticky zhoršit vstřebávání tvorbou komplexů s polyfenoly.

Přesný mechanismus vstřebávání flavonoidů zůstává neobjasněn a zdá se, že závisí na typu flavonoidů a dalších faktorech.

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

### 2.2.2 Hydroxylové skupiny

Na které mechanismy antioxidantní 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). Nejvýznamnější vlastností pro vychytávání kyslíkových radikálů (Sekher Pannala et al, 2001; Burda a Oleszek, 2001) a reaktivních sloučenin dusíku (Haenen et al, 1997; Kerry

a Rice-Evans, 1999) je postavení hydroxylových skupin na kruhu B. 3',4'-katecholová skupina na kruhu B výrazně posiluje inhibici lipoperoxidace (Mora et al, 1990; Ratty a Das, 1988; Dugas et al, 2000). Schopnost flavonoid vylučovat volné radikály je vysoce závislá na volné hydroxylové skupině na uhlíku 3 (Burda a Oleszek, 2001) a flavonoidy s 3',4'-katecholovou a hydroxylovou skupinou na uhlíku 3 jsou účinnější proti peroxynitritu než selen, což je známý vylučovatel reaktivních sloučenin dusíku (Haenen et al, 1997).

Ochrana lipidů před oxidativním poškozením se popisuje:

1. vylučování hydroxylových, peroxylových a syntetických radikálů
2. ukončení a zvrácení reakce v lipidové fázi, zahrnující peroxylové radikály a hydroperoxydy
3. chelataci divalentních kationtů sloužících k zahájení oxidativního pochodu *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 rozdíly v antioxidantní aktivitě polyhydroxylovaných a polymetoxylovaných flavonoidů. A koliv poměr hydroxylových a metoxylových skupin neurčuje nutně schopnost flavonoid vylučovat volné radikály, kruh B je obzvláště citlivý k umístění metoxylových skupin. Výměna 6'-OH/4'-OMe konfigurace za 6'-OMe/4'-OH konfiguraci zcela odstraňuje schopnost vylučování 2,2-difenyl-1-picrylhydrazylového radikálu navozením koplanarity. Navíc sterické uzavření 3',4'-katecholové skupiny O-metylací uhlíku 4' významně narušuje antioxidantní kapacitu (Cao et al, 1997; Dugas et al, 2000). Pozitivní účinek katecholové skupiny na kruhu B se ruší vícečetnými metoxylovými skupinami na kruhu A, jelikož flavony s ortodimetroxylovými nebo trimetroxylovými skupinami na kruhu A nezvyšují inhibici vzniku malondialdehydu následkem oxidace (Mora et al, 1990). O-metylace zvyšuje

antioxida ní aktivitu v n kterých mikrozomálních systémech (Cholbi et al, 1991), avšak rozbor y mikrozomální peroxidace umož ůjí více etné mechanismy antioxida ní aktivity. Na základ p edešlého je možné vyvodit, že vliv O-metylace závisí na metod m ení, typu použitého radikálu a na lipidové povaze oxidovaného substrátu, která m že p isp t k celkové antioxida ní aktivit .

#### 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 nižší hodnotu IC50 (ukazatel siln jšího antioxida ního ú ink u) v mikrozomálním systému ve srovnání s flavonoidy se saturovanými heterocyklickými jádry (Cholbi et al, 1991). A koliv je nutné brát v úvahu i další strukturní vlastnosti, vychytávání volných radikál flavonoidy je p ítomností obou strukturních prvk variabiln zvýšeno.

#### 2.2.5 Cukerné zbytk y

Aglykony mají siln jší antioxida ní ú inek než jejich odpovídající glykosidy (Ratty a Das, 1988; Gao et al, 1999). Krom prosté p ítomnosti a celkového po tu hrají významnou roli také poloha a chemická struktura cukerného zbytku. P estože jsou glykosidy obvykle slabšími antioxidanty než aglykony (Burda a Oleszek, 2001, Williamson et al, 1999), jejich biologická dostupnost je n kdy vyšší (Hollman et al, 1999). Je také d ležit é, zda je cukerným zbytkem glukóza, rhamnóza nebo rutinóza. Vliv cukerných zbytk ů na antioxida ní vlastnosti je u lov ka sporný, jelikož glykosidické vazby jsou asto št peny ve st ev . Na základ hromadících se d kaz je pravd podobné, že odstran ní cukerných zbytk st evními enzymy nebo bakteriemi zvyšuje aktivitu flavonoid p íjatých v potrav *in vivo*.

## 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 takového poškození volnými radikály, což má význam, než se dříve myslelo (Arora et al, 1998). Redukční vlastnosti taninů a afinita polyhydroxylovaných flavonoidů k železu má však při dlouhodobém podávání vést k nedostatku železa v organismu.

## 2.2.8 Prooxidační aktivita

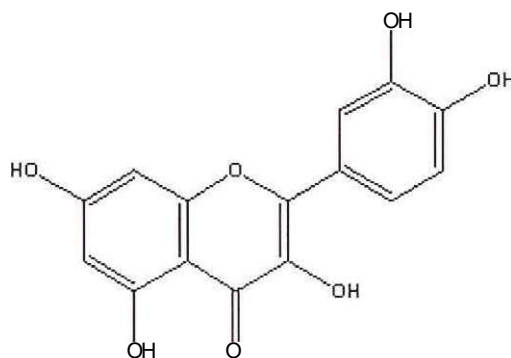
Akoliv antioxidační vlastnosti flavonoidů podporují jejich pozitivní roli ve výživě lidí a v prevenci onemocnění, na které studie popisují prooxidační aktivitu těchto látek *in vitro*. Má se za to, že prooxidační aktivita je přímo úměrná celkovému počtu hydroxylových skupin (Cao et al, 1997). Existují také důkazy, že nenasycená 2,3-vazba a 4-oxo postavení flavonů mohou podporovat tvorbu kyslíkových radikálů, indukovanou dvojmocnou manganem za přítomnosti kyslíku (Cao et al, 1997). Tato informace naznačuje, že některé shodné



strukturální vlastnosti, které optimalizují antioxidační schopnost, mohou také vyvolat oxidační stres a poškození funkčních a strukturních molekul buky. Glykosylace a metylace hydroxylových skupin zmírňuje prooxidační chování flavonoidů (Cao et al, 1997). A koliv flavonoidy s n kolika hydroxylovými skupinami jako je quercetin a podobné polyfenoly zvyšují buněčné poškození způsobené kyslíkovými radikály a jejich užití ve farmakologických dávkách je tak kontraindikováno, zejména 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.



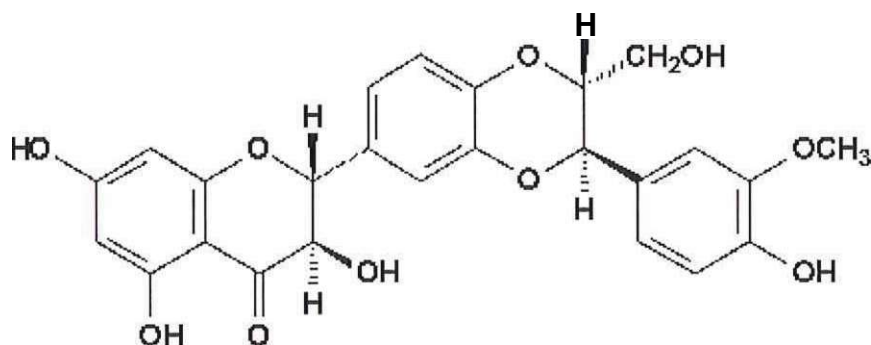
*Chemický vzorec quercetinu*

Quercetin je vysoce účinným chelátorem pechodných kovů a je schopen inhibovat železem indukovanou lipoperoxiaci chelatací železa a vznikem komplexů, které nemají schopnost navodit lipoperoxiaci. Tyto komplexy se železem zároveň vylučují volné radikály. Quercetin tedy inhibuje účinek volných radikálů na těchto stupních: vznik superoxidového aniontu, tvorba hydroxylových radikálů ve Fentonovské reakci a tvorba lipidoperoxylových radikálů (Afanas'ev et al, 1989). Cytoprotektivní účinek quercetinu testovaný na kulturách hepatocytů by mohl být připisán jeho široce známému účinku proti

radikál m, ale také jeho schopnostem vázat železo (Morel et al, 1993). Quercetin vykazuje interakci s m natými a železitými ionty (Kuo et al, 1998). Quercetin rušil železem indukované oxida ní poškození bun k Caco-2 (model st evního epitelu) v pokusech *in vitro* (Nunez et al, 2001). Bylo ukázáno, že quercetin chelatací kovových iont a vychytáváním volných radikál chrání DNA p ed zlomy zp sobené tert-butylhydroperoxidem a menadionem (Aherne a O'Brien, 2000). Bylo prokázáno, že quercetin snižuje v závislosti na dávce lipoperoxidaci navozenou nejen železem, ale i m dí, vanadem a kadmíem, a to p i všech testovaných koncentracích kov (Sugihara et al, 1999). Quercetin vstupuje do erytrocyt a brání lipoperoxidaci a hemolýze. Zdá se, že tento efekt je zp soben nitrobun nou chelatací železa, protože byl nalezen semi-stochiometrický pom r mezi uvoln ným železem a množstvím quercetinu pot ebného k inhibici lipoperoxidace a hemolýzy (Ferrali et al, 1997). Na základ pokus s tert-butylhydroxyperoxidem vyplynulo, že hlavní mechanismus aktivity quercetinu spo ívá v chelataci železa (Sestili et al, 1998). Na druhé stran bylo ukázáno, že quercetin vykazuje také prooxidaci ú inky. Fentonovou reakcí indukovaná peroxidace ethyl linoleátu ( $H_2O_2$ ,  $Fe^{2+}$ ) byla zastavena nízkými koncentracemi quercetinu, avšak vysoké koncentrace téže látky vedly ke zvýšené peroxidaci pravd podobn recyklací vázaného inaktivního  $Fe^{3+}$  na aktivní  $Fe^{2+}$  (Stadler et al, 1995). Quercetin navozoval významnou lipoperoxidaci bun ných jader v závislosti na dávce a sou asn zp soboval degradaci DNA. Tyto ú inky byly zesíleny železem a m dí. Výsledky tedy nazna ují, že kyslíkové radikály formované autooxidací quercetinu, katalyzované železem a m dí, jsou zodpov dné za lipoperoxidaci a poškození DNA bun ných jader hepatocyt potkan (Sahu a Washington, 1991).

## 2.2.10 Silibinin

Silibinin (silybin) je složka silymarinu, extraktu z rostliny *Silybum Marianum* (Ostropestec mariánský).



Chemický vzorec silibininu

Potenciometrické, elektrochemické a spektroskopické studie komplex silibinu a  $\text{Fe}^{3+}$  ukazují, že tato přírodní látka je silný ligand železa a za vazebná místa byl určen kyslík na atomech uhlíku 3 a 4 (Borsari et al, 2001). Silymarin a silybin, stejně jako quercetin, bránily lipoperoxidaci vyvolanou doxorubicinem a závislou na železe na mikrozomech a mitochondriích potkaního srdce. Quercetin byl účinnější než silymarin a silybin, jejichž cytoprotektivní účinek byl srovnatelný. Silybin se liší od quercetinu nezávisle ve vodném roztoku železo. Výsledky naznačují, že silymarin možná zabráňuje doxorubicinem vyvolanému poškození membrán potkaního srdce především vychytáváním volných radikálů (Psotová et al, 2002). Silymarin snižoval lipoperoxidaci jater navozenou předávkováním železem (Bhattacharya et al, 2000). Dihemisukcinát silibinu, ve vodě rozpustná forma, rychle reagoval s hydroxylovými radikály a také snadno vázal  $\text{Fe}^{2+}$  v roztoku. Dihemisukcinát silibinu a silibin-fosfatidylcholinový komplex známý jako IdB 1016 snižoval lipoperoxidaci jaterních mikrozom vyvolanou  $\text{Fe}^{2+}$  o 39.5% a 19.5%. Tyto výsledky podporují antioxidantní vlastnosti silibinu a jeho schopnost vychytávat volné radikály (Basaga et al, 1997). Ústní podání silibinu chrání před toxickými účinky železa na játra *in vivo* a zdá se, že tento účinek je způsoben významnou antioxidantní aktivitou této látky (Pietrangelo et al, 1995). Ve studii s jaterními mikrozomy potkana bylo

ukázáno, že dihemisukcinát silibininu má inhibiční účinek na lipoperoxidaci navozenou  $\text{Fe}^{3+}$  a kyselinou askorbovou, a že tento účinek je závislý na koncentraci dihemisukcinátu silibininu a velikosti lipoperoxidace (Mira et al, 1994). Podání silibinu zabránilo biochemickému a funkčnímu poškození jater způsobenému podáváním 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 Kutilek, 2004).

### 2.3.2 Vlastnosti

Společnou vlastností bisfosfonátů je vazba fosfor-uhlík-fosfor, a liší se pouze substituenty na postranních etzích, které určují jejich relativní potenci. Relativní potence je určována koncentrací bisfosfonátů, inhibující kostní resorpci u potkanů, a jako základ byla zvolena koncentrace etidronátu, prvního syntetizovaného bisfosfonátu. V současné době jsou v různých zemích k dispozici etidronát, clodronát (1. generace), pamidronát, alendronát (2. generace), ibandronát a risedronát (3. generace). Rozdělení bisfosfonátů na tři generace vyplývá z chemické struktury, je odvozeno od složení postranních etzů a nemá žádnou souvislost s relativní potenci i účinností bisfosfonátů (Vyskočil a Kutilek, 2004).

K fyzikálně-chemickým vlastnostem bisfosfonátů patří odolnost proti enzymatické hydrolýze v gastrointestinálním traktu, afinita ke krystalům hydroxyapatitu, inhibice tvorby, shlukování a rozpouštění krystalů fosforenanu vápenatého a vytváření rozpustných i nerozpustných komplexů a agregátů s vícemocnými ionty kovů (Vyskočil a Kutilek, 2004).

### 2.3.3 Farmakologické účinky

Na tkáňové úrovni dochází působením bisfosfonátů ke snížení kostního obrátu, zvýšení kostní hmoty, zvýšení mineralizace a zvýšení obsahu minerálů

i kostní denzity. Na buněné úrovni je u bisfosfonátů nejdležitější afinita k buněným povrchům osteoklastů a narušení resorpční membrány osteoklastů. Na molekulární úrovni vedou bisfosfonáty k inhibici farnesyldifosfátsyntetázy, redukcii geranylgeranyldifosfátu a prenylace malých guanosintrifosfatáz, narušení cytoskeletální organizace (adheze a migrace osteoklastů) a inhibici funkce osteoklastů vedoucí k jejich apoptóze (Vyskočil a Kutilek, 2004).

