

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



Autoreferát disertační práce

**VLIV SILYMARINU, NARINGINU A RESVERATROLU NA
JATERNÍ POŠKOZENÍ VYVOLANÉ VYBRANÝMI
XENOBIOTIKY**

**The effect of silymarin, naringin and resveratrol on the liver
damage induced by some xenobiotics**

Mgr. Pavla Kovaříková, roz. Černá

Plzeň 2015

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného doktorského studijního programu Lékařská farmakologie na Ústavu farmakologie a toxikologie LF UK v Plzni.

Uchazeč: Mgr. Pavla Kovaříková, roz. Černá
Ústav farmakologie a toxikologie
Lékařská fakulta UK v Plzni

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

Oponenti:

Stanovisko k disertační práci vypracoval Ústav farmakologie a toxikologie LF UK v Plzni.

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu Lékařská farmakologie se koná dne: v: hod.

Místo obhajoby: Ústav farmakologie a toxikologie, Lékařská fakulta UK v Plzni,
Alej Svobody 76, Plzeň 301 00.

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

Předseda komise pro obhajobu disertačních prací v oboru Lékařská farmakologie:

Doc. MUDr. Jaroslav Koutenský, CSc.
Ústav farmakologie a toxikologie
Lékařská fakulta UK v Plzni

OBSAH:

1	ÚVOD	5
2	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	5
2.1	Jaterní poškození a role oxidačního stresu	5
2.1.1	Typy jaterního poškození	5
2.1.2	Oxidační stres v patologii jaterního poškození	6
2.1.3	Metody pro stanovení jaterního poškození	7
2.2	Studované hepatotoxické látky	8
2.2.1	Paracetamol	8
2.2.2	Thioacetamid	9
2.2.3	Tamoxifen	10
2.3	Studované potenciálně hepatoprotektivní látky	11
2.3.1	Silymarin	11
2.3.2	Naringin	12
2.3.3	Resveratrol	14
2.3.4	Deferipron	15
3	CÍL PRÁCE	16
4	MATERIÁL A METODY	17
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST, VÝSLEDKY	19
5.1	Vliv antioxidantů na intoxikaci paracetamolem	19
5.2	Vliv antioxidantů na intoxikaci thioacetamidem	23
5.3	Vliv antioxidantů na intoxikaci tamoxifenem	26
6	DISKUSE	32
7	SOUHRN	37
	Použitá literatura	39
	Přehled publikační činnosti autora	47

Abstrakt

Játra jsou hlavním orgánem metabolismu většiny exogenních látek. Biotransformací xenobiotik vznikají nejen biologicky neaktivní metabolity, ale též reaktivní produkty, které mohou vést k poškození buněčných struktur a následně celého orgánu. V patologii toxického či polékového poškození jater hraje významnou roli také oxidační stres. Endogenní či exogenní antioxidanty pomáhají udržovat rovnováhu mezi vznikem a odstraňováním reaktivních kyslíkových forem a tak zamezují oxidačnímu stresu.

V akutních pokusech na potkanech jsme sledovali účinky premedikace přírodních antioxidantů silymarinu (SIL), naringinu (NAR), resveratrolu (RES) a syntetického chelátoru deferipronu (L1) na poškození jater vyvolané paracetamolem (APAP), thioacetamidem (TAA) a tamoxifenem (TAM). Ke stanovení míry poškození jater jsme zvolili měření parametrů oxidačního stresu v jaterních homogenátech: hladina peroxidace lipidů (LP), koncentrace redukovaného glutathionu (GSH), aktivity antioxidantních enzymů glutathion peroxidázy (GPx) a katalázy (CAT), v některých případech byl měřen obsah železa v játrech. Dále byly stanoveny aktivity jaterních enzymů v séru: alanin aminotransferáza (ALT), aspartát aminotransferáza (AST), glutamát dehydrogenáza (GLDH).

Z hlediska oxidačního stavu se v toxickém poškození jater nejlépe uplatnil silymarin, který zmírnil TAA-indukovanou LP a zmírnil pokles aktivity CAT v porovnání s TAA skupinou; v pokusu s TAM silymarin zamezil TAM-navýšené lipoperoxidaci. Antioxidační potenciál naringinu se projevil v intoxikaci tamoxifenem, kde NAR zabránil TAM-indukované lipoperoxidaci. Premedikace resveratrole vedla k protektivnímu působení proti lipoperoxidaci vyvolané thioacetamidem. Deferipron zamezil TAM-zvýšené lipoperoxidaci a koncentraci železa v játrech a vykazoval tak významné protektivní působení proti oxidačnímu stresu. Z hlediska ovlivnění jaterních enzymů protektivně působil především resveratrol, jenž v pokusu s APAP vrátil na téměř kontrolní hodnoty zvýšené aktivity ALT, AST a GLDH; v pokusu s thioacetamidem vykazoval resveratrol protektivní účinek na zvýšenou aktivitu ALT. Premedikace naringinem vedla ke snížení ALT, AST a GLDH navýšených paracetamolem. Silymarin snížil aktivitu GLDH navýšenou paracetamolem a snížil aktivitu AST indukovanou thioacetamidem.

Hepatoprotektivní účinky silymarinu se nejvíce projevíly v poškození jater thioacetamidem. Naringin působil protektivně zejména v intoxikaci paracetamolem. Resveratrol vykazoval prospěšné účinky na jaterní poškození vyvolané paracetamolem i thioacetamidem.

Summary

The vast majority of exogenous substances is metabolized in the liver. In the course of the biotransformation, partly biologically non-active products, partly reactive species leading to cell structure injury and even to the liver failure are produced. Oxidative stress plays a significant role in the toxic- and drug-induced liver damage. Endogenous and exogenous antioxidants contribute to equilibrium between the production and the elimination of reactive oxygen species and thus prevent the oxidative stress.

In acute experiments in rats we examined the ability of natural antioxidants silymarin, naringin and resveratrol and of synthetic chelator deferipron to protect against liver damage induced by paracetamol, thioacetamide and tamoxifen. The following parameters of oxidative stress were measured in the liver homogenates: level of lipid peroxidation (LP), concentration of reduced glutathione (GSH), activities of glutathione peroxidase (GPx) and of catalase (CAT); in some cases the iron liver content. The following markers of liver damage were measured in serum: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glutamate dehydrogenase (GLDH).

Concerning markers of oxidative status, silymarin exerted the most efficient antioxidant properties ameliorating the TAA- and TAM-induced lipid peroxidation and ameliorating the TAA-induced CAT activity depletion. Antioxidant effect of naringin was demonstrated by protecting of TAM-induced lipid peroxidation. Protective effect was manifested by decreasing in TAA-induced lipid peroxidation. The deferipron administration prevented the TAM-induced oxidative stress protecting the increase in lipid peroxidation and the increase of iron content.

Concerning hepatotoxicity markers in serum, resveratrol premedication had the protective effect on the APAP-increased ALT, AST and GLDH activity and on the TAA-enhanced ALT activity. Naringin premedication resulted in a decrease of the APAP-enhanced ALT, AST and GLDH activity. Silymarin ameliorated the APAP-enhanced GLDH activity and the TAA-induced AST activity.

Silymarin was the most hepatoprotective agent in the thioacetamide-induced liver injury. Naringin served prevent in paracetamol-induced hepatotoxicity. Resveratrol exerted protective effect in paracetamol- and thioacetamide-induced liver damage.

1 ÚVOD

V našem životním prostředí roste počet xenobiotik, včetně léčiv, která jsou buď přímo, nebo potenciálně toxická. Játra jsou centrálním orgánem látkové přeměny organismu a hrají hlavní úlohu v metabolismu endogenních i cizorodých látek. Je třeba tedy počítat s jejich častějším poškozením nejrůznějšími hepatotoxickými látkami.

Poškození jater léčivy (DILI- Drug Induced Liver Injury) je příčinou asi 10 % všech případů akutní hepatitidy a je zodpovědné za asi 15 % případů akutního selhání jater s následnou transplantací. Hepatotoxicita je také jedním z nejdůležitějších důvodů neschválení nebo stažení léku z farmaceutického trhu. Rozeznat přítomnost DILI v biopsii je často velmi náročné, neboť histologický obraz lékového poškození jater se překrývá prakticky se všemi oblastmi patologie jater (Ehrmann, 2008).

Ačkoliv přesný mechanismus DILI není plně objasněn, působení zřejmě zahrnuje dva možné způsoby: přímou hepatotoxicitu a imunitní reakci. V mnohých případech je DILI iniciováno bioaktivací léčiva na chemicky reaktivní metabolit, který je schopen interakce s buněčnými makromolekulami (proteiny, lipidy, nukleové kyseliny), což vede k dysfunkci proteinů, peroxidaci lipidů, poškození DNA a oxidačnímu stresu (Holt, 2006).

Látky s antioxidačními účinky mohou preventivně působit proti tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů, které jsou běžně tvořeny při metabolismu xenobiotik a uplatňují se v procesech oxidačního stresu, a tak chránit organismus před škodlivými účinky cizorodých látek.

V našich pokusech jsme se zabývali interakcí přírodních antioxidantů (silymarin, naringin, resveratrol) s hepatotoxickými látkami paracetamolem, thioacetamidem a tamoxifenem. Dále byl zkoumán vliv deferipronu na poškození jater vyvolané tamoxifenem.

2 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

2.1 JATERNÍ POŠKOZENÍ A ROLE OXIDAČNÍHO STRESU

2.1.1 Typy jaterního poškození

Toxické či polékové poškození jater je charakterizováno poruchou jaterních funkcí a/nebo struktury jaterního parenchymu, které vznikají v kauzální souvislosti s užitím toxické látky či léku. Na jaterním poškození se může uplatňovat přímý, toxický účinek sloučeniny a jejích metabolitů, nebo imunopatologické mechanismy. Poškození jater léčivy se může projevit v celém spektru jaterních lézí: akutní nebo chronická hepatitida, steatóza, granulomatózní hepatitida, vaskulární léze a jiné. U hepatotoxických látek rozeznáváme primární a sekundární toxicitu (Brodanová, 2002):

a) primární (obligatorní, „intrinsic“) toxicita je spojena s přímým toxickým účinkem látky, lze ji předvídat na základě farmakologických údajů a je závislá na velikosti podané dávky. Je detekovatelná na zvířecích modelech. Příklady látek s primární hepatotoxicitou: paracetamol, salicyláty, chemoterapeutika, tetracyklin, metotrexát, merkaptopurin, sulindak.

b) sekundární (fakultativní, „idiosyncratic“) toxicita se objevuje nepředvídatelně, je na dávce nezávislá. Je výsledkem individuální reakce postiženého jedince. Tento typ poškození se vyskytuje častěji. Příklady sekundárních hepatotoxikantů: halotan, fenytoin, isoniazid, rifampicin.

Další klasifikace rozděluje jaterní poškození podle průběhu na akutní a chronické:

a) akutní poškození může mít cytotoxickou nebo cholestatickou formu.