Nejdležitějším účinkem bisfosfonátů je inhibice aktivovaných osteoklastů. Důjde se tak k útlumem proteosyntézy, poklesu uvolnění lyzozomálních enzymů, snížením aktivity endogenní pyrofosfatázy, poklesu tvorby prostaglandinů, poklesu 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 inhibici dozrávání prekursorů 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. Pro tento jev není zatím jednoznačné vysvětlení. Endokrinní funkce jednotlivých orgánů není bisfosfonáty ovlivněna. Při vývoji vyšších generací bisfosfonátů dochází ke zvyšování anti-resorpčních účinků, a tím k potlačování negativního působení na mineralizaci a riziko vzniku osteomalacie (Vyskočil a Kutilek, 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%. Bisfosfonáty se vstřebávají jak v žaludku tak v tenkém střevě. Vstřebatelnost bisfosfonátů je výrazně snížena, jestliže jsou podávány s potravou, a to nejvíce s jídly obsahujícími ionty vápníku nebo železa (Vyskočil a Kutilek, 2004; Osterman et al., 1994). Velmi negativní vliv na jejich vstřebávání mají také ovocné džusy a káva. Proto by bisfosfonáty neměly být nikdy podávány s jídlem a neměly by být zapíjeny mléčnými produkty. Až 60% vstřebaných bisfosfonátů je

zabudováno do kostní tkáně, zbytek je rychle vyloučen močí. Biologický eliminací poloas cirkulujících bisfosfonát je 0.5 až 2 hodiny. Bisfosfonáty jsou zabudovány v kostní tkáni dlouhá déle než 10 let. Zásah bisfosfonát 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 bisfosfonát

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 bisfosfonát u osteogenesis imperfecta, fibrózní dysplazie, při prevenci uvolnění 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 Kutilek, 2004).

### 2.3.6 Antioxidační vlastnosti

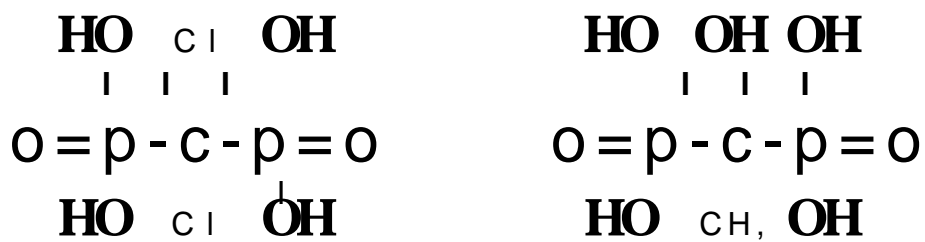
V léčbě osteoporózy u pacientů s thalasemia major se používají bisfosfonáty. Kromě jejich známého účinku na kostní tkáň se uvažuje i o jejich antioxidačním účinku. Tento fakt by mohl být významný ve spojení s hromaděním železa po opakovaných transfúzích v léčbě thalasemia major, kde se železem navozený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

Bisfosfonáty inhibovaly v pokusech *in vitro* lipoperoxidaci a snižovaly produkci hydroxylových radikálů Fentonovou reakcí. Protože ve Fentonovské reakci hrají důležitou roli ionty železa, je možné, že antioxidační účinek bisfosfonátů je dán schopností chelatace železa (Dombrecht et al, 2003).

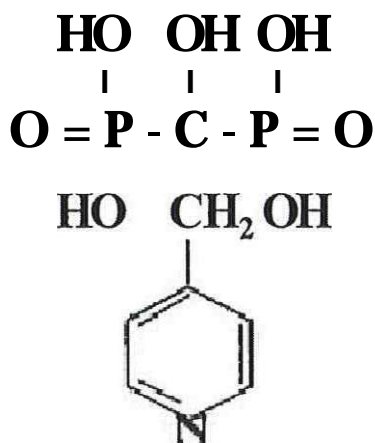
Interakci mezi bisfosfonáty a ionty kov podporují i výsledky dalších studií. Souasně podání clodronatu a síranu železnatého vedlo k výraznému snížení absorpce clodronatu (Osterman et al, 1994). Clodronat aplikovaný v hypoosmotickém roztoku tvoří komplexy se železem hemolyzovaných erytrocytů a akumuluje 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 důležitá zejména pro soběná chelataci zinku, který je součástí tohoto enzymu. Tato skutečnost může představovat další využití bisfosfonátů v léčbě metastáz do kostí, protože metaloproteinázy jsou důležité pro invazi nádorových buněk do kostní tkáně (Clézardin et al, 2003). Etidronat a deferoxamin snížily poškození 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.



*Chemický vzorec clodronatu (vlevo) a etidronatu (vpravo)*



*Chemický vzorec risedronatu*

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

1. Ověřit oxidační úinky 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 úinek 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 úinek 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 úinek na oxidační stres vyvolaný železem.
- V. Zjistit vliv clodronatu, etidronatu a risedronatu na distribuci železa a na kterých stopových prvcích v organismu.

## 4 MATERIÁL A METODY

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

Pro odběr vzorků byla zvíata usmrcována v éterové anestezii podstřižením 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  $4^\circ\text{C}$  po dobu 10 minut. Plazma se odtáhla a erytrocyty se promyly ve fyziologickém roztoku o teplotě  $4^\circ\text{C}$ . 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  $4^\circ\text{C}$ . Odstředěné erytrocyty se doplnily redestilovanou vodou ( $4^\circ\text{C}$ ) do objemu 2 ml (přibližně 1.75 ml redestilované vody na vzorek) a nechaly se zlyzovat při teplotě  $4^\circ\text{C}$  (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 glutathionu byly vkládány do kádinek s ledovým roztokem 0.02M Na<sub>2</sub>EDTA 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 glutathionu a aktivity glutathion 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). Test využívá reakce MDA s TBA v kyselém prostředí za vzniku fialového produktu, který se měří spektrofotometricky při 520 a 535 nm.

Hladina redukováného glutathionu byla stanovena spektrofotometricky pomocí kyseliny 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoové), která je redukována SH skupinami na kyselinu 2-nitro-5-merkaptobenzoovou (metoda s Ellmanovým indikátorem); žlutý produkt se stanovuje při 412 nm (Sedlák a Lindsay, 1968).

Aktivita glutathion peroxidázy [EC 1.11.1.91] byla měřena podle Gunzlera. Principem stanovení je glutathion peroxidázou katalyzovaná oxidace glutathionu butylhydroxyperoxidem. Oxidovaný glutathion je převáděn za přítomnosti glutathion reduktázy a NADPH na redukovanou formu za současné oxidace NADPH na NADPH<sup>+</sup>. Pokles koncentrace NADPH je měřen spektrofotometricky při 366 nm (Gunzler et al, 1974).

Aktivita katalázy [EC 1.11.1.6] byla měřena spektrofotometricky při 240 nm na základě úbytku H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, který je přidáván do reakční směsi jako substrát (Aebi, 1972).

Pro měření aktivity superoxid dismutázy [EC 1.15.1.11] byl použit test RANSOD. Superoxid dismutáza akceleruje dismutaci superoxidového radikálu na peroxid vodíku a molekulární kyslík. Metoda využívá xanthin a xanthin oxidázu ke generování superoxidového radikálu, který reaguje s 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloridem za tvorby

erveného formazanového barviva, jehož množství se měří spektrofotometricky při 505 nm. Aktivita superoxid dismutázy je dána stupněm inhibice této reakce.

Pro stanovení obsahu stopových prvků a kadmia byly tkáně zvaženy 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. Příslušné 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 kadmii 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 se klasifikuje jako karcinogen skupiny I (IARC 1993). Kadmium způsobuje oxidativní poškození tkání (Bal a Kasprzak, 2002) a předpokládá se, že v těchto procesech je významná úloha železa (Casalino et al, 1997; Eybl et al, 1996). Cílem následujícího pokusu bylo zjistit vliv diet s různým obsahem železa na kadmiově navozené oxidativní poškození. Dále byl sledován vliv na hladinu stopových prvků ve vybraných orgánech.

Zvíata 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 zvíatům z každé skupiny aplikováno subkutánně kadmium ve formě  $\text{CdCl}_2$  v dávce 0,03 mmol na kilogram váhy. Zbýlých osm zvíat z každé skupiny dostalo fyziologický roztok.

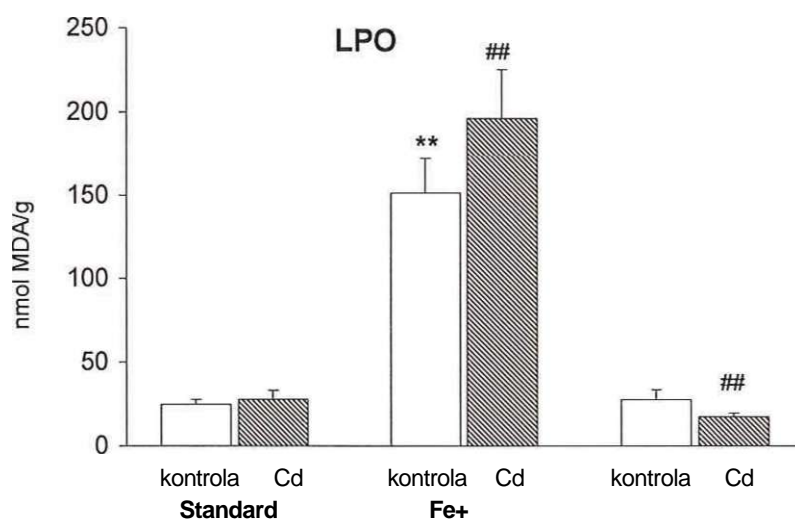
24 hodin po aplikaci kadmia byly myši dekapitovány a odebrány játra, ledviny, mozek a varlata. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace, hladina redukovaného glutationu a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. Hladina stopových prvků a kadmia byla stanovena ve všech vybraných orgánech. Statistické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

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  proti kontrole krmené standardní dietou

# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  proti skupině krmené equivalentní dietou

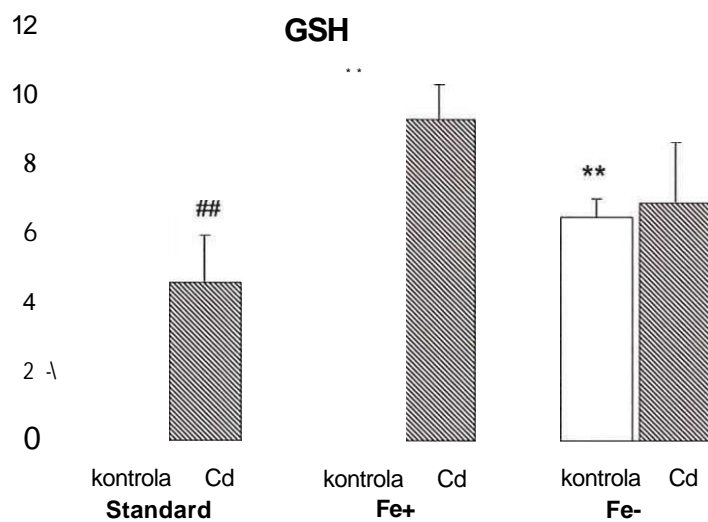
Výsledky:

Lipoperoxidace v jaterním homogenátu byla významně zvýšená u zvířat krměných dietou se zvýšeným obsahem železa (151.38 proti 24.59 nmol MDA/g u skupiny krměné standardní dietou,  $p < 0.01$ ). Míra lipoperoxidace u této skupiny byla ještě vyšší po podání kadmia (196.4 nmol MDA/g,  $p < 0.01$  proti kontrolním zvířatům téže skupiny). Kadmium naopak nemělo vliv na lipoperoxidaci u skupiny krměné standardní dietou. Lipoperoxidace byla nižší po podání kadmia u skupiny krměné dietou se sníženým obsahem železa (Graf 5.1).

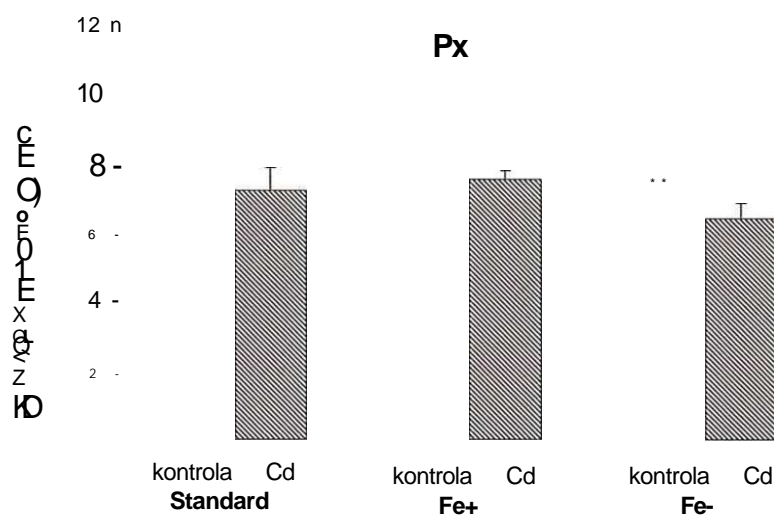


Graf 5.1: Vliv rozdílného množství železa v dietě a podání kadmia na lipoperoxidaci (LPO) v játrech myší

Hladina redukovaného glutationu byla zvýšená u skupiny krměné dietou se zvýšeným obsahem železa a snížena u skupiny krměné dietou se sníženým obsahem železa. Podání kadmia vedlo k depleci redukovaného glutationu pouze u skupiny krměné standardní dietou (4.55 proti 8.22 pmol/g u kontrolních zvířat téže skupiny,  $p < 0.01$ , Graf 5.2).