Cytotoxická forma připomíná akutní hepatitidu a je charakterizována rozpadem hepatocytů. Odhaduje se, že tvoří 80-90 % polékových lézí a na jejím vzniku se podílí více než 100 léků (Brodanová, 2003). Klinické formy mohou být velice různé, od asymptomatických až po fulminantní i letální průběh. V laboratorním nálezu je charakteristické navýšení aktivity aminotransferáz a eosinofilie, podle typu také bilirubin. Nejčastější příčiny akutní toxické hepatitidy jsou: paracetamol, halotan, isoniazid, allopurinol aj.

Cholestatická forma je doprovázena poruchou vylučování žluče do střeva. V laboratorním nálezu je charakteristické navýšení aktivity alkalické fosfatázy (ALP) a gama-glutamyltransferázy (GGT). Nejčastější příčiny cholestatického poškození jsou: steroidní hormony, antikonvulziva, antidepressiva, aj.

b) chronické poškození (taktéž ve formě cytotoxické nebo cholestatické) může být způsobeno v důsledku virového, autoimunitního, metabolického či jiného onemocnění. Dochází k chronické stimulaci fibrogenese a následné zvýšené tvorbě vaziva. Konečným stadiem fibrózy je cirhóza. Některé studie poukazují na možnost reverzibility jaterní fibrózy (Sherlocková, 2004).

2.1.2 Oxidační stres v patologii jaterního poškození

Oxidační stres je spojován s řadou onemocnění a uplatňuje se také v toxicitě mnohých xenobiotik. Je charakterizován nerovnováhou mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku (nebo dusíku) ve prospěch jejich tvorby. Reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou vysoce reaktivní molekuly, které jsou v organismu přirozeně tvořeny v malém množství během metabolických reakcí. Mezi ROS patří jednak volné radikály (např. radikál superoxidový $O_2^{\cdot-}$, hydroxylový HO^{\cdot} , peroxylový ROO^{\cdot}), jednak látky, které nemají charakter radikálů, ale ty z nich mohou vznikat (např. H_2O_2 , $HClO$, O_3). ROS reagují s biomolekulami, jejichž strukturu a funkci poškozují. Za fyziologických podmínek je rovnováha udržována ochrannými mechanismy, ke kterým patří antioxidační enzymy (např. glutathion peroxidázy, kataláza, superoxid dismutáza) a endogenní antioxidanty (např. glutathion, thioly) (Štípek, 2000). Nadměrná produkce reaktivní volných radikálů má za následek oxidační poškození a vznik chemicky modifikovaných biomolekul. Výsledkem jsou buněčné a metabolické poruchy.

Volné radikály, které jsou generovány v blízkosti nukleových kyselin, mohou produkovat změny v jejich struktuře. Dochází např. ke štěpení kruhu deoxyribózy, modifikaci a poškození bází, zlomům v řetězcích. Následkem jsou mutace, translační chyby nebo inhibice proteosyntézy. V klinickém projevu dochází k apoptóze, metagenезi, karcinogenезi, strárnutí. Dále mohou být ovlivněny proteiny. Volné radikály způsobují strukturní změny proteinů např. agregaci, síťování, nebo fragmentaci bílkovinných molekul, reagují s hemovým

železem, modifikují funkční skupiny aminokyselin. Následkem těchto změn jsou modifikace v transportu iontů, ve funkci signálních molekul, v aktivitě enzymů, ve vzniku antigenních determinant. Porucha buňky vzniká též v souvislosti s poškozením mastných kyselin v lipidech. Působením volných radikálů dochází ke ztrátě dvojných vazeb, tvorbě reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy). Na peroxidaci lipidů jsou nejcitlivější dvojně vazby nenasyčených mastných kyselin ve fosfolipidové dvojvrstvě membrány. Následkem lipoperoxidace je změna fluidity a propustnosti membrány (Slater, 1984).

2.1.3 Metody pro stanovení jaterního poškození

Poruchy jaterních funkcí lze zjišťovat pomocí biochemických vyšetřovacích metod. Ty byly navrženy tak, aby splňovaly požadavky na rychlost, metodickou náročnost a cenovou dostupnost. V této práci byly použity tyto biochemické ukazatele poškození hepatocytů:

Alanin aminotransferáza (ALT) Enzym katalyzuje přenos aminoskupiny z alaninu na 2-oxoglutarát za vzniku pyruvátu a glutamátu; starší název glutamát-pyruvát-transamináza (GPT). ALT (EC 2.6.1.2) se vyskytuje v cytosolu hepatocytů a její obsah v jiných orgánech je nízký. Aktivita ALT v krvi se zvyšuje zejména u jaterního poškození, zánětu jater, městnání krve v játrech aj. Aktivita ALT v séru je nejčastější spolehlivý ukazatel hepatotoxického působení a je považován za „zlatý standard“ biochemických markerů jaterního poškození (Ozer, 2008).

Aspartát aminotransferáza (AST) Enzym katalyzuje přenos aminoskupiny z aspartátu na 2-oxoglutarát za vzniku oxaloacetátu a glutamátu; starší název glutamát-oxaloacetát-transamináza (GOT). AST (EC 2.6.1.1.) se vyskytuje v řadě orgánů, kromě jater též v srdci, kosterním svalu aj. Aktivita AST v krvi se zvyšuje zejména u akutního infarktu myokardu nebo u těžšího poškození jater. Má složku cytosolovou, která se uvolňuje z jater i při lehčím poškození, a mitochondriální, která bývá zvýšena u nekrózy hepatocytů. Větší vzestup v krvi signalizuje závažnější jaterní lézi (Schneiderka, 1998).

Oba enzymy, ALT i AST, vyžadují přítomnost kofaktoru, kterým je pyridoxal-5-fosfát. Na jeho pyridoxalovou část je při katalýze vázána NH_2 skupina donorové aminokyseliny, přičemž vzniká přechodně pyridoxamin-5-fosfát. Ten pak reaguje s oxokyselinou za vzniku glutamátu a regenerované aldehydové formy kofaktoru.

Glutamát dehydrogenáza (GLDH) L-glutamát: NAD(P)^+ oxidoreduktáza (EC 1.4.1.3.). Enzym katalyzuje oxidační deaminaci glutamátu za vzniku 2-oxoglutarátu. GLDH se nachází v mitochondriální matrix jaterních buněk, dále v ledvinách a nervové tkáni. Jeho zvýšené hladiny nalézáme při nekróze hepatocytů (O'Brien, 2002).

Míra oxidačního poškození jaterní tkáně byla sledována měřením produktu vznikajícího při radikálových reakcích a měřením obsahu fyziologických antioxidačních systémů. V této práci jsme sledovali tyto parametry:

Peroxidace lipidů (LP) Působením volných radikálů dochází k oxidativnímu poškození a degradaci polynenasycených mastných kyselin (peroxidaci lipidů). Jedním z konečných produktů štěpení řetězců mastných kyselin je malondialdehyd (MDA), jehož stanovení se využívá ke stanovení míry lipoperoxidace (Holley, 1993).

Redukovaný glutathion (GSH) Glutathion (γ -glutamylcysteinglycin) je látka důležitá pro udržení přiměřeného oxidoredukčního prostředí v buňkách. Slouží jako vychytávač reaktivních forem kyslíku, je substrátem glutathion peroxidáz a glutathion transferáz. Jeho snížená koncentrace je jedním z příznaků oxidačního stresu (DeLeve, 1991).

Glutathion peroxidáza (GPx) Glutathion peroxidáza (EC 1.11.1.9) je název pro rodinu selenoenzymů s peroxidázovou aktivitou. Hlavní biologickou funkcí cytosolové GPx je redukce peroxidu vodíku, organických peroxidů a peroxidů lipidů s využitím glutathionu jako redukčního činidla (Ursini, 1995).

Kataláza (CAT) Kataláza (EC 1.11.1.6) je enzym katalyzující štěpení peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Je to hemoprotein složený ze 4 podjednotek. Mezi enzymy má jedno z nejvyšších čísel přeměny (Jones, 1982).

2.2 STUDOVANÉ HEPATOTOXICKÉ LÁTKY

Pro experimenty byly vybrány následující hepatotoxické látky: paracetamol, thioacetamid a tamoxifen. Paracetamol je známý svým toxickým působením na játra a představuje akutní formu jaterního poškození. Thioacetamid je považován za experimentální model akutní i chronické toxicity. Hepatotoxické působení tamoxifenu se vyskytuje po chronickém podávání tohoto léčiva.

2.2.1 Paracetamol

Paracetamol (acetaminofen, N-acetyl-*p*-aminofenol, APAP) je běžně užívané a relativně bezpečné analgetikum- antipyretikum. V případě vysokých dávek (> 4 g/den) však způsobuje poškození jater. V zemích jako USA a Velká Británie je příčinou až 50 % případů akutního jaterního selhání (Lee, 2003). APAP je též zneužíván k suicidálním účelům (Amar, 2007).

Hepatotoxické účinky paracetamolu

Hepatotoxicita APAP je relativně dobře prostudovaná a je připisována přímému cytotoxickému působení metabolitu paracetamolu N-acetyl-*p*-benzochinoniminu (NAPQI) (Červený, 2013). Biotransformace paracetamolu probíhá cestou konjugace s kyselinou glukuronovou či sírovou, která eliminuje většinový podíl mateřské látky. Minoritní podíl (5 %) paracetamolu je metabolizován mikrozomálním systémem (CYP 2E1 nebo 1A2) za vzniku reaktivního metabolitu NAPQI (Slíva, 2013). Tento metabolit je za normálních okolností účinně odstraňován konjugací s glutathionem a vyloučen močí. V případě předávkování paracetamolem nebo u chronických alkoholiků jsou zásoby glutathionu vyčerpány, NAPQI není dostatečně inaktivován, kovalentně se váže na buněčné struktury hepatocytu a způsobuje jejich přímé poškození (Červený, 2013). V pokusech na zvířatech bylo zjištěno, že toxické účinky paracetamolu se projeví při poklesu hladiny jaterního glutathionu pod 70 % normální hladiny (Richardson, 2000).

Při otravě paracetamolem se podává specifické antidotum *N*-acetylcystein. Acetylcystein je donorem –SH skupin a účinně obnovuje zásoby glutathionu, který poté

odstraňuje toxický NAPQI (Hladík, 2005). Alternativním zdrojem sulfhydrylových skupin je metionin, který však v experimentech vykazoval nižší účinnost než acetylcystein (Boobis, 1986).

2.2.2 Thioacetamid

Thioacetamid (TAA) je hepatotoxická látka, která se experimentálně používá k navození a studování akutního či chronického jaterního poškození. Akutní toxicita je charakterizována centrilobulární nekrózou, doprovázenou zvýšením sérových transamináz a hyperbilirubinemií, zatímco chronická expozice vede k jaterní fibróze, cirhóze či karcinomu jater (Sarma, 2012). Výhody použití thioacetamidu jako modelové hepatotoxické sloučeniny spočívají v jeho specifitě pro jaterní tkáň, v přednostním působení v perivenózní oblasti a v relativně dlouhém časovém rozmezí (3,5-7dní) od vzniku nekrózy po jaterní selhání (Chanda, 1994; Staňková, 2010).

Hepatotoxicita thioacetamidu byla poprvé studována v roce 1948 v pokusu na potkanech. Podnětem ke studiu bylo nalezení TAA v pomerančovém džusu následkem použití této látky jako fungicidu v pomerančovnickovém sadu (Hajovsky, 2012). Kromě využití k hubení škůdců se thioacetamid používá ke korozním zkouškám, jako průmyslové rozpouštědlo, jako urychlovač vulkanizace nebo ke stabilizaci motorového oleje (Lee, 2003).

TAA je bílý krystalický prášek rozpustný ve vodě a v etanolu, mírně rozpustný v éteru (Merck Index, 1996). V *in vivo* experimentech se thioacetamid podává obvykle intraperitoneálně, méně často intravenózně (Chen, 2008) nebo perorálně (Tani, 2001).

Metabolismus a působení thioacetamidu na jaterní tkáň

K vyvolání jaterního poškození thioacetamidem je nutná jeho bioaktivace. TAA je oxidován jaterním mikrozomálním systémem, zejména enzymy CYP2E1 a FAD monooxygenázami, nejprve na relativně stabilní thioacetamid-S-oxid (TASO) a dále na nestabilní a vysoce reaktivní thioacetamid-S,S-dioxid (TASO₂).

Biotransformace thioacetamidu podléhá saturační kinetice (kinetika nultého řádu) (Chilakapati, 2005). Široké spektrum dalších substrátů CYP2E1 podstupuje kinetiku nultého řádu, kdy se zvyšující se dávkou toxikantu je limitována míra jeho biotransformace. Důsledkem enzymové saturace je, že se produkce aktivního metabolitu nezvyšuje proporcionálně k rostoucí dávce. Při vysokých dávkách TAA, při kterých je CYP2E1 nasycen, klesá tvorba metabolitu TASO, je redukován toxický účinek. Poměr metabolitu TASO k mateřské sloučenině TAA s rostoucí dávkou klesá, čímž se vysvětluje nejednoznačný vztah dávka - účinek (Mangipudy, 1995). Také přeměna TASO na TASO₂ je saturevatelná, probíhá pomaleji a je tak rychlost-limitujícím krokem biotransformace. Biologický poločas TAA a TASO je 1-1,5 hod, respektive 1,5-2 hod (Porter, 1979). Obrázek 2.3 znázorňuje metabolismus TAA (Chilakapati, 2005).

Reaktivní metabolity TAA, především nestabilní TASO₂, zvyšují oxidační stres, vyčerpávají zásoby glutathionu a způsobují oxidaci makromolekul včetně lipidů buněčných membrán. Pochody oxidačního stresu jsou též zahrnuty v procesu fibrogenese (Furtado, 2012). Navíc se předpokládá, že se produkty thioacetamidu vážou na buněčné proteiny a poškozují postranní lysinové řetězce za vzniku acetylimidolysinových derivátů (Lee, 2003). Důsledkem je poškození funkce buňky a následná cytotoxicita.

Bylo popsáno thiaoacetamidem indukované uvolnění iontů vápníku z intracelulárních zásob (Diez-Fernandez, 1996). Nadprodukce volných radikálů a narušení homeostázy vápníku mohou vyvolat zvýšenou permeabilitu vnitřní mitochondriální membrány, narušení membránového potenciálu a inhibici dýchání (Bernardi, 2001). Thioacetamid působením na mitochondriální metabolismus nepříznivě ovlivňuje regeneraci jaterní tkáně, která je energeticky závislá na funkčních mitochondriích (Staňková, 2010).

2.2.3 Tamoxifen

Tamoxifen (TAM), chemickým názvem (Z)-2-[4-(1,2-diphenylbut-1-enyl)phenoxy]-N,N-dimethylethanamin, patří do skupiny selektivních modulátorů estrogenního receptoru (SERMs), které v závislosti na typu tkáně a buněk vykazují estrogenní nebo antiestrogenní působení. Tamoxifen kompetitivně obsazuje vazebné místo na estrogenním receptoru a inhibuje proliferativní účinky estrogenu. Je využíván v terapii a prevenci hormonálně závislého karcinomu prsu. Agonistické působení na estrogenním receptoru se děje např. v kostní tkáni, v endometriu nebo na krevních lipidech (Osborne, 2000).

Léčivé přípravky obsahují tamoxifen citrát. Je to bílý až skoro bílý, polymorfní, krystalický prášek. Je těžce rozpustný ve vodě a acetonu, dobře rozpustný v metanolu (Český lékopis, 1997). Doporučená denní dávka tamoxifenu v léčbě karcinomu prsu je 20 mg. Obvykle se jedná o dlouhodobou léčbu, která se ukončuje teprve tehdy, když dojde k remisi.

Tamoxifen a vliv na játra

Chronické užívání tamoxifenu může indukovat široké spektrum jaterních lézí jako je periportální hepatitida a cirhóza (Maruyama, 1995), makrovezikulární steatóza a steatohepatitida (Pinto, 1995). Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) hodnotí tamoxifen jako karcinogenní u experimentálních zvířat (IARC, 1996). Byly publikovány studie o hepatokarcinogenním působení tamoxifenu u potkana (Hirsimäki, 1993; Williams, 1993). Za iniciační krok karcinogeneze je považována metabolická aktivace na elektrofilní sloučeninu - sulfátový konjugát α -hydroxytamoxifenu nebo *N*-desmetyltamoxifenu, která se irreverzibilně váže na DNA jaterních buněk (Rajaniemi, 1998). Stejný adukt je tvořen také u myších a lidských hepatocytů po expozici α -hydroxytamoxifenu. Dostupná data uvádějí, že lidské a myší buňky, ve srovnání s buňkami potkana, mají podstatně nižší schopnost metabolické aktivace tamoxifenu (Wogan, 1997). To koresponduje se studií, ve které byly myši rezistentní ke karcinogenezi (Martin, 1997). Tamoxifen v jediné dávce nevyvolá rakovinné bujení, ačkoliv může podpořit rakovinu jater indukovanou *N*-nitrosodietylaminem (White, 1999).

Dále je známo, že tamoxifen může u pacientek způsobit dysfunkce metabolismu lipidů. Látka blokuje funkci estrogenu v udržení homeostázy lipidů, čímž se zvyšuje obsah tuků v játrech. Rozvíjí se nealkoholická steatóza a steatohepatitida (Lelliott, 2005).

S užíváním tamoxifenu je spojováno ukládání anorganického železa v játrech (sideróza). Ionty železa nepocházejí z molekuly hemu a jejich akumulace možná souvisí s tvorbou volných radikálů během metabolismu tamoxifenu. Nadměrná zátěž železem může být zprostředkována poruchou v regulačním mechanismu hepcidinu, hlavního regulátoru homeostázy železa (Jatobá, 2008). Železo svým katalytickým účinkem na tvorbu volných radikálů podporuje peroxidaci lipidů v hepatocytech s následným poškozením membrány a

ztrátou integrity organel (Bacon, 1985). Produkty degradace lipidů také stimulují tvorbu kolagenu v jaterních hvězdčicových buňkách *in vitro* a lidských fibroblastech (Maher, 1994). V Kupfferových buňkách tyto produkty mohou stimulovat produkci transformujícího růstového faktoru β (TGF- β) (Leonarduzzi, 1997).

2.3 STUDOVANÉ POTENCIÁLNĚ HEPATOPROTEKTIVNÍ LÁTKY

Pro účely experimentů byly vybrány následující látky: přírodní antioxidanty silymarin, naringin, resveratrol a syntetický chelátor železa deferipron.

2.3.1 Silymarin

Silymarin (SIL) je extrakt ze sušených semen rostliny ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* L.). Tato bylina byla již po staletí využívána v lidovém léčitelství jako léčebný prostředek při poruchách zažívacího traktu, onemocnění jater a žlučového traktu, menstruačních poruchách a křečových žilách (Saller, 2007). Obsah silymarinu ve zralých plodech ostropestřce je 1,5-3,0 %. V čistém standardizovaném suchém extraktu se obsah silymarinu pohybuje 30-60 % (Abenavoli, 2010).

Silymarin je směs flavonolignanů složená ze strukturních izomerů: silybininu (diastereomery silybin A + silybin B), isosilybininu (isosilybin A + isosilybin B), silydianinu, silychristinu a dalších minoritních složek (např. taxifolin, silyhermin) (Wu, 2009). Největší podíl ve směsi zaujímá silybinin (60-70 %), další složky jsou zastoupeny v množství: silychristin 20 %, silydianin 10 %, isosilybin 5% (Pradhan, 2006).

Biologické účinky silymarinu

Silymarin je známý především svými hepatoprotektivními účinky. Mechanismus zahrnuje působení na několika úrovních, z nichž nejvýznamnější je antioxidační působení a regenerace buňky vlivem zvýšené proteosyntézy. Silymarin je dále spojován s protizánětlivými, antifibrotickými a imunomodulačními vlastnostmi.

Antioxidační vlastnosti silybininu byly sledovány v pokusech *in vitro*. V jaterních mikrosomech silybinin působil jako silný vychytávač hydroxylových radikálů (OH \cdot) generovaných ve Fentonově reakci a dále vychytávač superoxidového radikálu (O $_2^{\cdot-}$) generovaného xantinoxidázovým enzymovým systémem. Peroxidace lipidů vyvolaná organickými hydroperoxidy (kumen hydroperoxidem) probíhala v mikrosomech přes oxidaci glutathionu a dalších thiolů. Silybinin zamezil degradaci thiolů a zároveň vyvolané lipoperoxidaci (Basaga, 1997).

Stimulace proteosyntézy. Po intraperitoneálním podání silybininu byla v potkaních játrech zvýšena aktivita RNA polymerázy I a tím hladina ribozomální RNA (Sonnenbichler, 1986). Důsledkem je zrychlená syntéza ribozomů, proteinů a DNA. Tyto účinky mají významný terapeutický dopad na opravu poškozené jaterní tkáně a návrat k normální funkci orgánu (Abenavoli, 2010).

Protizánětlivé účinky. Silymarin inhibuje tvorbu leukotrienů, prozánětlivých mediátorů, působením na aktivitu 5-lipoxygenázy. Ve studii na izolovaných Kupfferových buňkách, silybinin inhiboval tvorbu leukotrienu B₄ (Dehmlow, 1996). Dále je popisován vliv silymarinu na transkripční faktor NF-κB, klíčový regulátor zánětu a imunitních reakcí, přičemž silymarin inhibuje vazbu NF-κB na DNA (Pradhan, 2006).