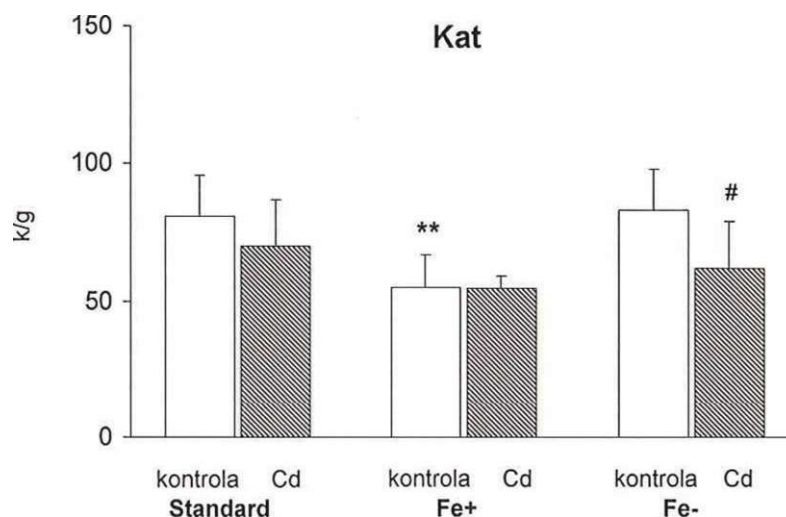
Graf 5.2: Vliv r zného množství železa v diet a podání kadmia na hladinu redukovaného glutationu (GSH) v játrech myší



Graf 5.3: Vliv r zného množství železa v diet a podání kadmia na aktivitu glutation peroxidázy (Px) v játrech myší



Aktivita glutation peroxidázy byla snižená u skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa. Podání kadmia neovlivnilo aktivitu glutation peroxidázy ani v jedné skupině (Graf 5.3). Aktivita katalázy byla snížena u zvířat krmených dietou se zvýšeným obsahem železa. Podání kadmia vedlo k poklesu aktivity katalázy u skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa (Graf 5.4).



Graf 5.4: Vliv různého množství železa v dietě a podání kadmia na aktivitu katalázy (Kat) v játrech myši

Koncentrace kadmia byla vyšší v mozku u skupiny krmené dietou se zvýšeným obsahem železa a nižší ve varlately 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 významně dietami ovlivněna (Tabulka 5.1).

Tabulka 5.1 - Vliv r zného množství železa v diet na koncentraci kadmia v orgánech myší (v pg 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	12.411.4	8.1 ±1.9*	0.065 ±0.011	0.20 ±0.02*

Krmení dietou se zvýšeným obsahem železa po dobu ty týdn vedlo ke zvýšení koncentrace železa v játrech, ledvinách, varlatech i v mozku. Byla zvýšena koncentrace ho íku v játrech, vápníku v ledvinách a m di ve varlatech. Došlo ke snížení koncentrace ho íku a zinku v ledvinách. Krmení dietou se sníženým obsahem železa po dobu ty týdn vedlo ke snížení koncentrace železa v játrech a varlatech. Byla zvýšena koncentrace zinku a m di v játrech a varlatech, a vápníku a m di v ledvinách. Podání kadmia vedlo ke zvýšené koncentraci vápníku, zinku, m di a železa v játrech, zinku, m di a železa v ledvinách, vápníku a železa ve varlatech, a ke snížení koncentrace ho íku, zinku a m di 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 ho íku, zinku a m di 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 m di v játrech, ho íku a železa v ledvinách, a ho íku, zinku a m di ve varlatech. Koncentrace stopových prvk v mozku nebyla ovlivn na podáním kadmia (Tabulka 5.2).

Tabulka 5.2 - Vliv r zného množství železa v diet a podání kadmia na koncentraci stopových prvk v orgánech myší (v pg na gram vlhké váhy)

	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe
<b>JÁTRA</b>					
A. Kontrola	22.7 ±1.5	239 ±11	22.6 ±0.9	3.48 ±0.08	82 ±14
A. Cd	33.3 <del>##</del> ±8.2	252 ±17	34.7 <del>##</del> ±3.3	3.91 <del>##</del> ±0.17	134 ±36 <del>##</del>
B. Kontrola	23.9 + 5.9	251 ±12 <sub>*</sub>	21.4 ±1.4	3.57 ±0.29	4390 ± 544 <sub>..</sub>
B. Cd	21.4 + 1.5	255 ±8	27.9 <del>##</del> ±1.4	3.87 ±0.49	4759 ±392
C. Kontrola	21.8 ± 4.1	249 ±9	25.9 <del>*</del> ±2.3	4.20 ±0.20 <sub>..</sub>	47 ±5 <sub>..</sub>
C. Cd	24.7 ±4.8	237 ±14	33.9 <del>#</del> ±9.5	3.64 ±0.41 <del>##</del>	42 ±12
<b>LEDVINY</b>					
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 <del>##</del> ±0.6	3.85 <del>##</del> ±0.31	45 ±3 <sub>#</sub>
B. Kontrola	41.7 ± 3.8 <sub>*</sub>	193 ±5 <sub>..</sub>	16.5 <del>*</del> ±0.7	3.38 ±0.20	120 ±29 <sub>..</sub>
B. Cd	39.8 ±2.9	194 ±3	18.1 <del>##</del> ±0.6	3.52 ±0.12	109 ±11
C. Kontrola	47.4 ±11.5 <sub>*</sub>	205 ±13	17.9 ± 1.5	3.62 ±0.29	37 ±2
C. Cd	41.1 ±4.7	194 ±4 <del>##</del>	19.4 ± 0.6	3.70 ±0.09	33 ±2 <sub>#</sub>

Tabulka 5.2 - Pokračování

	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe
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 #
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

Závěr:

Dieta se zvýšeným obsahem železa vedla k indukci lipoperoxidace v játrech. Úroveň 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 má také vliv na hladinu redukovaného glutathionu. Ta byla zvýšená u skupiny krmené dietou se zvýšeným obsahem železa a naopak snižena u skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa. Podání kadmia vedlo ke snížení hladiny redukovaného glutathionu pouze u skupiny krmené standardní dietou. Zvýšený obsah železa v dietě neovlivnil aktivitu glutathion peroxidázy, která byla ovšem nižší u skupiny krmené dietou se sníženým obsahem železa. Podání kadmia nemělo vliv na aktivitu glutathion 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. Snížený obsah železa v dietě se projevil v nižší koncentraci železa v játrech a varlatach, 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 v těšině 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 OXIDA NÍ STRES

V n kolika studiích, p edevším *in vitro*, bylo ukázáno, že quercetin má antioxida ní vlastnosti (Nunez et al, 2001; Aherne a O'Brien, 2000). Cílem následujících pokus bylo zjistit vliv quercetinu na antioxida ní systém myší. Dále jsme cht li posoudit, zda afinita quercetinu k r zným kov m (Sugihara et al, 1999; Kuo et al, 1998) pozitivn ovliv uje oxida ní stres zp sobený železem, a také byl sledován vliv quercetinu na hladinu n kterých prvku ve vybraných orgánech.

Quercetin (Sigma-Aldrich) byl podáván per os v r zných dávkách ve form disperze v 0.25% roztoku metylcelulózy. Železo jako síran železnatý bylo aplikováno intraperitoneáln v dávce 10 mg železa na kilogram váhy ve vodném roztoku. Všechny roztoky byly p ipraveny erstv p ed aplikací.

### 5.2.1 Quercetin 8.5 mg na kilogram váhy po dobu 21 dní

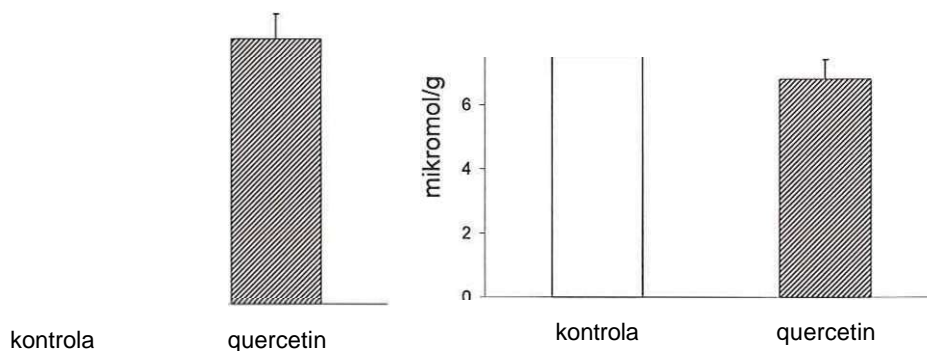
V tomto pokuse byl podáván quercetin v dávce 8.5 mg na kilogram váhy jednou denn po dobu 21 dní. Kontrolní skupina dostávala 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš. V obou skupinách bylo po osmi zví atech.

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 prvku byla stanovena ve všech vybraných orgánech.

Výsledky:

Lipoperoxidace v jaterním homogenátu byla významn zvýšená po podání quercetinu z kontrolních 37.19 na 47.43 nmol MDA/g ( $p < 0.001$ , Graf 5.5).

Hladina redukovaného glutationu byla naopak významně nižší u quercetinové skupiny vzhledem ke kontrolním zvířatům (6.81 proti 8.42 pmol/g,  $p < 0.05$ , Graf 5.5).



*Graf 5.5: Vliv quercetinu v dávce 8.5 mg/kg po dobu 21 dní na lipoperoxidaci (LPO, vlevo) a hladinu redukovaného glutationu (GSH, vpravo) v játrech myší*

Aktivita katalázy a glutation peroxidázy nebyla podáním quercetinu nijak ovlivněna (Graf 5.6).

Quercetin zvýšil hladinu hořčíku v játrech, snížil obsah zinku v ledvinách a hořčíku v mozku (Tabulka 5.3).

kontrola

quercetin

kontrola

quercetin

*Graf 5.6: Vliv quercetinu v dávce 8.5 mg/kg po dobu 21 dní na aktivitu katalázy (Kat, vlevo) a glutathion peroxidázy (Px, vpravo) v játrech myší*



Tabulka 5.3 - Vliv quercetinu v dávce 8.5 mg/kg po dobu 21 dní na koncentraci stopových prvků v orgánech myši (v pg na gram vlhké váhy)

	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe
<b>JÁTRA</b>					
Kontrola	37.8 ±2.6	232 ±4	23.5 ±1.8	4.56 ±0.68	74.9 ± 18.0
Quercetin	38.7 ±1.7	243 ± 8**	23.8 ±2.2	5.09 ±1.26	84.0 ±15.6
<b>LEDVINY</b>					
Kontrola	42.8 ±6.0	194 ±28	17.0 ± 0.2	3.63 ±0.23	40.8 ±1.4
Quercetin	44.1 ±2.4	200 ±5	16.7 ±0.2*	3.32 ±0.13	40.1 ±1.3**
<b>MOZEK</b>					
Kontrola	37.9 ±7.6	147 ±2	12.4 ±0.4	3.17 ± 0.17	13.5 ± 1.3
Quercetin	35.5 ±2.6	143 ±3**	12.5 ±0.5	3.25 ±0.23	13.3 ± 0.6

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 nemá vliv na aktivitu jaterní katalázy a glutation peroxidázy. Změny koncentrací hořčíku v játrech a mozku, a zinku v ledvinách byly statisticky významné, nicméně velmi mírné.

## 5.2. Interakce mezi quercetinem a železem po etdenní 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.

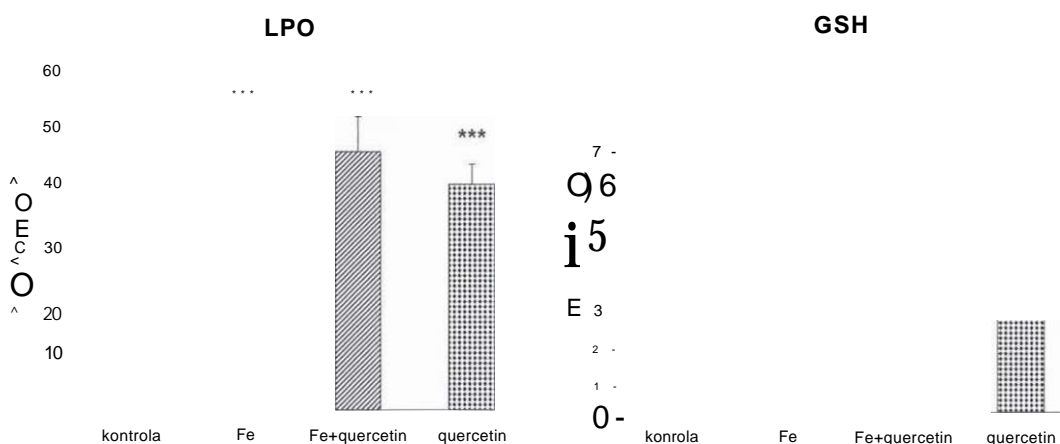
24 hodin po poslední dávce quercetinu byly myši dekapitovány a odebrány játra, ledviny, slezina, srdce a mozek. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace, hladina redukovaného glutationu, a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. Ve všech vybraných orgánech byla stanovena hladina železa.

### Výsledky:

Lipoperoxidace v jaterním homogenátu byla významně zvýšená po aplikaci železa (z 30.73 na 47.27 nmol MDA/g,  $p < 0.001$ ). Quercetin sám také zvýšil lipoperoxidaci, ale dále neměl vliv na železem zvýšenou lipoperoxidaci (Graf 5.7).

Železo nemělo vliv na hladinu redukovaného glutationu a aktivitu katalázy a glutation peroxidázy. Kombinace quercetinu a železa vedla ke snížení aktivity katalázy. Quercetin samotný neovlivnil hladinu redukovaného glutationu nebo aktivitu katalázy a glutation peroxidázy (Graf 5.7 a 5.8).

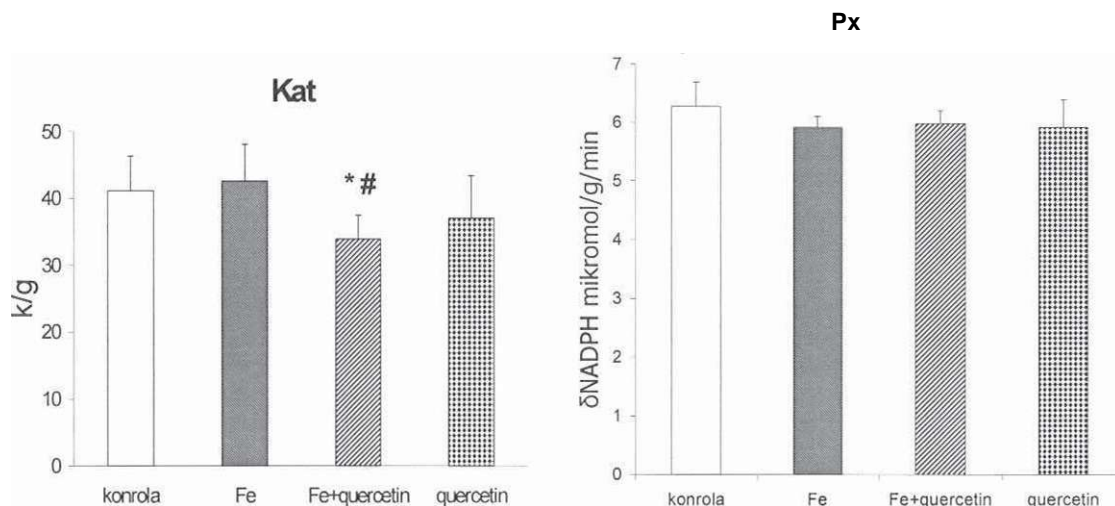
Koncentrace železa se po podání síranu železnatého zvýšila v játrech, ledvinách a slezině. Quercetin neovlivnil hladinu železa v orgánech (Tabulka 5.4).