Protifibrotické působení. Fibrogenese je důsledkem konverze jaterních hvězdicových buněk (HSC, hepatic stellate cells) v myofibroblasty. Silymarin inhibuje NF-κB a také zpomaluje HSC aktivaci (Abenavoli, 2010). V pokusu na potkanech, s CCl₄ chronickým poškozením jater, silymarin (50 mg/kg; *p.o.*) snížil obsah kolagenu v játrech na 55 % (Favari, 1997). Dále silymarin potlačuje expresi profibrotických mediátorů (pro-kolagen α1 a TIMP-1) (Jia, 2001).

Blokáda toxinů. Silymarin má regulační účinky na permeabilitu buněčné a mitochondriální membrány a zvyšuje membránovou stabilitu proti xenobiotickému poškození. Brání absorpci toxinu do hepatocytu tím, že obsazuje vazebná místa na buňce, a inhibuje některé transportní proteiny v membráně. Jedním z takových transportních systémů je OATP2 (organic anion transporting polypeptide), který zprostředkovává transport žlučových kyselin, lipofilních hormonů nebo xenobiotik z portální krve do hepatocytu. Silymarin kompetitivně inhibuje tento přenašeč. Této skutečnosti je využito při terapii intoxikace muchomůrkou zelenou (*Amanita phalloides*), jejíž toxiny, amanitin a faloidin, prostupují do hepatocytu prostřednictvím OATP2 a způsobují likvidaci buněk (interference s proteosyntézou) (Abenavoli, 2010). Silymarin (silybinin 20-50 mg/kg/den) je při otravě muchomůrkou zelenou podáván spolu s vysokými dávkami penicilinu (300 000-1 000 000 U/kg/den) (Saller, 2008).

Silybinin, majoritní složka silymarinu, je považován za biologicky účinnou složku celé směsi. Farmakokinetické parametry silymarinu jsou vztahovány a standardizovány k silybininu (Saller, 2001).

Silymarin je velmi málo rozpustný ve vodě (0,03 mg/L, silybinin 0,004 mg/L). Biodostupnost po perorálním podání je velmi nízká (0,98 %) a závisí na obsahu dalších přítomných substancí, které mají lepší rozpustnost. Silymarin se podává ve formě suspenze v metylcelulóze nebo β-cyklodextrinu, nebo ve formě kapslí (Saller, 2008). Systémovou dostupnost lze zvýšit přidáním nosiče jako je fosfatidylcholin za vzniku fytosomu, lipid-kompatibilního komplexu, který má 10krát vyšší biodostupnost než samotný silymarin (Morazonni, 1993).

2.3.2 Naringin

Naringin (4',5,7-trihydroxyflavanon- 7- rhamnoglukosid, NAR) patří do skupiny flavonoidních glykosidů. Přirozeně se vyskytuje v citrusových plodech. Je hlavním flavonoidem grapefruitu (tvoří až 10 % suché hmotnosti) a je zodpovědný za hořkou chuť grapefruitové šťávy (Ortuño, 1995). Obsah naringinu v grapefruitové šťávě závisí na druhu grapefruitu a pohybuje se od 100 do 500 mg/L (Mouly, 1994).

Flavonoidy jsou velkou skupinou nízkomolekulárních polyfenolických sloučenin vyskytujících se v rostlinách jako sekundární metabolity. V rostlinné říši bylo popsáno již více jak 5 000 derivátů bioflavonoidů (Fernandez, 2009). Významnými zdroji těchto látek jsou

např. citrusy, borůvky, ginkgo biloba, cibule, petržel, luštěniny, čaj, červené víno, hořká čokoláda (Hollmann, 1999).

Zájem o flavonoidy z hlediska jejich působení na lidské zdraví je dán účinky pozorovanými *in vitro*: vychytávání volných radikálů, modulace enzymové aktivity, inhibice buněčné proliferace, působení proti bakteriím, alergii, zánětu a další (Bravo, 1998). Zejména je významný jejich antioxidační a chelatační potenciál, který souvisí s protektivním působením flavonoidů proti nádorovým a kardiovaskulárním onemocněním.

Antioxidační účinky flavonoidů

Výzkumy zabývající se závislostí účinku na struktuře ukazují, že antioxidační aktivita flavonoidů závisí na uspořádání funkčních skupin na flavanovém jádře (Kolek, 2005; Heim, 2002). Zejména jsou důležité tyto strukturní komponenty:

i) *hydroxylové skupiny*. Hydroxylové skupiny na B-kruhu jsou významné pro vychytávání volných radikálů. Katecholová struktura (3',4'-dihydroxybenzen) B-kruhu zvyšuje inhibici peroxidace lipidů. Přítomnost volné 3-OH skupiny na C-kruhu přispívá k antioxidačním vlastnostem (Burda, 2001).

ii) *methoxylové skupiny*. Změny v hydrofobicitě a planaritě molekuly znamenají také změnu antioxidační aktivity flavonoidu. I když poměr hydroxy- a methoxyskupin není určující pro míru vychytávání volných radikálů, kruh B je obzvláště citlivý k umístění methoxylových skupin. Antioxidační účinek katecholu B kruhu je odstraněn polymethoxylací na A-kruhu.

iii) *dvojná vazba a ketoskupina*. Flavonoidy s dvojnou vazbou mezi uhlíky C2 a C3 a současně s ketoskupinou na C4 vykazují lepší antioxidační vlastnosti než látky, které nemají tyto strukturní determinanty (Ratty, 1988).

iv) *cukerné zbytky*. Aglykony jsou účinnější antioxidanty než jejich odpovídající glykosidy (Ratty, 1988). S rostoucím počtem cukerných zbytků klesá antioxidační kapacita (Plumb, 1999). Kromě počtu cukerných zbytků hrají roli také umístění (např. glykosylace na A-kruhu snižuje antioxidační kapacitu) a struktura cukru (glukóza, rhamnóza nebo rutinóza). Vliv cukerných zbytků na antioxidační vlastnosti je u člověka sporný, neboť glykosidické vazby jsou často štěpeny ve střevě. Je pravděpodobné, že odstranění cukerných substituentů střevními enzymy nebo bakteriemi zvyšuje aktivitu flavonoidů přijatých v potravě *in vivo* (Heim, 2002).

v) *stupeň polymerizace*. Polymery flavonoidů jsou přítomny např. v extraktu semen hroznů (oligomery a dimery katechinů) nebo v červeném víně (dimery procyanidinů). Zdá se, že vyšší stupeň polymerizace zvyšuje antioxidační aktivitu procyanidinů proti různým radikálům (Heim, 2002).

Chelatační účinky flavonoidů

Chelatační vlastnosti flavonoidů přispívají k jejich antioxidačnímu působení. Odstraněním a neutralizací nadbytečných iontů železa, které jsou deponovány v hepatocytech, flavonoidy snižují oxidativní poškození (Morel, 1993). Také po chelataci dvojmocných kationtů si flavonoid zachovává schopnost zhaset volné radikály. Oxidace navozená Fentonovou reakcí je silně inhibována flavonoidy, které ve své struktuře obsahují 3',4'-katechol, 4-oxo- a 5-OH-skupiny. Komplex chelátoru s iontem Fe nebo Cu se může tvořit mezi 5-OH a 4-oxo-skupinou nebo mezi 3'- a 4'-hydroxylyem (Cheng, 2000). Díky

schopnostem vázat kovy a zhášet volné radikály jsou polyhydroxylované flavonoidy významné jako inhibitory Fentonovy reakce *in vivo* (Heim, 2002).

Biologické účinky naringinu

Citrusové flavonoidy jsou zkoumány pro jejich rozmanité biologické účinky. Je známo, že naringin má antioxidační, protirakovinné, protizánětlivé a antimikrobiální účinky. Snižuje hladinu lipidů v krvi, zlepšuje pevnost cévních stěn, jejich elasticitu a propustnost. Má tedy význam z hlediska prevence kardiovaskulárních chorob a rakoviny (Huang, 2011). V posledních letech byly publikovány méně známé biologické účinky naringinu, např. indukce melanogeneze (Huang, 2011), indukce apoptózy *in vitro* (Kanno, 2003), anxiolytické působení u myši (Fernandez, 2009) nebo vliv na kognitivní funkce a neurodegeneraci (Spencer, 2010).

Významné jsou interakce grapefruitové šťávy se současně podanými léčivy. Grapefruitová šťáva může výrazně zvýšit biodostupnost orálně podaných léčiv (např. blokátorů kalciových kanálů, takrolimu, diazepamu aj.). Neúměrně vysoké koncentrace léčiv v séru mají pak za následek zvýšený výskyt vedlejších účinků závislých na dávce (de Castro, 2007). Hlavním mechanismem těchto interakcí je inhibice intestinální formy cytochromu P450 3A4 (CYP3A4) vyvolaná furanokumariny a flavonoidy přítomnými v grapefruitovém džusu. Studie naznačuje, že účinné složky džusu, samy substráty proteinu, vykazují suicidální typ inhibice (Lown, 1997). I když naringin i naringenin vykazují inibiční efekt na CYP3A4, nejsou primárními inhibitory CYP3A4 grapefruitové šťávy (Edwards, 1996). Současné výzkumy ukazují, že - kromě působení na CYP3A4 - interakce grapefruitového džusu s léčivy zahrnují také ovlivňování P-glykoproteinu a membránového transportéru OATP (Dahan, 2004).

2.3.3 Resveratrol

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilben, RES), přírodní polyfenol, byl prvně izolován v roce 1940 z oddenku kýchavice zelené (*Veratrum grandiflorum*, Loes). Významný je jeho obsah ve slupkách hroznů révy vinné (50-100 µg/g) (Ma, 2005). V rostlině působí resveratrol jako fytoalexin, tj. slouží k rezistenci buňky, neboť se ve zvýšené míře tvoří při napadení rostliny plísněmi (např. *Botrytis cinerea*) nebo po expozici UV záření (Šmidrkal, 2001). V roce 1992 Siemann a Creasy detekovali polyfenol resveratrol v červeném víně (Siemann, 1992). Ve stejné době epidemiologické studie ukázaly existenci tzv. „francouzského paradoxu“, tj. snížený výskyt kardiovaskulárních onemocnění ve spojení se stravou bohatou na tuky a mírnou konzumací červeného vína v oblasti jižní Francie a Středomoří (de la Lastra, 2007). Existují 2 geometrické izomery resveratrolu: *cis* a *trans*. Většina vědeckých prací pojednává o *trans* (*t*)- resveratrolu, stejně je tomu i v této disertační práci.

Resveratrol ovlivňuje různorodé biologické děje v organismu. Byly zjištěny jeho účinky protizánětlivé, chemopreventivní, antioxidační, proapoptické, antiproliferativní, protivirové, imunomodulační a jiné (Fulda, 2010).

Antioxidační účinky resveratrolu

Byly objasněny různé antioxidační mechanismy resveratrolu (Zini, 1999):

1. kompetice s koenzymem Q v reakcích oxidačního řetězce,
2. vychytávání volných kyslíkových radikálů,
3. inhibice peroxidace lipidů vyvolané produkty Fentonovy reakce.

Nepřímé antioxidační působení resveratrolu spočívá v udržování koncentrací obranných antioxidačních systémů fyziologicky přítomných v organismu- redukovaného glutathionu, enzymů glutathion peroxidázy, glutathion-S-transferázy apod (Yen, 2003). Antioxidační působení stilbenu se uplatňuje v prevenci vzniku aterosklerózy a následného onemocnění koronárního řečiště (Pervaiz, 2003). Na vzniku aterosklerózy se podílí oxidativní modifikace lipoproteinů s nízkou hustotou (Esterbauer, 1992). Oxidované lipoproteiny se akumulují v buňkách stěny koronární tepny a vytvářejí prostředí pro vznik aterogenního plátu a agregaci krevních destiček. Resveratrol inhibuje oxidaci polyneenasycených mastných kyselin (PUFA), které jsou součástí LDL částic (Pervaiz, 2003). Účinek je zprostředkován chelatací mědi, která katalyzuje oxidaci PUFA, a vychytáváním volných radikálů ($O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , peroxyradikál) (Losa, 2003). Zhášení volných radikálů se uplatňuje též v inhibici peroxidace membránových lipidů. Antioxidační účinky obou izomerů resveratrolu jsou kvantitativně podobné (Orallo, 2006).

V závislosti na koncentraci stilbenu a typu buňky, resveratrol vykazuje též prooxidační účinky, které vedou v přítomnosti tranzitních kovů k oxidativnímu poškození DNA, které se může významně podílet na protirakovinných a proapoptických vlastnostech resveratrolu (de la Lastra, 2007).

2.3.4 Deferipron

Deferipron (L1) (1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-on) je syntetická látka tvořící cheláty s železem. Je prvním orálně podávaným léčivem s chelatačními účinky a používá se u pacientů s talasemií a s jinými onemocněními z přetížení železem. Podává se ve formě kapslí nebo tablet (Ferriprox®). Chelatuje také měď, hliník, zinek i další kovy, ale největší afinitu vykazuje k železu, se kterým tvoří červeně zabarvené komplexy (Kontoghiorghes, 2000).

Ideální chelatace iontů kovů spočívá v navázání, přenosu a odstranění iontu z organismu bez toxických účinků. Mechanismus působení chelatačních léčiv *in vivo* není ještě plně objasněn (Kontoghiorghes, 1987). Při fyziologickém pH je k navázání jedné molekuly Fe(III) potřeba tří molekul deferipronu. Deferipron majoritně mobilizuje Fe z NTBI a dále ze saturovaného transferinu. Z hemoglobinu železo neodstraňuje.

Deferipron ve vysokých koncentracích (řádově mM) inhibuje ribonukleotid reduktázu, dále tvorbu ROS (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}). Je ovlivněn též růst některých buněk (stimulované lymfocyty, progenitorové buňky) (Kontoghiorghes, 1986).

Deferipron se používá u pacientů přetížených železem, u dialyzovaných pacientů pro odstranění hliníku a u pacientů s revmatoidní artritidou, kde redukuje zánět a koriguje anemii při chronické nemoci (Kontoghiorghes, 1994).

Exkrece železa deferipronem závisí na dávce, frekvenci podání a míře nadbytečného železa u dané osoby. Celková denní dávka 50-120 mg/kg/den je obvykle rozdělena do 2-4

dávek po 25-50 mg/kg. Typická dávka 50-100 mg/kg způsobí exkreci 10-120 mg Fe u pacienta s koncentrací feritinu 3-12 mg/L, kdežto u normálního pacienta dojde jen k mírné exkreci Fe (1-2 mg) (Kontoghiorghes, 2000). Individuální reakce pacienta jsou závislé na mnoha faktorech (dieta, obsah vitamínu C, aktivita erythropoetinu, biotransformace chelátoru, atd). V klinických studiích i na zvířecích modelech bylo zjištěno, že L1 odstraňuje železo z jaterní a srdeční tkáně (Olivieri, 1992; Tonduri, 1998).

Mezi významné nežádoucí účinky při podávání deferipronu patří chelatace a exkrece jiných biogenních prvků- Zn, Cu, Mn. Dále se vyskytuje přechodná agranulocytóza, neutropenie, bolest muskuloskeletárního systému a žaludeční intolerance. Mechanismy toxického působení L1 nejsou známy, ale předpokládá se přítomnost volných radikálů vlivem méně stabilních komplexů, inhibice přeměny důležitých metaloenzymů, snížená biodostupnost esenciálních prvků apod (Kontoghiorghes, 2000).

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo

1. Posoudit a porovnat možné protektivní účinky přírodních antioxidantů silymarinu, naringinu a resveratrolu na poškození jater po intoxikaci paracetamolem, thioacetamidem nebo tamoxifenem *in vivo* v pokusech na potkanech.
2. Posoudit a porovnat účinek deferipronu a resveratrolu při intoxikaci tamoxifenem *in vivo* v pokusu na potkanech.

Dílčí cíle jednotlivých pokusů:

- I. Posoudit účinky silymarinu, naringinu a resveratrolu na *oxidační stres* navozený paracetamolem, thioacetamidem a tamoxifenem.
- II. Posoudit účinky silymarinu, naringinu a resveratrolu na *parametry jaterního poškození* navozeného paracetamolem, thioacetamidem a tamoxifenem.
- III. Porovnat vzájemně silymarin, naringin a resveratrol vzhledem k možným hepatoprotektivním účinkům.
- IV. Posoudit vliv deferipronu na jaterní poškození vyvolané tamoxifenem, zejména jeho předpokládané chelatační účinky.

4 MATERIÁL A METODY

Experiment

Pokusy byly prováděny na laboratorních potkanech, samcích nebo samicích, kmene Wistar albino (SPF, hmotnost 150 až 180 g). Zvířata byla chována v místnosti s kontrolovanou teplotou a relativní vlhkostí, při umělém světelném režimu 12h světlo/12h tma, s volným přístupem ke standardní peletové stravě a pitné vodě. Po 6-denní adaptaci na prostředí byla zvířata náhodně rozdělena do skupin dle plánu pokusu. Pokusy byly prováděny v souladu s legislativními předpisy a byly předem schváleny místní etickou komisí pro práci se zvířaty.

Pokusy byly ukončeny usmrcením zvířat v éterové anestezii podstřížením krčních tepen. Vytékající krev byla zachycena do připravených skleněných zkumavek za účelem získání séra a následně byla vyjmuta játra pro analýzu.

Sérum pro analytické účely bylo získáno odstředěním sražené krve v centrifuze (Joan CR 3 12, USA Indiana) při 3000 rpm po dobu 15 min za laboratorní teploty a následným odpipetováním horní oddělené vrstvy. V séru byly stanoveny aktivity jaterních enzymů: alanin aminotransferáza, aspartát aminotransferáza a glutamát dehydrogenáza.

Játra byla odebrána za účelem stanovení parametrů oxidačního stavu: hladina peroxidace lipidů, koncentrace redukováného glutathionu, aktivita katalázy, glutathion peroxidázy. V jaterní tkáni byla dále stanovena hladina železa.

Vzorky pro stanovení redukováného glutathionu byly vkládány do kádinky s ledovým roztokem 0,02M EDTA a hned analyzovány. Ostatní vzorky byly propláchnuty v 0,9% NaCl, zmrazeny na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uchovány tak až do analýzy. Spektrometrická měření byla prováděna na přístrojích Lambda 2S (Perkin Elmer Co, USA) a Cary 100 Bio (Varian Australia).

Analytické postupy

Enzymová aktivita alanin aminotransferázy (ALT) v séru byla stanovena dle návodu v komerčním reakčním setu pro stanovení ALT (Diasys Diagnostic Germany). Fotometricky je měřena rychlost úbytku NADH při 340 nm, která je přímo úměrná aktivitě ALT ve vzorku. Výsledná aktivita je uvedena v jednotkách U.L^{-1} .

Enzymová aktivita aspartát aminotransferázy (AST) v séru byla stanovena dle návodu v komerčním reakčním setu pro stanovení AST (Diasys Diagnostic Germany). Fotometricky je měřena rychlost úbytku NADH při 340 nm, která je přímo úměrná aktivitě AST ve vzorku. Výsledná aktivita je uvedena v jednotkách U.L^{-1} .

Enzymová aktivita glutamát dehydrogenázy (GLDH) v séru byla stanovena dle návodu v komerčním reakčním setu pro stanovení GLDH (Diasys Diagnostic Germany). Fotometricky je měřena rychlost úbytku NADH při 340 nm, která je přímo úměrná aktivitě GLDH ve vzorku. Výsledná aktivita je uvedena v jednotkách U.L^{-1} .

Stanovení míry peroxidace lipidů (LP) v jaterních homogenátech spočívá v měření koncentrace malondialdehydu (nmol MDA.g^{-1} jaterní tkáně). Test využívá reakce MDA

s kyselinou thiobarbiturovou (TBA) v kyselém prostředí za vzniku fialového produktu, který se měří spektrometricky při 535 a 520 nm (Mihara, 1978).

Ke stanovení hladiny redukováného glutathionu (GSH) v jaterních homogenátech byla využita reakce s Ellmanovým činidlem (5,5'- dithiobis-(2-nitrobenzoová kyselina); DTNB). V této reakci redukováný glutathion reaguje s Ellmanovým činidlem za rozpadu disulfidové vazby a vzniku 2-nitro-5-thiobenzoátu (NTB⁻), který je ve vodném a alkalickém prostředí dále ionizován na žlutě zbarvený NTB²⁻. Tento produkt je kvantifikován spektrometricky měřením absorbance při 412 nm. Koncentrace je vyjádřena v $\mu\text{mol GSH}\cdot\text{g}^{-1}$ jaterní tkáně (Sedlak, 1968).

Ve stanovení aktivity glutathion peroxidázy (GPx) v jaterních homogenátech je využito spřažené reakce, ve které je oxidovaný glutathion (GSSG) převáděn za přítomnosti glutathion reduktázy (GR) a NADPH na redukovanou formu (GSH) za vzniku NADP⁺. Pokles koncentrace NADPH je měřen spektrometricky při 366 nm. Aktivita enzymu je vyjádřena v $\mu\text{mol NADPH}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Günzler, 1974).

Principem stanovení aktivity katalázy (CAT) je sledování dekompozice peroxidu vodíku, přidaného jako substrát do reakční směsi. Spektrometricky je měřena absorbance H₂O₂ při 240 nm. Aktivita enzymu je vyjádřena jako rychlostní konstanta *k* vztažená na 1 g tkáně, $k\cdot\text{g}^{-1}$, což je ekvivalentní množství rozloženého H₂O₂ v $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Aebi, 1984).