Graf 5.7: 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 hladinu redukovaného glutationu (GSH, vpravo) v játrech myší

Tabulka 5.4 - Vliv quercetinu v dávce 8.5 mg/kg po dobu 6 dní a železa v dávce 10 mg/kg na koncentraci železa v orgánech myší (v pg na gram vlhké váhy)

	JATRA	LEDVINY	SLEZINA	SRDCE	MOZEK
Kontrola	79 ±11	38.1 ±3.0	182 ±26	52 ±4	13 ±2
Fe	166 ± 30***	43.6 ±1.3***	330 ± 37***	56 ±4	14 ± 1
Fe + Quercetin	154 ±33	45.6 ±5.5	308 ±29	54 ±3	13 ± 1
	70 ± 16	39.1 ±10.6	184 ±56	53 ±3	13 ± 1



Graf 5.8: Vliv quercetinu v dávce 8.5 mg/kg po dobu 6 dní a železa v dávce 10 mg/kg po dobu 3 dní na aktivitu katalázy (Kat, vlevo) a glutathion peroxidázy (Px, vpravo) v játrech myší

Záv r:

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 redukovaného glutathionu a aktivitu katalázy a glutathion peroxidázy. Quercetin také zvýšil lipoperoxidaci, ale neměl vliv na železem zvýšenou lipoperoxidaci. Quercetin samotný neovlivnil hladinu redukovaného glutathionu a aktivitu katalázy a glutathion peroxidázy. A kombinace železa a quercetinu nezměnila 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. Interakce mezi quercetinem a železem po týdenní aplikaci quercetinu

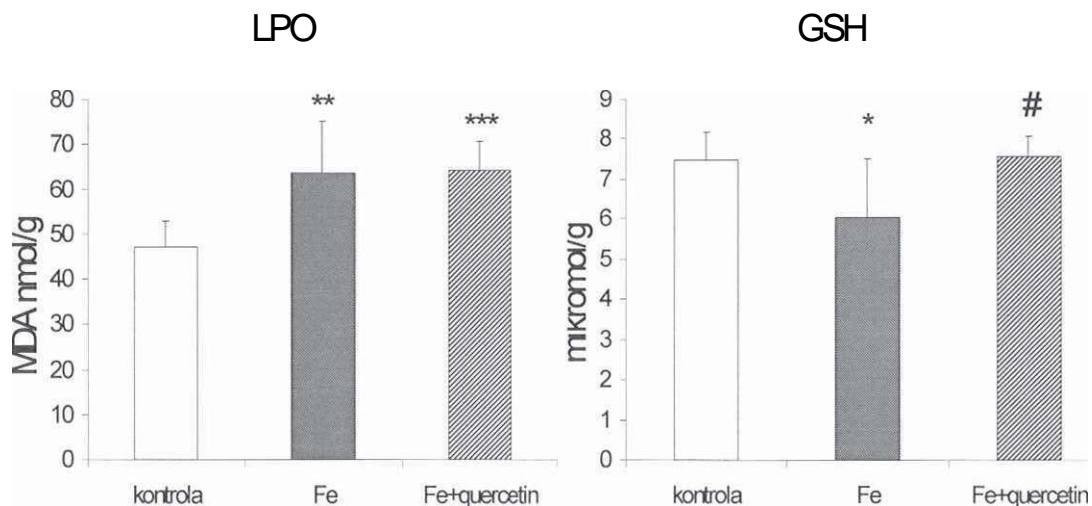
Myši byly rozděleny do tří skupin po 8 jedincích. Dvě skupiny dostávaly intraperitoneálně síran železnatý (10 mg železa na kilogram váhy) jednou denně po tři dny. Třetí skupina sloužila jako kontrola a dostávala 0.3 ml fyziologického roztoku intraperitoneálně po tři dny. Po dvoudenní pauze byl jedné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

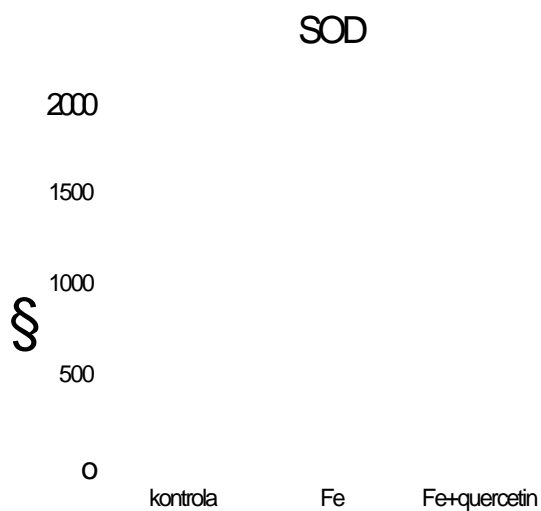
### Výsledky:

Aplikace železa vedla ke zvýšení lipoperoxidace v jaterním homogenátu (z 47.09 na 63.65 nmol MDA/g,  $p < 0.01$ , Graf 5.9) a ke snížení hladiny redukováného glutationu (z 7.48 na 6.03 pmol/g,  $p < 0.05$ , Graf 5.9). Aktivita superoxid dismutázy v erythrocytech byla snížena po podání železa ( $p < 0.05$ , Graf 5.10). Quercetin neměl vliv na železem zvýšenou lipoperoxidaci (Graf 5.9). Quercetin srovnal snížené hladiny redukováného glutationu na kontrolní hodnoty (Graf 5.9). Aktivita superoxid dismutázy nebyla quercetinem ovlivněna (Graf 5.10).

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 5.5).



Graf 5.9: 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 lipoperoxidaci (LPO, vlevo) a hladinu redukovaného glutationu (GSH, vpravo) v játrech myší



Graf 5.10: 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 aktivitu superoxid dismutázy (SOD U na gram hemoglobinu) v erythrocytech myší

Tabulka 5.5 - 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 myší (v Ijg na gram vlhké váhy)

	JATRA	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

Záv r:

Podání železa v dávce 10 mg na kilogram váhy intraperitoneálně významně zvýšilo míru lipoperoxidace v jaterním homogenátu. Dále došlo k poklesu redukováného glutationu a snížení aktivity superoxid dismutázy v erytrocytech. Quercetin měl pozitivní vliv na snížené hladiny redukováného 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. A koliv koncentrace železa nebyla zvýšená v ledvinách u skupiny, které byl aplikován samotný síran železnatý, podání quercetinu po těchto 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.

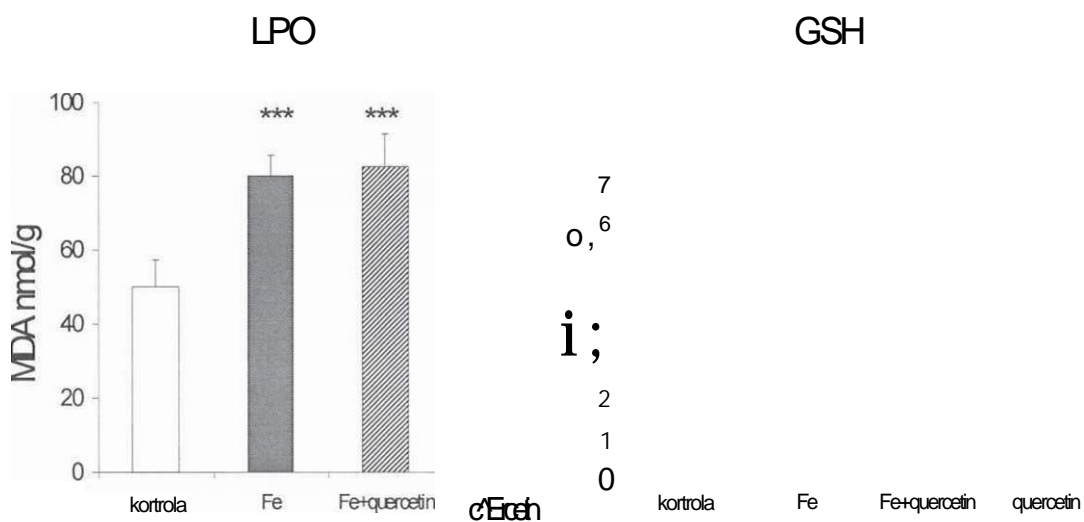
24 hodin po poslední dávce quercetinu byly myši dekapitovány a zachycena krev. Dále byly odebrány játra, ledviny, slezina, srdce a mozek. V játrech byla stanovena míra lipoperoxidace, hladina redukovaného glutationu, a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. V erythrocytech byla stanovena aktivita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

#### Výsledky:

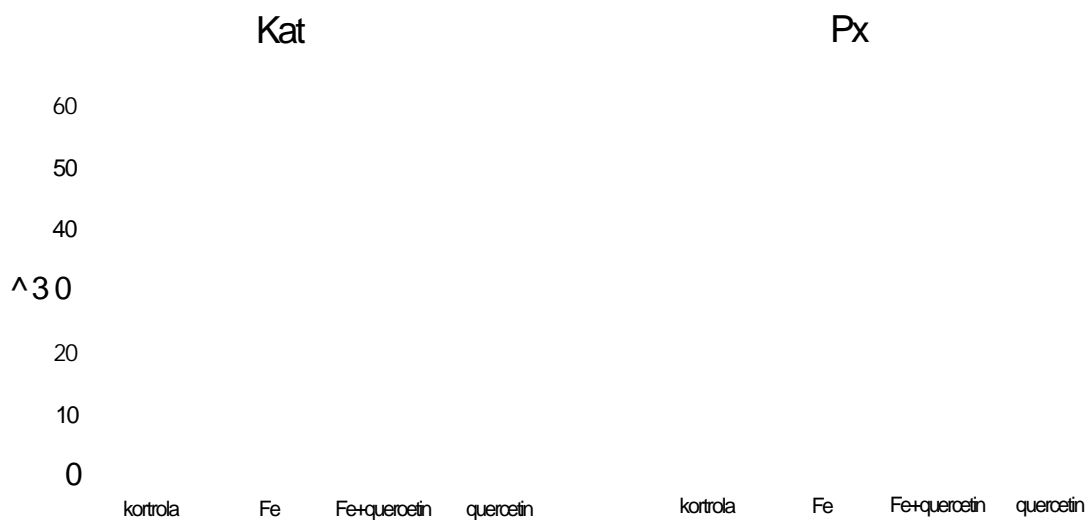
Aplikace železa vedla ke zvýšení lipoperoxidace v jaterním homogenátu (z 50.06 na 80.1 nmol MDA/g,  $p < 0.001$ , Graf 5.11) a ke zvýšení hladiny redukovaného glutationu (z 6.66 na 8.06 pmol/g,  $p < 0.01$ , Graf 5.11). Železo nemělo vliv na aktivitu superoxid dismutázy, katalázy a glutation peroxidázy (Graf 5.12 a 5.13). Quercetin snížil lipoperoxidaci, ale neměl vliv na železem indukovanou lipoperoxidaci (Graf 5.11). Aktivita glutation peroxidázy se zvýšila po podání quercetinu (Graf 5.12). Quercetin neovlivnil hladinu redukovaného glutationu nebo aktivitu katalázy a superoxid dismutázy (Graf 5.11, 5.12 a 5.13).

Koncentrace železa se po podání síranu železnatého zvýšila v játrech, ledvinách, srdci a slezině. Quercetin neovlivnil hladinu železa v orgánech (Tabulka 5.6).



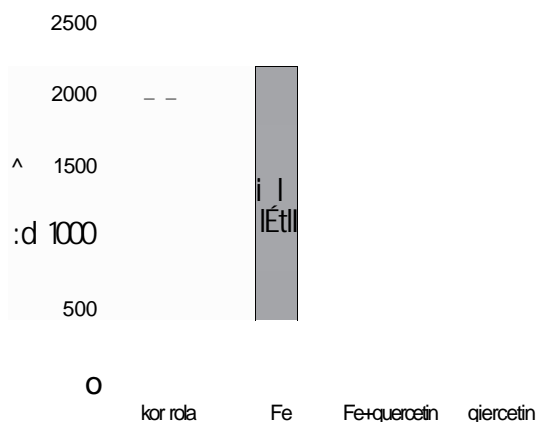


Graf 5.11: Vliv železa v dávce 10 mg/kg po dobu 3 dní a quercetinu v dávce 4.25 mg/kg po dobu 49 dní na lipoperoxidaci (LPO, vlevo) a hladinu redukovaného glutationu (GSH, vpravo) v játrech myší



Graf 5.12: Vliv železa v dávce 10 mg/kg po dobu 3 dní a quercetinu v dávce 4.25 mg/kg po dobu 49 dní na aktivitu katalázy (Kat, vlevo) a glutation peroxidázy (Px, vpravo) v játrech myší

## SOD



Graf 5.13: Vliv železa v dávce 10 mg/kg po dobu 3 dní a quercetinu v dávce 4.25 mg/kg po dobu 49 dní na aktivitu superoxid dismutázy (SOD U na gram hemoglobinu) v erytrocytech myší

Tabulka 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 koncentraci železa v orgánech myší (v pg na gram vlhké váhy)

	JÁTRA	LEDVINY	SLEZINA	SRDCE	MOZEK
Kontrola	118 ± 22	40.8 ± 3.1	490 ± 154	70 ± 4	15.1 ± 1.4
Fe	262 ± 38***	52.7 ± 5.1***	658 ± 99*	78 ± 3**	16.2 ± 1.2
Fe + Quercetin	271 ± 63***	51.3 ± 4.8***	645 ± 158	74 ± 7	16.5 ± 1.1
Quercetin	104 ± 16	45.8 ± 9.3	448 ± 132	68 ± 3	16.5 ± 1.9

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 OXIDA NÍ STRES

Podobn jako quercetin, také silibinin je látka s antioxida ním potenciálem. N které studie dokazují jeho antioxida ní ú inek a p edpokládá se, že silibinin je spíše vycytává em volných radikál , a koliv jeho afinita k železu m že také mít význam (Psotová et al, 2002; Bhattacharya et al, 2000). Cílem následujících pokus bylo zjistit vliv silibininu na antioxida ní systém myši. Dále jsme cht li posoudit, zda afinita silibininu k železu (Borsari et al, 2001) pozitivn ovliv uje oxida ní stres zp sobený železem, a také byl sledován vliv silibininu na hladinu n kterých prvk ve vybraných orgánech.