Pro stanovení obsahu železa byla jaterní tkáň zvážena a mineralizována suchou cestou v platinových kelímcích při teplotě 450-500 °C po dobu 18-24hod. Popel byl rozpuštěn v 3M HCl. Příslušně zředěné vzorky byly následně analyzovány atomovou absorpční spektrometrií (SpectrAA 220 FS, Varian Australia Ltd.) buď technikou atomizace v plameni, nebo v grafitové kyvetě. Koncentrace železa je vyjádřena v $\mu\text{g Fe}\cdot\text{g}^{-1}$ jaterní tkáně.

Statistická analýza

Data jsou prezentována jako aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka (SD).

Ke statistické analýze byl použit nepárový Studentův *t*-test. Jednotlivé hladiny významnosti jsou označeny následovně: * $p<0,05$, ** $p<0,01$ *** $p<0,005$ proti kontrolní skupině # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,005$ proti intoxikované skupině.

Podávané látky

V jednotlivých pokusech jsme podávali tyto látky:

- Acetaminophen, SigmaUltra, min 99,0%, Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO, USA
- Thioacetamide ACS, for precipitation of heavy metals, Sigma Aldrich Co, St. Louis, USA
- Tamoxifen® „EBEWE“ 10 mg, EBEWE Pharma GmbH, Unterach, Rakousko
- Resveratrol 99% GC, Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO, USA
- Naringin $\geq 90\%$, from citrus fruit, Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO, USA
- Silymarin, Sigma Aldrich Co, St. Louis, MO, USA
- deferipron - Ferriprox® 500 mg; Apotex Europe Ltd., Reading, Berkshire, UK

Thioacetamid byl podáván intraperitoneálně ve fyziologickém roztoku. Tablety tamoxifenu a deferipronu byly rozdrceny a podávány žaludeční sondou perorálně ve formě suspenze v destilované vodě. Ostatní látky byly podávány žaludeční sondou perorálně ve formě suspenze v 0,5 % metylcelulóze.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST, VÝSLEDKY

5.1 Vliv antioxidantů na intoxikaci paracetamolem

V experimentu byl sledován vliv premedikace silymarinem, naringinem a resveratrolem na parametry jaterního poškození a oxidačního stavu při akutní intoxikaci paracetamolem u potkana. Experiment probíhal na samcích. Pokus byl rozdělen na 2 dílčí pokusy. V prvním pokusu byla zvířata rozdělena do 5 skupin po 8 zvířatech. V druhém pokusu byly 4 skupiny po 8 zvířatech. Pokus trval vždy 4 dny.

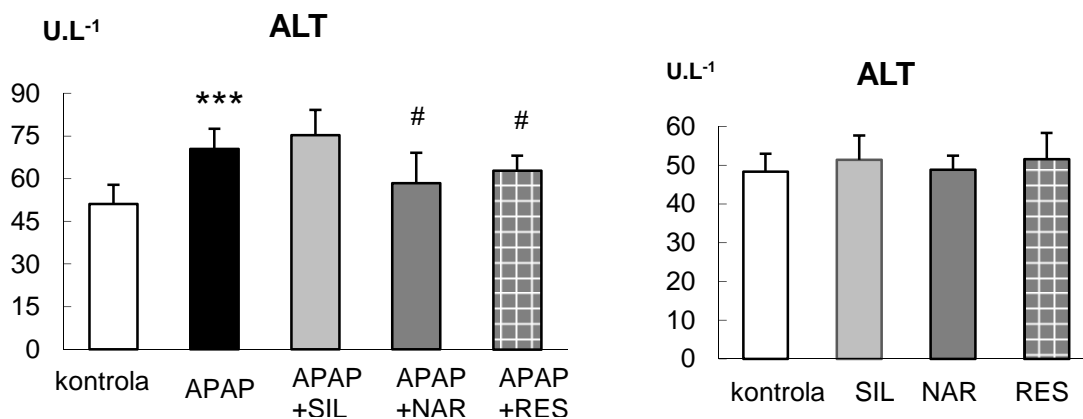
Potkanům v kontrolní skupině byla podána 0,5% metylcelulóza 1krát denně po dobu 3 dnů. Silymarin (131 mg/kg), naringin (22,5 mg/kg) resp. resveratrol (7,5 mg/kg) byl podáván perorálně 1krát denně po dobu 3 dnů. Třetí den pokusu byl podán potkanům II.-V.skupiny paracetamol *p.o.* v dávce 900 mg/kg, přičemž zvířata III.-V. skupiny jej obdržela 2 hod po podání SIL, NAR a RES. Pokus byl ukončen 24 hod po podání paracetamolu dekapitací potkanů. Byla odebrána krev za účelem získání séra pro stanovení aktivity ALT, AST a GLDH. Dále byla vyjmuta játra pro stanovení peroxidace lipidů, redukovaného glutathionu, aktivity CAT a GPx a koncentraci železa.

Výsledky:

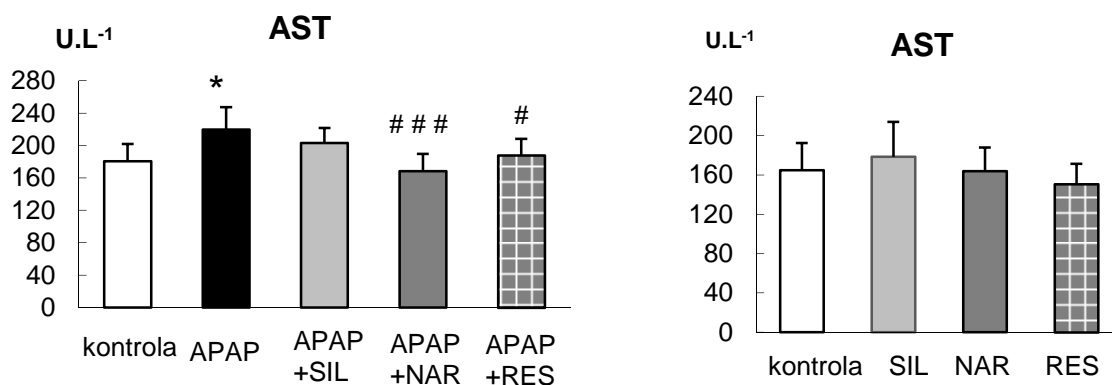
Po podání paracetamolu došlo k navýšení **aktivity ALT** v séru na 137 % oproti kontrolní hodnotě ($p < 0,005$). Premedikace silymarinem toto navýšení nezměnila. Premedikace naringinem, resp. resveratrolem snížila aktivitu ALT o 17 %, resp. o 11 % v porovnání se skupinou APAP. Aktivita ALT po podání samotných SIL, NAR a RES zůstávala na kontrolní hladině, viz obrázek 5.1.

Aktivita AST v séru byla po podání APAP navýšena na 121 % oproti kontrolní hodnotě. Premedikace silymarinem toto navýšení snížila statisticky nevýznamně. Premedikace naringinem, resp. resveratrolem snížila aktivitu AST o 24 %, resp. o 15 % v porovnání se skupinou APAP. Aktivita AST po podání samotných SIL, NAR a RES zůstávala na kontrolní hladině; viz obrázek 5.2.

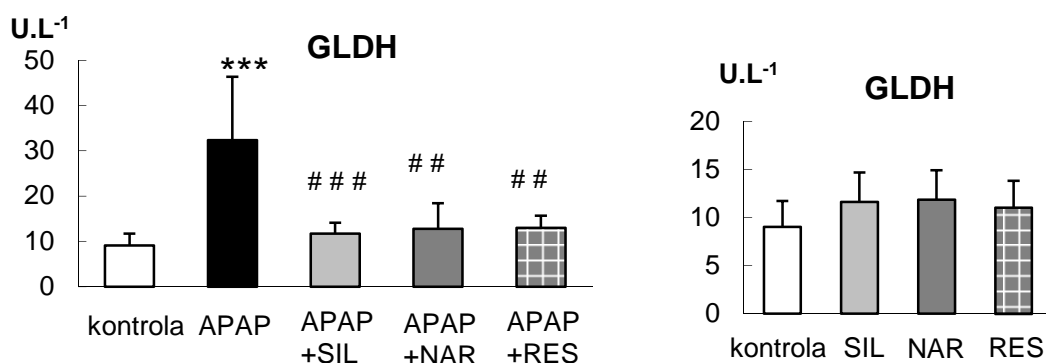
Aktivita **GLDH** v séru byla paracetamolem zvýšena na 3,5násobek kontrolní hodnoty. Premedikované antioxidanty tuto aktivitu významně snížily na kontrolní hladinu, jak je znázorněno na obrázku 5.3.



Obrázek 5.1: **Aktivita alanin aminotransferázy** v séru po podání paracetamolu (APAP) a silymarinu (SIL), naringinu (NAR) nebo resveratrolu (RES). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr ± SD. *** $p < 0,005$ vztaženo ke kontrole; # $p < 0,05$ vztaženo ke skupině APAP.



Obrázek 5.2: **Aktivita aspartát aminotransferázy** v séru po podání paracetamolu (APAP) a silymarinu (SIL), naringinu (NAR) nebo resveratrolu (RES). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr ± SD. * $p < 0,05$ vztaženo ke kontrole; ### $p < 0,005$; # $p < 0,05$ vztaženo ke skupině APAP.



Obrázek 5.3: **Aktivita glutamát dehydrogenázy** v séru po podání paracetamolu (APAP) a silymarinu (SIL), naringinu (NAR) nebo resveratrolu (RES). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr ± SD. *** $p < 0,005$ vztaženo ke kontrole; ### $p < 0,005$; ## $p < 0,01$ vztaženo ke skupině APAP.

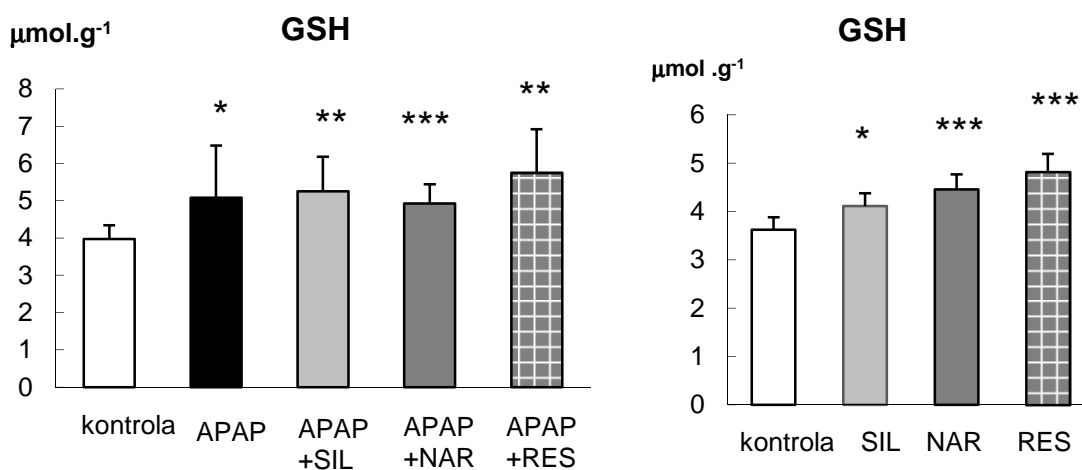
Hladina **LP** v jaterních homogenátech nebyla statisticky významně změněna v žádné skupině zvířat. Hodnoty zůstávaly na kontrolní úrovni.