Silibinin (Sigma-Aldrich) byl podáván per os v r zných dávkách ve form disperze v 0.25% roztoku metylcelulózy. Železo jako síran železnatý bylo aplikováno intraperitoneáln v dávce 10 mg železa na kilogram váhy ve vodném roztoku. Všechny roztoky byly p ipraveny erstv p ed aplikací.

#### 5.3.1 Silibinin 48 mg na kilogram váhy po dobu 10 dní

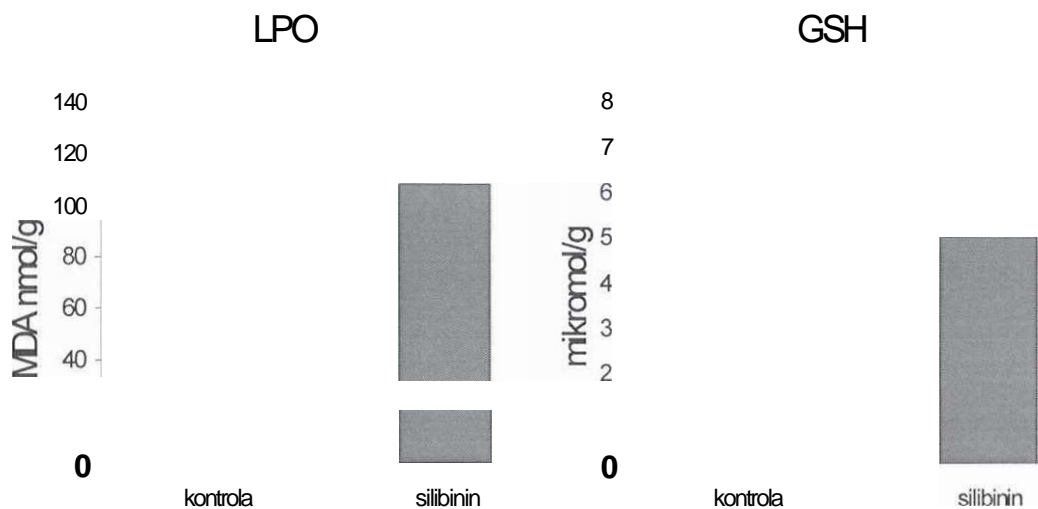
V tomto pokuse byl podáván silibinin v dávce 48 mg na kilogram váhy jednou denn po dobu 10 dní. Kontrolní skupina dostávala 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš. V obou skupinách bylo po osmi zví atech.

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 prvk byla stanovena ve všech vybraných orgánech.

Výsledky:

Lipoperoxidace v jaterním homogenátu byla významn zvýšená po podání silibininu z kontrolních 51.38 na 108.05 nmol MDA/g ( $p < 0.001$ , Graf 5.14).

Hladina redukovaného glutationu byla naopak významně nižší u silibininové skupiny vzhledem ke kontrolním zvířatům (4.99 proti 6.39 pmol/g,  $p < 0.001$ , Graf 5.14).



*Graf 5.14: Vliv silibininu v dávce 48 mg/kg po dobu 10 dní na lipoperoxidaci (LPO, vlevo) a hladinu redukovaného glutationu (GSH, vpravo) v játrech myši*

Silibinin zvýšil hladinu zinku a manganu v játrech, a železa v ledvinách (Tabulka 5.7).

**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 redukovaného glutationu (78% kontrolních hodnot).

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

Tabulka 5.7 - Vliv silibininu v dávce 48 mg/kg po dobu 10 dní na koncentraci stopových prvků v orgánech myši (v pg na gram vlhké váhy).

	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe
<b>JÁTRA</b>					
Kontrola	28.7 ± 4.0	231 ± 17	22.7 ± 1.6	4.42 ± 0.69	95.4 ± 18.0
Silibinin	28.5 ± 2.9	245 ± 9	27.8 ± 3.8**	5.66 ± 0.62**	122.7 ± 36.2
<b>LEDVINY</b>					
Kontrola	42.4 ± 2.1	196 ± 5	16.8 ± 0.5	3.40 ± 0.23	43.8 ± 1.9
Silibinin	42.5 ± 2.0	198 ± 9	16.9 ± 0.8	3.36 ± 0.19*	48.0 ± 3.0**
<b>MOZEK</b>					
Kontrola	37.1 ± 4.6	159 ± 3	13.2 ± 0.3	2.95 ± 0.23	14.7 ± 1.3
Silibinin	43.9 ± 13.0	160 ± 4	13.1 ± 1.3	3.12 ± 0.30	15.5 ± 1.2

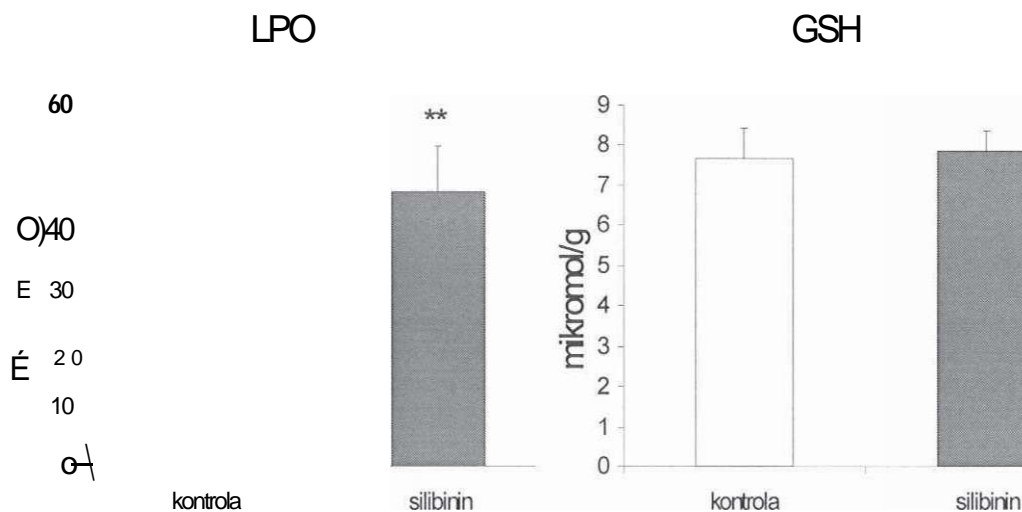
### 5.3.2 Silibinin 12 mg na kilogram váhy po dobu 21 dní

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 redukovaného glutationu, a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. Ve všech vybraných orgánech byla stanovena hladina prvků.

Výsledky:

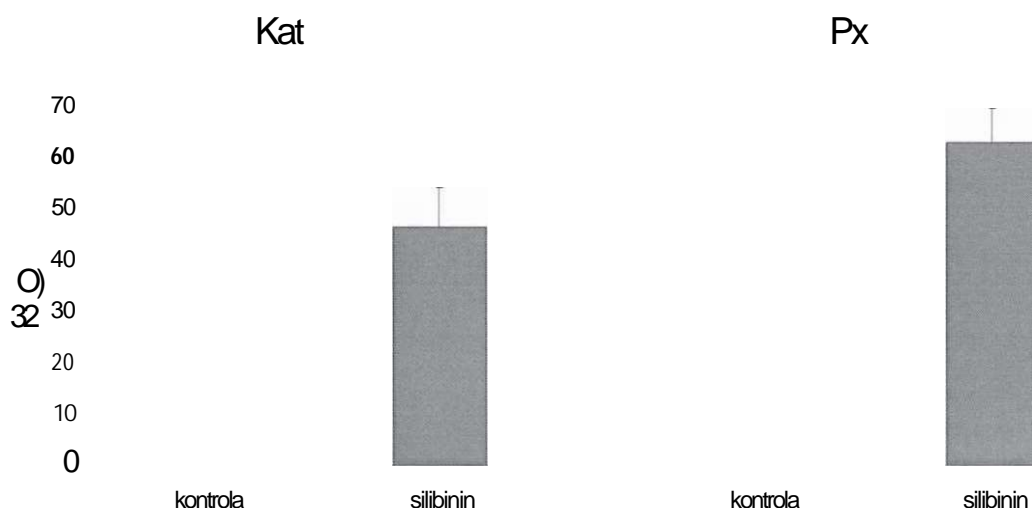
Lipoperoxidace v jaterním homogenátu byla zvýšená po podání silibininu z kontrolních 37.19 na 45.47 nmol MDA/g ( $p < 0.01$ , Graf 5.15).



Graf 5.15: Vliv silibininu v dávce 12 mg/kg po dobu 21 dní na lipoperoxidaci (LPO, vlevo) a hladinu redukováného glutationu (GSH, vpravo) v játrech myší

Silibinin neml vliv na hladinu redukováného glutationu a aktivitu katalázy a glutation peroxidázy (Graf 5.15 a 5.16).

Došlo ke zvýšení koncentrace m di v ledvinách a ho íku v mozku (Tabulka 5.8).



Graf 5.16: Vliv silibininu v dávce 12 mg/kg po dobu 21 dní na aktivitu katalázy (Kat, vlevo) a glutation peroxidázy (Px, vpravo) v játrech myší

Tabulka 5.8 - Vliv silibininu v dávce 12 mg/kg po dobu 21 dní na koncentraci stopových prvků v orgánech myší (v pg na gram vlhké váhy)

	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe
<b>JÁTRA</b>					
Kontrola	37.8 ±2.6	232 ±4	23.5 ± 1.8	4.56 ±0.68	74.9 ±18.0
Silibinin	39.3 ±6.6	233 ±8	23.2 ±2.3	4.06 ±0.48	84.5 ±33.7
<b>LEDVINY</b>					
Kontrola	42.8 ±6.0	194 ±28	17.0 ± 0.5	3.63 ±0.23	40.8 ±1.4
Silibinin	44.3 ±6.2	209 ± 27	16.7 ±0.5	3.39 ± 0.14*	38.8 ±3.1
<b>MOZEK</b>					
Kontrola	37.9 ±7.6	147 ±2	12.4 ±0.4	3.17 ± 0.17	13.5 ± 1.3
Silibinin	45.5 ±14.5	143 ±4*	13.2 ± 1.9	3.21 ±0.18	13.3 ± 0.9



Záv r:

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

Zm ny koncentrací m di v ledvinách a ho íku v mozku byly statisticky významné, nicmén velmi mírné.

### 5.3.3 Silibinin 6 mg na kilogram váhy po dobu sedmi týdn

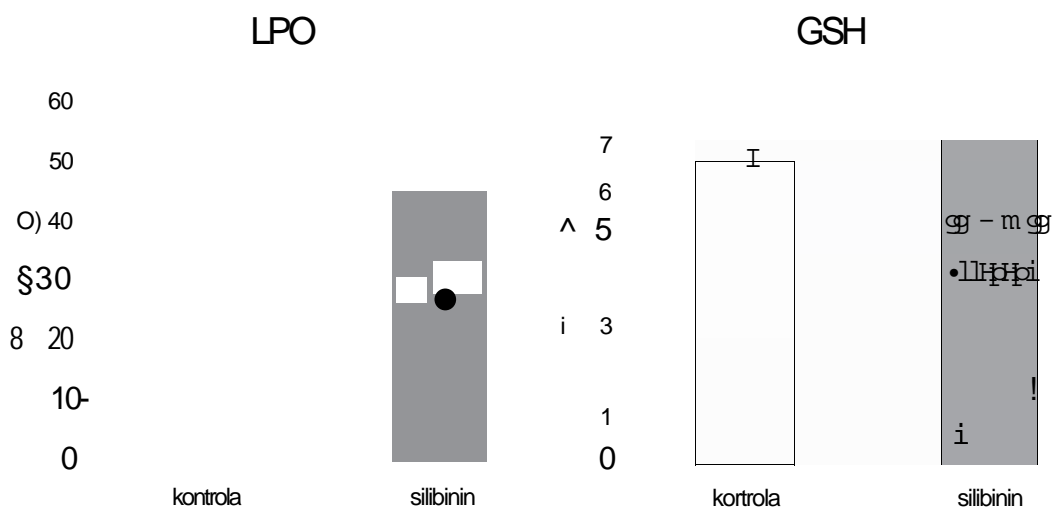
V tomto pokuse byl podáván silibinin v dávce 6 mg na kilogram váhy jednou denn po dobu sedmi týdn . Kontrolní skupina dostávala 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš. V obou skupinách bylo po osmi zví atech.

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 prvk .

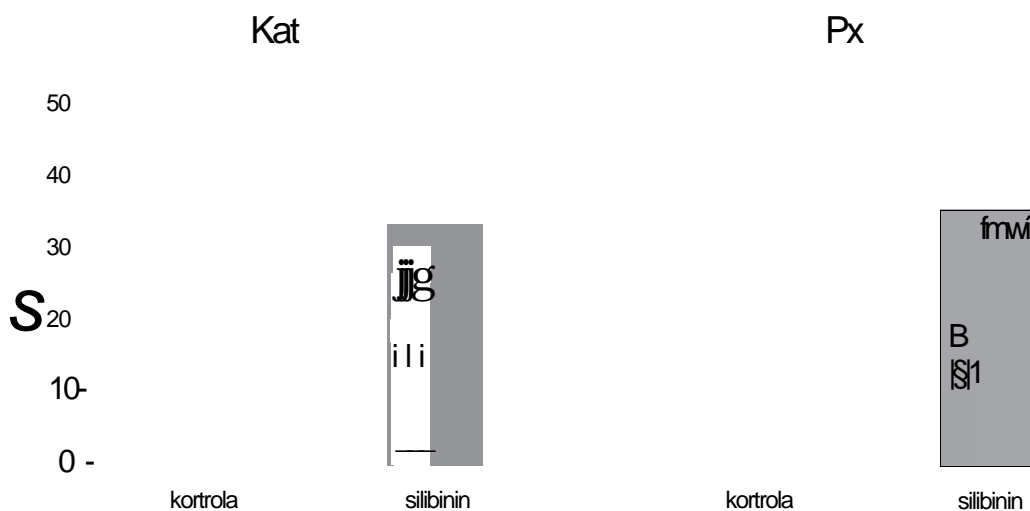
Výsledky:

Lipoperoxidace, hladina redukovaného glutationu, a aktivita katalázy, glutation peroxidázy a superoxid dismutázy nebyly ovlivn ny podáním silibininu (Graf 5.17, 5.18 a 5.19).

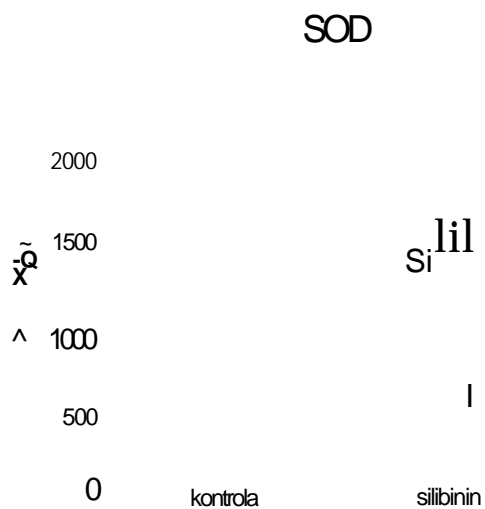
Koncentrace ho íku v srdci a m di v mozku byla po podání silibininu snížena (Tabulka 5.9).



Graf 5.17: Vliv silibininu v dávce 6 mg/kg po dobu 49 dní na lipoperoxidaci (LPO, vlevo) a hladinu redukovaného glutationu (GSH, vpravo) v játrech myší



Graf 5.18: Vliv silibininu v dávce 6 mg/kg po dobu 49 dní na aktivitu katalázy (Kat, vlevo) a glutation peroxidázy (Px, vpravo) v játrech myší



*Graf 5.19: Vliv silibininu v dávce 6 mg/kg po dobu 49 dní na aktivitu superoxid dismutázy (SOD U na gram hemoglobinu) v erythrocytech myší*

Tabulka 5.9 - Vliv silibininu v dávce 6 mg/kg po dobu 49 dní na koncentraci stopových prvků v orgánech myši (v pg na gram vlhké váhy).

	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe
<b>JÁTRA</b>					
Kontrola	24.4 ± 1.8	233 ± 4	24.9 ± 1.4	5.14 ± 0.97	118 ± 22
Silibinin	25.8 ± 4.0	231 ± 14	23.2 ± 2.2	4.48 ± 0.61	95 ± 19
<b>LEDVINY</b>					
Kontrola	35.8 ± 2.0	195 ± 7	17.1 ± 0.6	3.40 ± 0.13	40.8 ± 3.1
Silibinin	35.0 ± 1.9	192 ± 6	16.7 ± 0.7	3.32 ± 0.11*	38.4 ± 3.0
<b>MOZEK</b>					
Kontrola	28.7 ± 1.6	150 ± 3	12.3 ± 0.5	3.34 ± 0.21	15.1 ± 1.4
Silibinin	27.5 ± 1.1	147 ± 3	12.5 ± 0.5	3.07 ± 0.19*	15.8 ± 1.5
<b>SRDCE</b>					
Kontrola	19.6 ± 1.6	233 ± 10	17.8 ± 0.5	5.74 ± 0.27	70 ± 4
Silibinin	20.1 ± 1.5	223 ± 5*	17.3 ± 1.1	5.53 ± 0.24	68 ± 4
<b>SLEZINA</b>					
Kontrola	20.4 ± 4.7	247 ± 8	19.0 ± 0.8	0.96 ± 0.11	490 ± 154
Silibinin	21.3 ± 3.9	247 ± 6	18.7 ± 1.4	1.00 ± 0.24	410 ± 81

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).

Až do mírného poklesu koncentrace mědi v mozku a hořčíku v srdci byl statisticky významný, tato změna byla velice mírná.

#### 5.3.4 Interakce mezi silibininem a železem po týdenní aplikaci silibininu

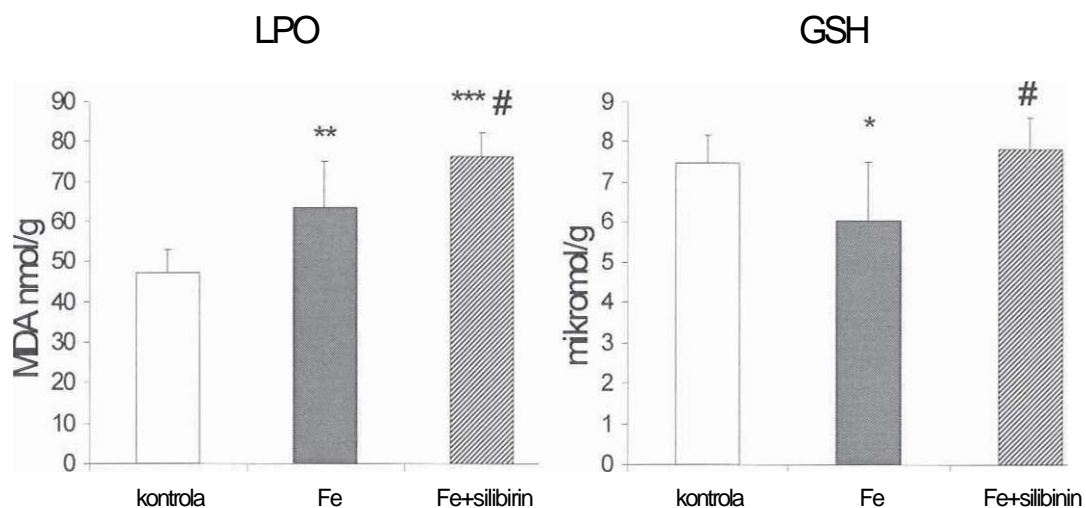
Myši byly rozděleny do tří skupin po 8 jedincích. Dvě skupiny dostávaly intraperitoneálně síran železnatý (10 mg železa na kilogram váhy) jednou denně po tři dny. Třetí skupina sloužila jako kontrola a dostávala 0.3 ml fyziologického roztoku intraperitoneálně po tři dny. Po dvoudenní pauze byl jedné ze skupin, která dostávala železo, podáván silibinin per os v dávce 12 mg na kilogram váhy jednou denně po dobu tří dnů. Zbývající 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 redukováného glutationu. V erythrocytech byla stanovena aktivita superoxid dismutázy. Ve všech vybraných orgánech byla stanovena hladina železa.

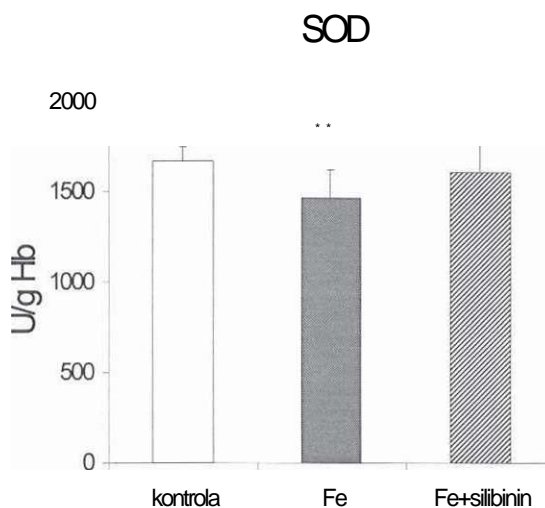
#### Výsledky:

Aplikace železa vedla ke zvýšení lipoperoxidace v jaterním homogenátu (z 47.09 na 63.65 nmol MDA/g,  $p < 0.01$ , Graf 5.20) a ke snížení hladin redukováného glutationu (z 7.48 na 6.03  $\mu\text{mol/g}$ ,  $p < 0.05$ , Graf 5.20). Aktivita superoxid dismutázy v erythrocytech byla snížena po podání železa ( $p < 0.05$ , Graf 5.21). Silibinin ještě více zvýraznil železem indukovanou lipoperoxidaci ( $p < 0.05$  v i skupin se železem, Graf 5.20). Silibinin srovnal snížené hladiny redukováného glutationu na kontrolní hodnoty (Graf 5.20). Aktivita superoxid dismutázy nebyla silibininem ovlivněna (Graf 5.21).

Koncentrace železa se po podání síranu železnatého zvýšila v játrech, srdci a slezině. Silibinin neovlivnil hladinu železa ve vybraných orgánech (Tabulka 5.10).



Graf 5.20: 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 myší



Graf 5.21: 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 aktivitu superoxid dismutázy (SOD U na gram hemoglobinu) v erytrocytech myší

Tabulka 5.10 - Vliv železa v dávce 10 mg/kg po dobu 3 dní a silibininu v dávce 12 mg/kg po dobu 3 dní na koncentraci železa v orgánech myší (v pg 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 + Silibinin	186 ±41***	44.7 ±3.9	563 ±141**	59.2 ±4.3*	16.9 ± 1.3

Záv r:

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.

## 5.4 Vliv bisfosfonátů na oxidační stres

Bisfosfonáty dnes zaujímají významné postavení v léčbě celé řady metabolických onemocnění skeletu. A koliv jejich hlavním mechanismem účinku je inhibice osteoklastů, zdá se, že mezi jejich dalšími aktivitami by mohly patřit také antioxidantní účinky (Dombrecht et al, 2003; Kljuchnikov et al, 1993). Cílem následujících pokusů bylo zjistit vliv bisfosfonátů na antioxidantní 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 Kutilek, 2004). Risedronat (Actonel® 35 mg), clodronat (Bonafos® 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 před aplikací.

### 5.4.1 Vliv bisfosfonátů na antioxidantní systém myši

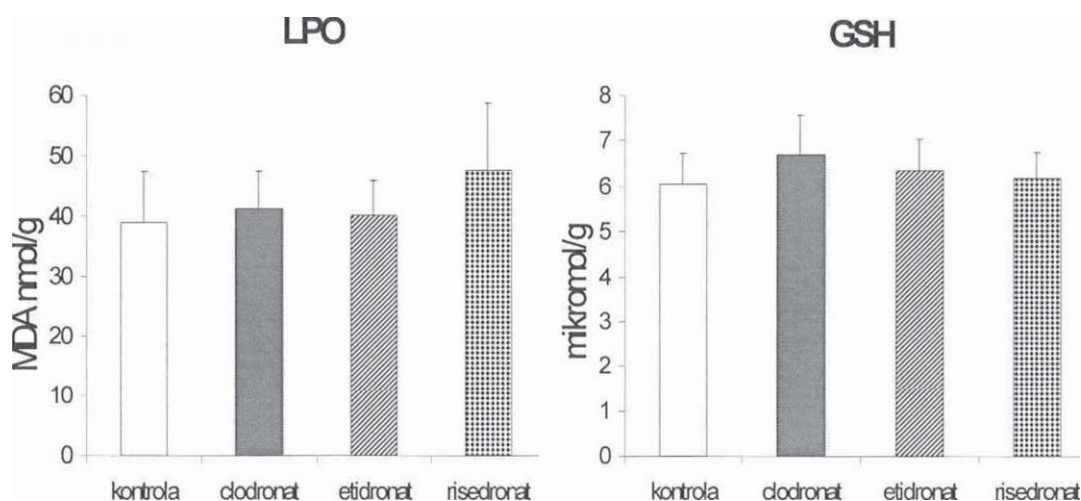
Vybrané bisfosfonáty byly podávány per os v dávce 100 mg na kilogram váhy jednou denně po dobu 5 dnů. Kontrolní skupina dostávala 0.25% metylcelulózu v množství 0.3 ml na myš. Ve všech skupinách bylo po osmi zvířatech.

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



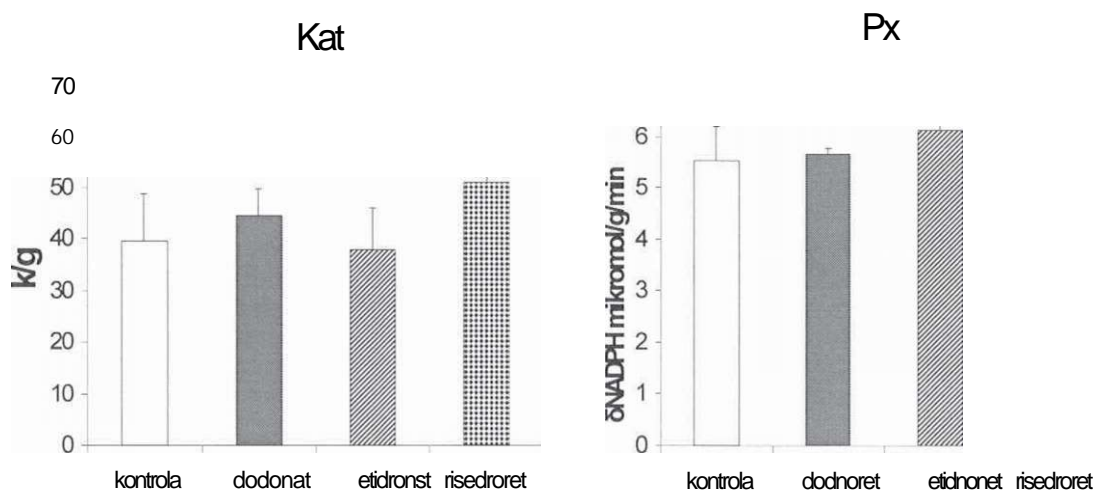
Výsledky:

Míra lipoperoxidace, hladina redukovaného glutationu, a aktivita katalázy a glutation peroxidázy v jaterním homogenátu nebyly bisfosfonáty ovlivněny (Graf 5.22 a 5.23).



Graf 5.22: Vliv clodronatu, etidronatu a risedronatu v dávce 100 mg/kg po dobu 5 dní na lipoperoxidaci (LPO, vlevo) a hladinu redukovaného glutationu (GSH, vpravo) v játrech myší

Clodronat snížil koncentraci vápníku v játrech, zinku v ledvinách a femuru, a hořčíku a manganu v srdci. Etidronat snížil koncentraci vápníku v játrech a femuru, zinku v ledvinách a femuru, hořčíku v srdci, a manganu v srdci a ve slezině. Risedronat zvýšil koncentraci zinku v játrech a snížil koncentraci manganu v srdci (Tabulka 5.11).



Graf 5.23: Vliv clodronátu, etidronátu a risedronátu v dávce 100 mg/kg po dobu 5 dní na aktivitu katalázy (Kat, vlevo) a glutation peroxidázy (Px, vpravo) v játrech myší

Záv r:

Podávání bisfosfonát v dávce 100 mg na kilogram váhy neovlivnilo ani jeden ze sledovaných parametr oxida ního poškození (lipoperoxidace, redukovaný glutation, aktivita katalázy a glutation peroxidázy).