Hladina redukovaného **glutathionu** v jaterních homogenátech byla statisticky významně zvýšena po podání paracetamolu ($p < 0,05$), taktéž po podání silymarinu ($p < 0,05$), naringinu ($p < 0,005$) a resveratrolu ($p < 0,005$), viz obrázek 5.4.

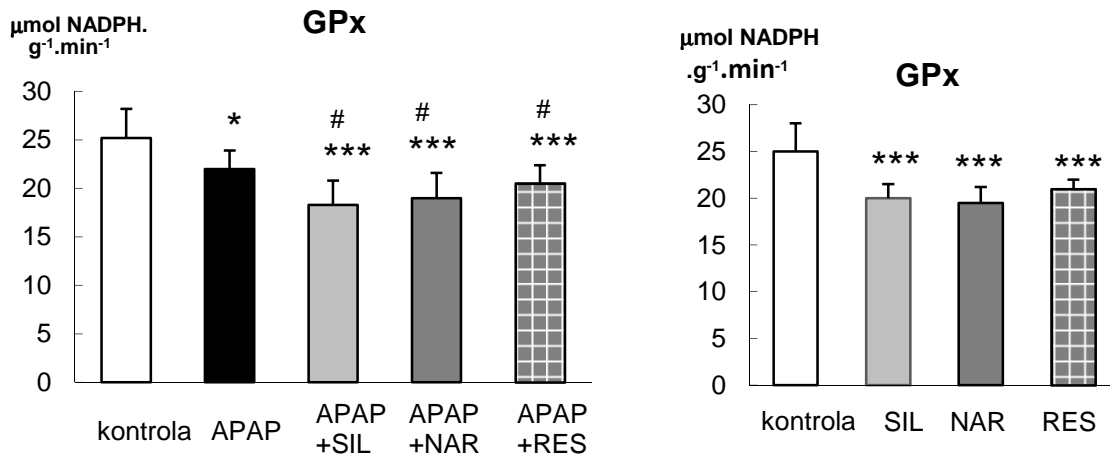
Paracetamol snížil hodnotu aktivity **GPx** v jaterních homogenátech o 19,1 % oproti kontrolní hodnotě. Silymarin, resp. naringin, resp. resveratrol tuto hodnotu dále snížily o dalších 16,4 %, resp. 21,4 %, resp. 17,5 %. Aktivita GPx byla snížena též u samostatně podaných antioxidantů, v porovnání s kontrolní skupinou o 25 % (SIL), o 38 % (NAR) a o 35 % (RES). Výsledky jsou znázorněny na obrázku 5.5.

Aktivita **CAT** v jaterních homogenátech byla statisticky významně navýšena u IV.skupiny (APAP+NAR), a sice o 20 % v porovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,005$). Samostatně podané antioxidanty aktivitu CAT nezměnily.

Koncentrace **železa** v jaterní tkáni byla významně zvýšena podáním samotného silymarinu o 26 % v porovnání s kontrolní skupinou.



Obrázek 5.4: **Koncentrace redukovaného glutathionu** v jaterních homogenátech po podání paracetamolu (APAP) a silymarinu (SIL), naringinu (NAR) nebo resveratrolu (RES). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SD. *** $p < 0,005$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ vztaženo ke kontrole.



Obrázek 5.5: **Aktivita glutathion peroxidázy** v jaterních homogenátech po podání paracetamolu (APAP) a silymarinu (SIL), naringinu (NAR) nebo resveratrolu (RES). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SD. *** $p < 0,005$; * $p < 0,05$ vztaženo ke kontrole; # $p < 0,05$ vztaženo ke skupině APAP.

Závěr:

Po podání paracetamolu došlo k navýšení aktivity enzymů ALT, AST a GLDH v séru, což demonstruje poškození jaterní tkáně. Paracetamol zvýšil hladinu GSH a snížil aktivitu GPx v jaterní tkáni. Oxidační stav navozený APAP nebyl výrazně změněn oproti kontrolní skupině. Silymarin redukoval APAP-indukovanou aktivitu GLDH na kontrolní hladinu, na aktivitu ALT a AST neměl vliv. Redukovanou aktivitu GPx po APAP silymarin dále snížil. Samostatně podaný SIL zvýšil hladinu redukovaného glutathionu a koncentraci železa v jaterní tkáni. Naringin zamezil APAP-indukovanému nárůstu aktivity všech tří studovaných jaterních enzymů ALT, AST i GLDH, což demonstruje protektivní působení na paracetamolem-indukované poškození jater. Snížení aktivity GPx po APAP naringin dále prohloubil. Po samostatně podaném NAR byla aktivita GPx snížena, koncentrace GSH zvýšena. Naringin podaný spolu s paracetamolem zvýšil aktivitu CAT v porovnání s kontrolní, resp. APAP-skupinou. Resveratrol, stejně jako naringin, zamezil APAP-indukovanému nárůstu aktivity všech tří studovaných jaterních enzymů ALT, AST i GLDH. V tomto ohledu vykazuje protektivní působení na paracetamolem-indukované poškození jater. Snížení aktivity GPx po APAP resveratrol dále prohloubil, podobně jako naringin. Po samostatně podaném RES byla aktivita GPx snížena, koncentrace GSH zvýšena, podobně jako v případě naringinu. Naringin a resveratrol vykazují podobné protektivní účinky na APAP-indukované navýšení jaterních enzymů.

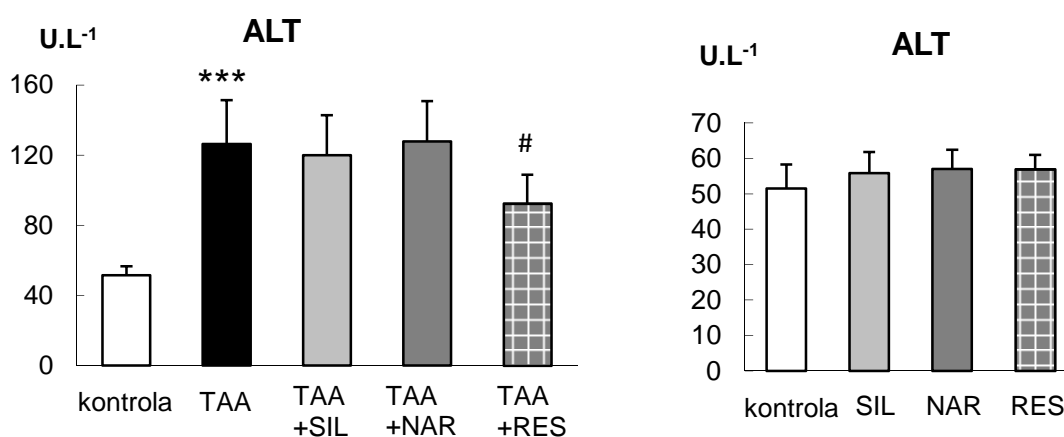
5.2 Vliv antioxidantů na intoxikaci thioacetamidem

V experimentu byl sledován vliv premedikace silymarinem, naringinem a resveratrolem na parametry jaterního poškození a oxidačního stavu při akutní intoxikaci thioacetamidem u potkana. Experiment byl prováděn na samcích. V pokusu byla zvířata rozdělena do 8 skupin po 8 zvířatech. Pokus byl naplánován na 6 dnů.

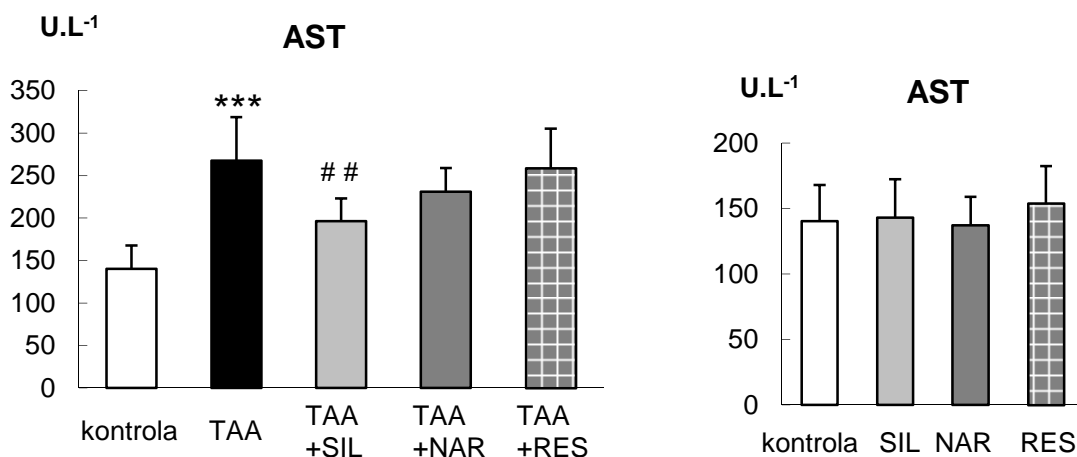
Potkanům v kontrolní skupině byla podána 0,5% metylcelulóza 1krát denně po dobu 5 dnů. Silymarin (175 mg/kg), naringin (30 mg/kg) resp. resveratrol (10 mg/kg) byl podáván 1krát denně po dobu 5 dnů. Třetí a čtvrtý den pokusu byl podán potkanům II.-V. skupiny thioacetamid *i.p.* v dávce 150 mg/kg, zvířata III.-V. skupiny obdržela thioacetamid 2 hod po podání SIL, NAR a RES. Pokus byl ukončen dekapitací 24 hod po poslední dávce antioxidantů, resp. 48 h po poslední dávce TAA. Byla odebrána krev za účelem získání séra pro stanovení aktivity ALT, AST a GLDH. Dále byla vyjmuta játra pro stanovení LP, GSH, aktivity CAT a GPx.

Výsledky:

Po podání thioacetamidu jsme pozorovali navýšení **aktivity ALT** v séru o 124 % oproti kontrolní hodnotě. Resveratrol snížil tento nárůst o 26,9 %. Aktivita ALT u skupiny se silymarinem a naringinem nebyla v porovnání se skupinou TAA ovlivněna, viz obrázek 5.6. **Aktivita AST** v séru byla po aplikaci thioacetamidu navýšena o 90 % v porovnání s kontrolní skupinou. Silymarin snížil tuto hodnotu o 27 %. Naringin snížil hodnotu statisticky nevýznamně. Aktivita AST po podání resveratrolu zůstala na úrovni skupiny TAA, viz obrázek 5.7. **Aktivita GLDH** v séru byla po aplikaci thioacetamidu navýšena 11krát oproti kontrolní hodnotě. Silymarin, naringin ani resveratrol tuto hodnotu nezměnily.