Zm ny v koncentraci prvku se nejvíce týkaly zinku (ledviny a femur) a až na výjimky byly na hranici statistické významnosti.

Tabulka 5.11 - Vliv clodronatu, etidronatu a risedronatu v dávce 100 mg/kg po dobu 5 dní na koncentraci stopových prvků v orgánech myši (v pg na gram vlhké váhy).

	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe
<b>JÁTRA</b>					
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
<b>LEDVINY</b>					
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
<b>MOZEK</b>					
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
<b>SRDCE</b>					
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 5.11 - Pokračování

	Ca	Mg	Zn	Cu	Fe
<b>SLEZINA</b>					
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
<b>FEMUR</b>					
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

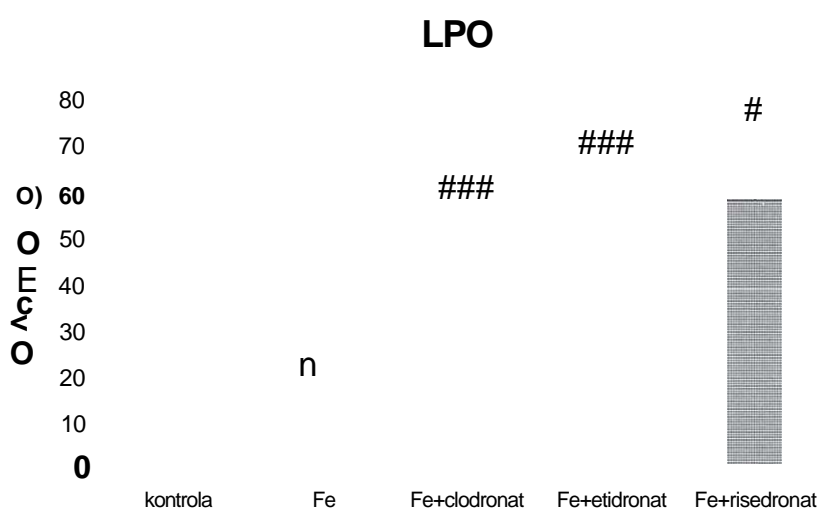
#### 5.4.2 Interakce mezi bisfosfonáty a železem

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 téhož dne v dávce 10 mg na kilogram váhy po dobu tří dnů všem skupinám s bisfosfonáty a jedné kontrolní. Zbýlá 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 redukovaného glutationu, a aktivita glutation peroxidázy a katalázy. Koncentrace prvků byla stanovena ve všech vybraných orgánech.

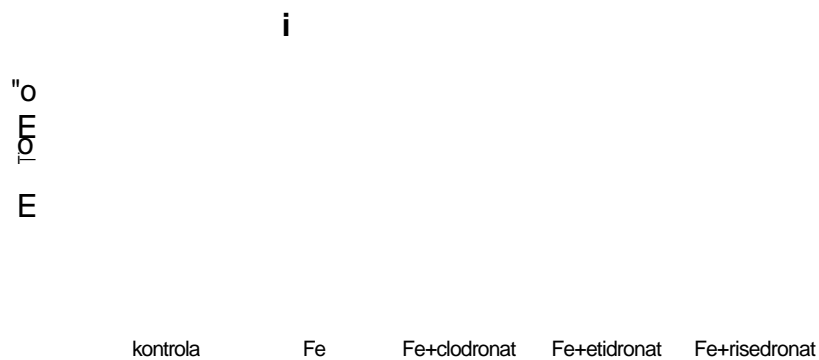
Výsledky:

Podání železa vedlo k zvýšení lipoperoxidace v jaterním homogenátu z kontrolních 39.21 na 73.68 nmol MDA/g ( $p < 0.001$ , graf 5.24), ale neovlivnilo hladinu redukovaného glutationu, nebo aktivitu katalázy a glutation peroxidázy (Graf 5.25, 5.26 a 5.27).

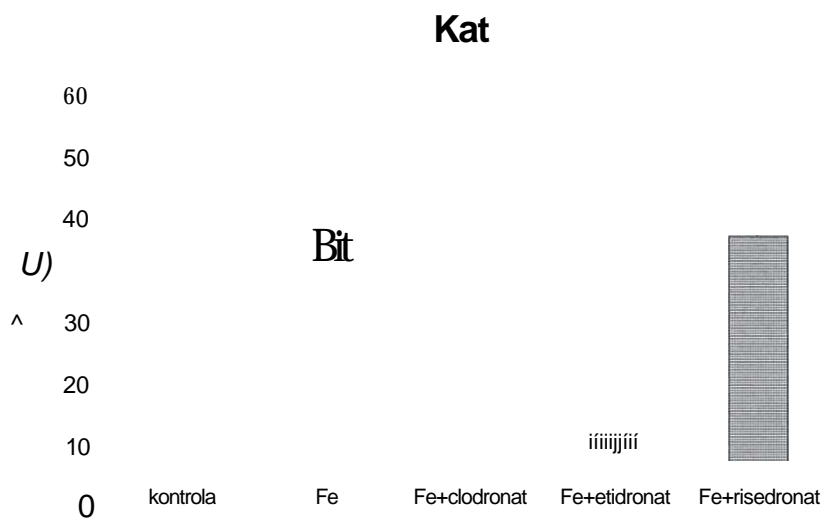


Graf 5.24: Vliv železa v dávce 10 mg/kg a clodronatu, etidronatu a risedronatu v dávce 100 mg/kg na lipoperoxidaci (LPO) v játrech myši

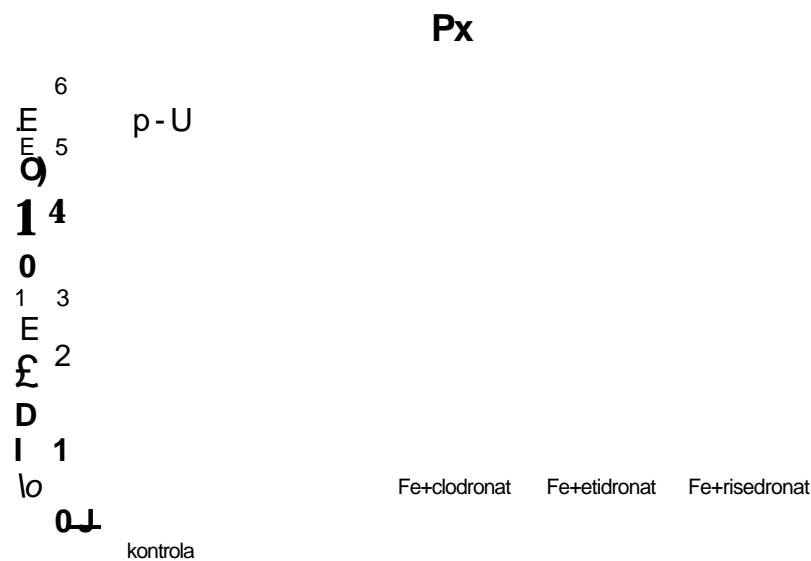
Clodronat, etidronat a risedronat významně snížily železem indukovanou lipoperoxidaci, která se v případě clodronatu rovnala kontrolním hodnotám (Graf 5.24). Hladina redukovaného glutationu byla zvýšená po podání všech bisfosfonátů se železem (Graf 5.25). Ani jeden bisfosfonát neměl vliv na aktivitu katalázy a glutation peroxidázy (Graf 5.26 a 5.27).



Graf 5.25: Vliv železa v dávce 10 mg/kg a clodronatu, etidronatu a risedronatu v dávce 100 mg/kg na hladinu redukovaného glutationu (GSH) v játrech myší



Graf 5.26: Vliv železa v dávce 10 mg/kg a clodronatu, etidronatu a risedronatu v dávce 100 mg/kg na aktivitu katalázy (Kat) v játrech myší



*Graf 5.27: Vliv železa v dávce 10 mg/kg a clodronatu, etidronatu a risedronatu v dávce 100 mg/kg na aktivitu glutathion peroxidázy (Px) v játrech myši*

Podání síranu železnatého zvýšilo koncentraci železa v játrech a slezin . Podání risedronatu se železem vedlo k dalšímu zvýšení koncentrace železa v játrech ( $p < 0.01$ ). Podání etidronatu nebo clodronatu se železem nem lo vliv na zvýšené hladiny železa v játrech. Ani jeden bisfosfonát se železem nezm nil zvýšené hladiny železa ve slezin . 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 5.12).

Po podání železa byla snížena hladina m di v ledvinách a femuru, a vápníku a ho íku ve femuru. Risedronat vrátil hladinu m di v ledvinách a ve femuru, a vápníku a ho íku ve femuru ke kontrolním hodnotám. Podání etidronatu vedlo k vyšším hodnotám m di v ledvinách a ve femuru, a vápníku a ho íku ve femuru proti kontrolní skupin . Podání clodronatu se železem dále snížilo koncentraci ho íku a zinku v mozku ( $p < 0.01$  proti kontrole) a ho íku v ledvinách a srdci ( $p < 0.05$  proti železu). Podání etidronatu se železem zvýšilo koncentraci ho íku a zinku v játrech, vápníku, ho íku a zinku v ledvinách, zinku ve femuru, ho íku,

zinku a m di v srdci a ve slezin . Koncentrace ho íku a zinku byla po podání etidronatu a železa nižší v mozku. Podání risedronatu se železem zvýšilo hladinu vápníku a zinku v ledvinách, ho íku, zinku a m di v srdci a zinku a m di ve slezin . Koncentrace ho íku a zinku byla po podání risedronatu a železa nižší v mozku (Tabulka 5.13).

Tabulka 5.12 - Vliv železa v dávce 10 mg/kg a clodronatu, etidronatu a risedronatu v dávce 100 mg/kg na koncentraci železa v orgánech myší

	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 5.13 - 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 pg na gram vlhké váhy).

	Ca	Mg	Zn	Cu
<b>JÁTRA</b>				
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 <sub>##</sub> ±1.6	4.80 ±0.63
Fe + Risedronat	28.5 ±2.8	223 ±18	23.6 ±2.5	4.11 ±0.95
<b>LEDVINY</b>				
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 <sub>##</sub> // 4 ii ii ii	227 ±9	18.8 ±0.6	4.03 ±0.21 * * ii ii ii ii ii ii
Fe + Risedronat	46.6 ±1.7 ii ii ii	208 ±11	17.7 <sub>#</sub> ±0.7 ii ii ii	3.78 ±0.25 ii ii ii ii ii ii
<b>MOZEK</b>				
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 <sub>*</sub> ± 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 5.13 - Pokra ování

	Ca	Mg	Zn	Cu
<b>SRDCE</b>				
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 <sub>#</sub> ±10	17.5 ± 1.3	5.46 ±0.29
Fe + Etidronat	33.2 ±8.9	256 <sub>###</sub> ±18 <sub>ii if ii</sub>	21.1 ±1.2 <sub>***HHit</sub>	6.56 ±0.32 <sub>***Hifti</sub>
Fe + Risedronat	27.6 ±1.8	235 ± 20 <sub>*</sub>	19.5 ± 1.4 <sub>ii ii ii</sub>	5.95 ±0.34
<b>SLEZINA</b>				
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 <sub>###</sub> ±14 <sub>ii / i ii</sub>	20.4 ±0.9 <sub>***ititij</sub>	1.34 ± 0.16
Fe + Risedronat	34.6 ±4.6	260 ±13	18.1 <sub>#</sub> ±0.9	1.31 <sub>#</sub> ±0.23
<b>FEMUR</b>				
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 <sub>*</sub> ± 6.9	1.29 ± 0.13	73.2 ±5.8	2.48 ±0.14
Fe + Etidronat	134.7 ±10.1 <sub>ii ii ii</sub>	1.92 ±0.26 <sub>*-4 ii ii ii</sub>	99.9 ±13.5	3.56 ±0.31 <sub>***nmt</sub>
Fe + Risedronat	107.9 <sub>#</sub> ±13.2	1.58 <sub>##</sub> ±0.18	81.8 ± 9.8	2.93 <sub>##</sub> ±0.28

Záv r:

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

Po podání síranu železnatého byla zvýšená koncentrace železa v játrech a slezin . Zatímco clodronat a etidronat nem ly na zvýšenou koncentraci železa v t chto orgánech vliv, risedronat ješt výrazn ji zvýšil koncentraci železa v játrech (ve srovnání se skupinou, které bylo aplikováno železo), ale nem l vliv na hladinu železa ve slezin . Kombinace železa s etidronatem nebo risedronatem vedla ke zvýšení koncentrace železa ve femuru, ledvinách a srdci, a koliv samotný síran železnatý hladinu železa ve zmín ných orgánech nezm nil. Kombinace železa s clodronatem, etidronatem nebo risedronatem snížila hladinu železa v mozku, a koliv samotný síran železnatý tuto hodnotu nezm nil.

Bisfosfonáty významn ovlivnily koncentrace stopových prvk ve vybraných orgánech. Podání risedronatu vrátilo železem snížené koncentrace vápníku, ho íku a m di ve femuru, a m di v ledvinách na kontrolní hodnoty, zatímco podání etodrinatu vedlo dokonce k vyšším koncentracím t chto prvk ve zmín ných orgánech než u kontrolní skupiny. Clodronat nem l na železem zm n né koncentrace prvk ve femuru a v ledvinách vliv. Zdá se, že nejaktivn jším bisfosfonátem z hlediska zm n stopových prvk ve vybraných orgánech byl etidronat, a zinek a ho ík byly nejvíce citlivé na p sobení bisfosfonát .

## 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 glutathionu a sníženou aktivitu superoxid dismutázy po intraperitoneální aplikaci železa. Naopak zvýšený přísun železa v dietě měl na hladinu redukovaného glutathionu opačný vliv a podobný výsledek, tedy zvýšenou hladinu redukovaného glutathionu, 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 glutathion peroxidázy. Naopak dieta s nižším obsahem železa aktivitu glutathion peroxidázy mírně snížila a také hladina redukovaného glutathionu 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 kumulaci 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, manganu a zinku po aplikaci železa a už intraperitoneálně nebo v dietě. Dieta se sníženým obsahem železa hladinu zinku a manganu 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 vyšším obsahem vápníku. Vliv zvýšeného příjmu železa na depleci zinku byl popsán (Válko et al, 2005).

V našich pokusech jsme pozorovali jak antioxida ní, tak prooxida ní ú inek quercetinu v závislosti na dávce a délce podávání. Dávka 8.5 mg po dobu 21 nebo šesti dn vedla k nár stu lipoperoxidace v játrech. Avšak dávka 4.25 mg po dobu 49 dní lipoperoxidaci v játrech naopak snížila. Nicmén quercetin v žádné podané dávce neovlivnil železem indukovanou lipoperoxidaci. Antioxida ní a prooxida ní ú inky quercetinu v závislosti na dávce byly popsány v dalších studiích (Stadler et al, 1995; Sahu a Washington, 1991).

Hladina redukovaného glutationu byla snížena po podání 8.5 mg quercetinu po dobu 21 dní. Na druhou stranu jsme pozorovali, jak železem snižená hladina redukovaného glutationu byla srovnána ke kontrolní skupin po p idání stejné dávky quercetinu po dobu t í dn .

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

N kolik publikací uvádí chelata ní vlastnosti *in vitro* a jejich význam v antioxida ní m p sobení quercetinu (Afanas'ev et al, 1989; Morel et al, 1993 a Sestili et al, 1998). V našich pokusech jsme pouze jednou pozorovali mírné snížení nahromad ného železa v játrech quercetinem. Nicmén lipoperoxidace indukovaná železem z stala i zde neovlivn na quercetinem a quercetin neovlivnil koncentraci železa v ostatních orgánech.

Quercetin velmi mírn zasáhl do koncentrace ho íku v játrech a mozku, a zinku v ledvinách. Na rozdíl od n kterých studií (Kuo et al, 1998 a Sugihara et al, 1999) jsme nepozorovali interakce mezi železem a m dí.

Výsledky našich pokus *in vivo* se pon kud rozcházejí s charakteristikou quercetinu jako významného antioxidancia a látky s chelata ními vlastnostmi (Afanas'ev et al, 1989; Morel et al, 1993; Sestili et al, 1998 aj.). Quercetin nem l vliv na železem vyvolaný oxida ní stres, s výjimkou pozitivního ú inku na železem snižené hladiny redukovaného glutationu. P sobení samotného quercetinu je však závislé na dávce, kdy vyšší dávky mají prooxida ní ú inek (indukce lipoperoxidace), zatímco nižší dávky lipoperoxidaci snižují a také zvyšují aktivitu glutation peroxidázy. Takováto závislost ú inku na dávce byla n kolikrát popsána (Stadler et al, 1995; Sahu a Washington, 1991).

V našich pokusech jsme sledovali jak antioxida ní tak prooxida ní ú inek silibininu a tento ú inek byl závislý na dávce podáváného silibininu. Silibinin v dávce 48 mg po dobu deseti dní výrazn 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 nezmenila míru lipoperoxidace v játrech. Navíc silibinin ještě více prohloubil železem indukovanou lipoperoxidaci. Tyto výsledky nepodporují publikované vlastnosti silibininu jako antioxida ní látky (Psotová et al, 2002; Bhattacharya et al, 2000; Basaga et al, 1997).

Ú inek silibininu na hladinu redukováného glutationu byl mén 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 antioxida ní ú inek silibininu publikovaný v několika pracích (Basaga et al, 1997; Mira et al, 1994).

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

Předpokládá se, že antioxida ní ú inek silibininu spoívá ve schopnosti vychytávat volné radikály (Psotová et al, 2002), a koliv v několika pracích silibinin snížil oxida ní 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 mírn zvýšil koncentraci zinku a m di v játrech, snížil koncentraci m di v ledvinách a mozku, a ho íku v mozku a srdci.

Výsledky našich pokusů *in vivo* ukazují význam dávky silibininu na jeho ú inky. Vyšší dávky působily výrazn oxida ní, zatímco nízké nezpůsobovaly oxida ní stres, i když výrazné antioxida ní ú inky 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 auto i pozorovali protektivní ú inek silibininu proti poškození způsobenému železem u potkan

a tarbík , a ve kterých byla použita dávka 100 mg silybinu, ili nesporn vyšší než dávka, která v našich pokusech m la prooxida ní ú inek.

V ásti studující antioxida ní ú inky bisfosfonát na oxida ní stres vyvolaný podáním železa jsme zjistili, že lipoperoxidace indukovaná železem byla výrazn snížena všemi t emi bisfosfonáty. V p ípad clodronatu se tento parametr dokonce srovnal s kontrolními hodnotami. Dalším pozitivním ú inkem bisfosfonát byl vliv na hladinu redukovaného glutationu, která sice nebyla ovlivn na podáním železa, ale byla významn vyšší po podání bisfosfonát .

Sporná je role chelata níh vlastností bisfosfonát v jejich antioxida ní m p sobení. Clodronat a etidronat snížily lipoperoxidaci v játrech, ale nem ly 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 t í bisfosfonát nejnižší. Zdá se ale, že alespo v p ípad etidronatu a risedronatu jsme ur ité chelata ní vlastnosti prokázali, jak dokládají zvýšené koncentrace železa v ledvinách, srdci a femuru. Afinitu bisfosfonát k železu dokládá n kolik studií (Daley-Yates et al, 1992 a Kuljanin et al, 2002). Na druhou stranu Osterman et al, 1994 uvádí, že sou asné podání železa peroráln vede ke sníženému vst ebávání clodronatu, který v našich pokusech nem l na hladinu železa v orgánech vliv. Jistou výjimkou byl mozek, ve kterém podání všech t í bisfosfonát vedlo k velmi mírnému snížení koncentrace železa.

Lze tedy odvodit, že bisfosfonáty p sobí antioxida n , avšak mechanismus jejich antioxida ního ú inku z ejm nespo ívá 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 p icházejí v úvahu.

V našem modelu *in vivo* jsme nepozorovali ú inek bisfosfonát na aktivitu katalázy nebo glutation peroxidázy. Nicmén ani podání železa nem lo na aktivitu t chto enzym vliv.

Sledováním hladin stopových prvk ve vybraných orgánech jsme zjistili, že bisfosfonáty vykazují afinitu i k dalším kov m. Nejvíce ovlivn ým prvkem byl v našich pokusech zinek. Jeho hladina po podání nap íklad etidronatu byla významn zvýšená v játrech, ledvinách, srdci, femuru a slezin . O chelataci

zinku se zmi uje 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 manganu ve femuru, a manganu v ledvinách. Afinity bisfosfonátů nejen ke stopovým prvkům, ale i k těžkým kovům jako je olovo byla popsána (Aaseth et al, 1999).



## 7 SHRNU TÍ

### 7.1 ŽELEZO

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

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

### 7.2 QUERCETIN

V závislosti na dávce byl prokázán jak antioxidantní, tak prooxidativní účinek quercetinu u myši.

Vysoké dávky způsobily oxidativní poškození (indukce lipoperoxidace a pokles redukovaného glutathionu), zatímco nízké dávky podávané dlouhodobě způsobily antioxidantní (nižší lipoperoxidace, zvýšená aktivita glutathion peroxidázy).

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

### 7.3 SILIBININ

U silibininu byl prokázán převládající prooxidativní 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 neml 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 významně ovlivnily distribuci železa, ale i ostatních stopových prvků v organismu.

## 8 LITERATURA

Aaseth JA, Alexander J, Kotyzová D, Koutenský J, Míková 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

Beckman LE, Van Landeghem GF, Sikstrom C, Wahlin A, Markevarn B, Hallmans G, Lenner P, Athlin L, Stenling R, Beckman L., Interaction between haemochromatosis and transferrin receptors genes in different neoplastic disorders. *Carcinogenesis* 1999 Jul; 20 (7): 1231-3

Berg D, Gerlach M, Youdim MB, Double KL, Zecca L, Riederer P, Becker G., Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 2001 Oct; 79 (2): 225-36

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, Prior RL., Anthocyanines are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clin Chem* 1999 Apr; 45 (4): 574-6

Cao G, Sofie E, Prior RL., Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radi 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, naringein, 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 CCl<sub>4</sub>-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

Cook NC, Samman S., Flavonoids: Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 1996 Feb; 7 (2): 66-76

Crespy V, Aprikian O, Morand C, Besson C, Manach C, Demigne C, Remesy C., Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *J Nutr* 2001 Dec; 131 (12): 3227-30

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

Daniels LB, Coyle PJ, Chiao YB, Glew RH, Labow RS., Purification and characterization of a cytosolic broad specificity beta-glucosidase from human liver. *J Biol Chem* 1981 Dec 25; 256 (24): 13004-13

Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G., Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 2000 Feb 25; 468 (2-3): 166-70

Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G., Deglycosilation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* 1998 Sep 25; 436 (1): 71-5

Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MR, Williamson G., Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radi Res* 2001 Dec; 35 (6): 941-52

Deprez S, Mila I, Scalbert A., Carbon-14 biolabeling of (+)-catechin and proanthocyanidin oligomers in willow tree cuttings. *J Agric Food Chem* 1999 Oct; 47 (10): 4219-30

Diav-Citrin O, Ko en 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 peroxyl radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J Nat Prod* 2000 Mar; 63 (3): 327-31

Ellervik C, Mandrup-Poulsen T, Nordestgaard BG, Larsen LE, Appleyard M, Frandsen M, Petersen P, Schlichting P, Saermark T, Tybjaerg-Hansen A, Birgens H., Prevalence of hereditary haemochromatosis in late-onset type 1 diabetes mellitus: a retrospective study. *Lancet* 2001 Oct 27; 358 (9291): 1405-

Erlund I, Alfthan G, Maenpaa J, Aro A., Tea and coronary heart disease: the flavonoid quercetin is more available from rutin in women than in men. *Arch Intern Med* 2001 Aug 13-27; 161 (15): 1919-20

Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpaa J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A., Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone

and rutin in healthy human volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2000 Nov; 56 (8): 545-53

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

Gopalan V, Pastuszyn A, Galey WR Jr, Glew RH., Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic beta-glucosidase. *J Biol Chem* 1992 Jul 15; 267 (20): 14027-32

Gúnzler 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

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

Hammerstone JF, Lazarus SA, Schmitz HH., Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. J Nutr 2000 Aug; 130 (8S Suppl): 2086S-92S

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 PC, Bijlsman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, Katan MB., The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. Free Radi Res 1999 Dec; 31 (6): 569-73

Hollman PC, Katan MB., Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. Food Chem Toxicol 1999 Sep-Oct; 37 (9-10): 937-42

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

Kerry N, Rice-Evans C., Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationship. J Neurochem 1999 Jul; 73 (1): 247-53

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, Vladykovskaya 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, Jankovi I, Nedeljkovi J, Prstojevi D, Marinkovi V., Spectrophotometric determination of alendronate in pharmaceutical 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

Leese HJ, Semenza G., On the identity between the small intestinal enzymes phlorizin hydrolase and glycosylceramidase. J Biol Chem 1973 Dec 10; 248 (23): 8170-3

Li J, Zhu Y, Singal DP., HFE gene mutations in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2000 Sep; 27 (9): 2074-7

Milman N, Pedersen P, Steig T, Byg KE, Graudal N, Fenger K., Clinically overt hereditary hemochromatosis in Denmark 1948-1985: epidemiology, factors of significance for long-term survival, and causes of death in 179 patients. Ann Hematol 2001 Dec; 80 (12): 737-44

Mira L, Silva M, Manso CF., Scavenging of reactive oxygen species by silibinin 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

Ng TB, Liu F, Wang ZT., Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci* 2000 Jan 14; 66 (8): 709-23

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

Olthof MR, Hollman PCH, Vree TB, Katan MB., Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J Nutr* 2000 May; 130 (5): 1200-3

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

Parkkila S, Niemela O, Savolainen ER, Koistinen P., HFE mutations do not account for transfusional iron overload in patients with acute myeloid leukaemia. *Transfusion* 2001 Jun; 41 (6): 828-31

Perez de Nanclares G, Castano L, Gaztambide S, Bilbao JR, Pi J, Gonzalez ML, Vazquez JA., Excess iron storage in patients with type 2 diabetes unrelated to primary hemochromatosis. *N Engl J Med* 2000 Sep 21; 343 (12): 890-1

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

Piga A, Gaglioti C, Fogliacco E, Tricta F., Comparative effects of deferiprone and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassemia major: a retrospective analysis. *Haematologica* 2003 May; 88 (5): 489-96.

Piskula MK, Terao J., Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugated enzymes in rat tissues. *J Nutr* 1998 Jul; 128 (7): 1172-8

Psotová 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

Rasmussen M, Folsom AR, Catellier DJ, Tsa MY, Garg U., A prospective study of coronary heart disease and the hemochromatosis gene (HFE) C282Y mutation: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. Eckfeldt JH., *Atherosclerosis* 2001 Feb 15; 154 (3): 739-46

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

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radi Biol Med* 1996; 20 (7): 933-56

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

Sayre LM, Perry G, Atwood CS, Smith MA., The role of metals in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000 Jun; 46 (4): 731-41

Sedlák 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 Radi Biol Med* 1998 Jul 15; 25 (2): 196-200

Soczynska-Kordala M, Bakowska A, Oszmianski J, Gabrielska J., Metal ion-flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. *Cell Mol Biol Lett* 2001; 6 (2A): 277-81

Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C., The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 1999 Sep 17; 458 (2): 224-30

Spencer JP, Schroeter H, Crossthwaithe AJ, Kuhnle G, Williams RJ, Rice-Evans C., Contrasting influences of glucuronidation and O-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radi Biol Med* 2001 Nov 1; 31 (9): 1139-46

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 Radi 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

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

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

Walker EM Jr, Walker SM., Effects of iron overload on the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000 Oct; 30 (4): 354-65

Walle T, Walle UK, Halushka PV., Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr* 2001 Oct; 131 (10): 2648-52

Warden BA, Smith LS, Beecher GR, Balentine DA, Clevidence BA., Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J Nutr* 2001 Jun; 131 (6): 1731-7

Wilkinson H., Haemochromatosis associated with arthritis and hypopituitarism. *Ann Clin Biochem* 1996 Mar; 33 (Pt 2): 171-3

Williamson G, Plumb GW, Garcia-Conesa MT., Glycosilation, esterification and polymerisation of flavonoids and hydroxycinnamates: effects on antioxidant properties. *Basic Life Sci* 1999; 66: 483-94

Yang Q, McDonnell SM, Khoury MJ, Cono J, Parrish RG., Hemochromatosis-associated mortality in the United States from 1979 to 1992: an analysis of Multiple-Cause Mortality Data. *Ann Intern Med* 1998 Dec 1; 129 (11): 946-53

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