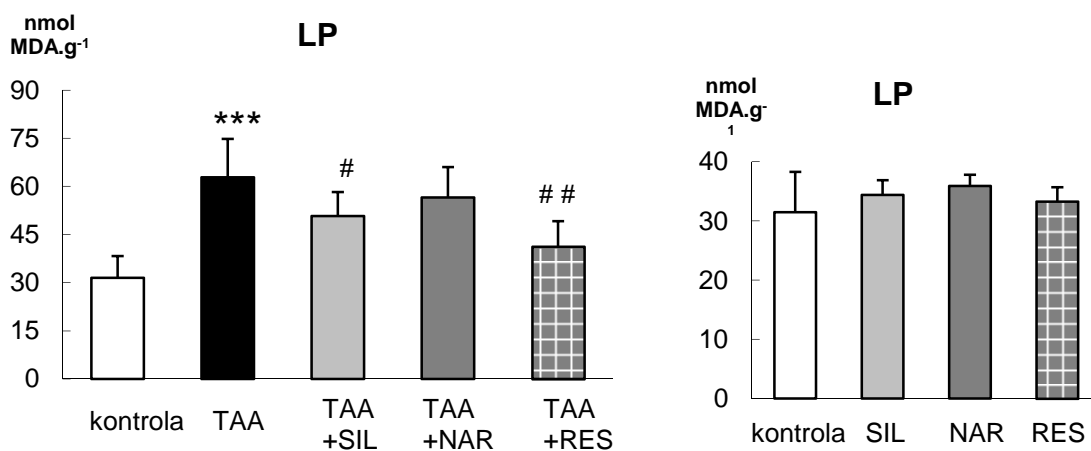
Obrázek 5.6: **Aktivita alanin aminotransferázy** v séru po podání thioacetamidu (TAA) a silymarinu (SIL), naringinu (NAR) nebo resveratrolu (RES). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SD. *** $p < 0,005$ vztaženo ke kontrole, # $p < 0,05$ vztaženo ke skupině TAA.



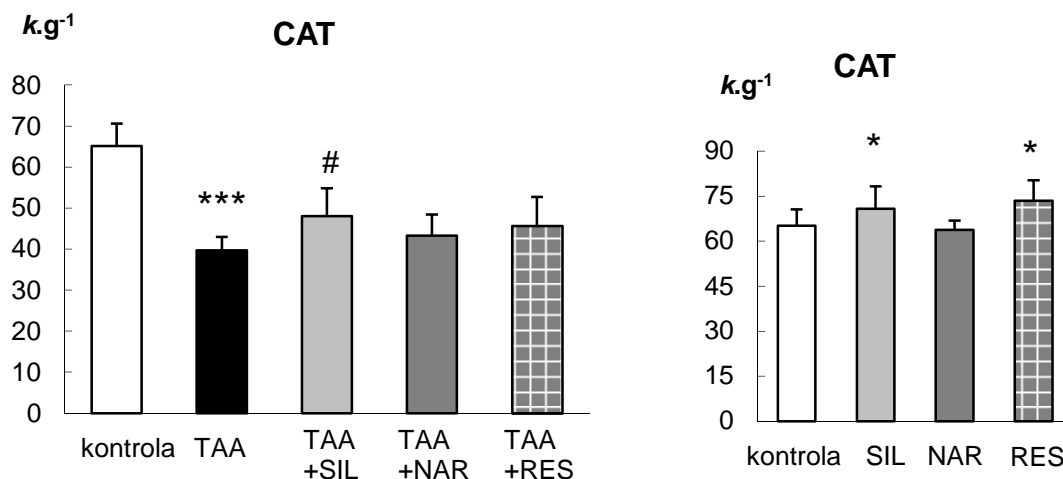
Obrázek 5.7: **Aktivita aspartát aminotransferázy** v séru po podání thioacetamidu (TAA) a silymarinu (SIL), naringinu (NAR) nebo resveratrolu (RES). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SD. *** $p < 0,005$ vztaheno ke kontrole; ## $p < 0,01$ vztaheno ke skupině TAA.

Hladina **LP** v jaterních homogenátech byla statisticky významně navýšena ve skupině TAA o 99,3 % oproti kontrolní skupině. Silymarin, resp. resveratrol redukoval tuto hodnotu o 20 %, resp. o 34 %, viz obrázek 5.8. Koncentrace **GSH** v jaterních homogenátech u zvířat, která obdržela silymarin byla zvýšena o 10 % ($p < 0,05$) v porovnání s kontrolní skupinou. Hodnoty v ostatních skupinách zůstávaly na kontrolní úrovni.

Aktivita **GPx** v jaterních homogenátech byla u zvířat skupiny TAA redukována o 21,8 % oproti kontrolní hodnotě. Tato hodnota nebyla podáním SIL, NAR nebo RES významně změněna. U zvířat, která dostala SIL a NAR, byla statisticky významně snížena aktivita GPx ($p < 0,05$) v porovnání s kontrolní hladinou. Thioacetamid redukoval aktivitu **CAT** v jaterních homogenátech o 39,1 % oproti kontrolní hodnotě. Premedikace silymarinem vedla k nárůstu aktivity CAT o 20 %. Naringin ani resveratrol neovlivnily významně TAA-redukovanou hladinu CAT, viz obrázek 5.9. Samostatně podaný silymarin, resp. resveratrol zvýšily aktivitu CAT o 8,7 %, resp. o 12 %.



Obrázek 5.8: **Hladina peroxidace lipidů** v jaterních homogenátech po podání thioacetamidu (TAA) a silymarinu (SIL), naringinu (NAR) nebo resveratrolu (RES). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SD. *** $p < 0,005$ vztaheno ke kontrole; ## $p < 0,01$; # $p < 0,05$ vztaheno ke skupině TAA.



Obrázek 5.9: **Aktivita katalázy** v jaterních homogenátech po podání thioacetamidu (TAA) a silymarinu (SIL), naringinu (NAR) nebo resveratrolu (RES). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SD. *** $p < 0,005$; * $p < 0,05$ vztaženo ke kontrole; # $p < 0,05$ vztaženo ke skupině TAA

Závěr:

Thioacetamid indukoval poškození jaterní tkáně, což je demonstrováno navýšením aktivit enzymů ALT, AST a GLDH v séru. Thioacetamid navodil oxidační stres, který byl vyjádřen nárůstem hladiny LP, sníženou aktivitou GPx a CAT.

Silymarin zmírnil TAA-indukovanou aktivitu AST, na aktivitu ALT a GLDH neměl vliv. TAA-indukovaná hladina LP byla po podání silymarinu snížena, což demonstruje antioxidační vlastnosti silymarinu. Protektivní působení měl silymarin na TAA-indukované snížení CAT. Samostatně podaný silymarin zvýšil hladinu GSH a CAT, snížil však aktivitu GPx.

Naringin se v intoxikaci thioacetamidem neuplatnil. Měl vliv pouze na snížení aktivity GPx v porovnání s kontrolní skupinou.

Resveratrol zmírnil TAA-indukovanou aktivitu ALT, na aktivitu AST a GLDH neměl vliv. Antioxidační působení resveratrolu se projevilo jako snížení lipoperoxidace navozené thioacetamidem. Samostatně podaný resveratrol zvýšil aktivitu katalázy.

Silymarin a resveratrol vykazují významné antioxidační účinky při intoxikaci thioacetamidem, především prospěšný účinek na hladinu peroxidace lipidů.

5.3 Vliv antioxidantů na intoxikaci tamoxifenem

5.3.1 Vliv SIL, NAR a RES na intoxikaci tamoxifenem

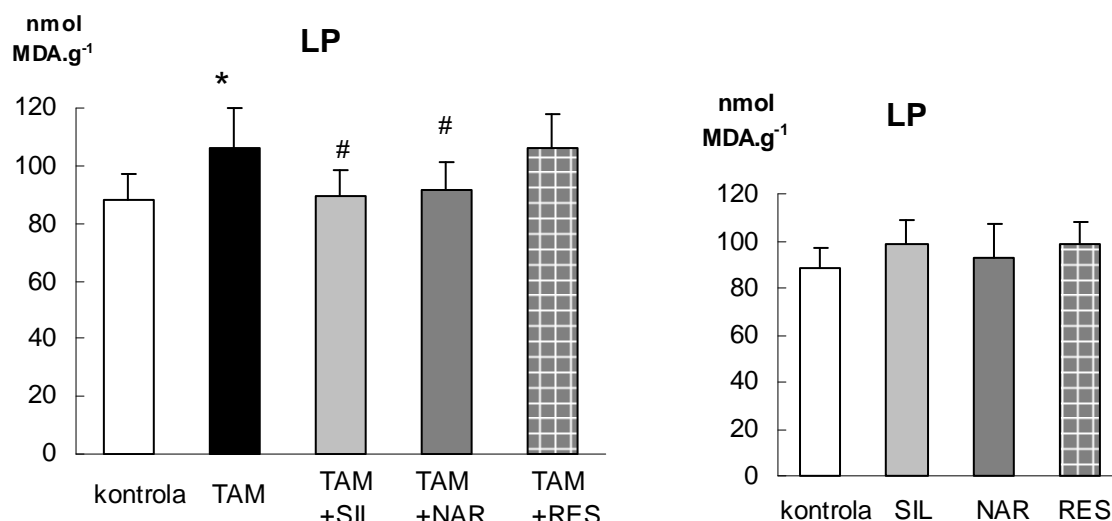
V experimentu byl sledován vliv premedikace silymarinem, naringinem a resveratrolem na parametry jaterního poškození a oxidačního stavu při akutní intoxikaci tamoxifenem u potkana. Experiment probíhal na samicích. V pokusu byla zvířata rozdělena do 8 skupin po 7 zvířatech. Pokus byl naplánován na 7 dnů.

Potkanům v kontrolní skupině byla podána 0,5% metylcelulóza 1krát denně po dobu 6 dnů. Silymarin (98 mg/kg), naringin (16 mg/kg) resp. resveratrol (5,5 mg/kg) byl podáván 1krát denně po dobu 6 dnů. Pátý a šestý den pokusu byl podán potkanům II.-V.skupiny tamoxifen *p.o.* v dávce 75 mg/kg, přičemž zvířata III.-V. skupiny jej obdržela 2 hod po podání SIL, NAR a RES. Pokus byl ukončen dekapitací 24 hod po poslední dávce TAM. Byla odebrána krev za účelem získání séra pro stanovení aktivity ALT, AST a GLDH. Dále byla vyjmuta játra pro stanovení LP, GSH, aktivity CAT a GPx a koncentrace železa.

Výsledky:

Po opakovaném podání tamoxifenu došlo k navýšení **aktivity ALT** v séru o 49,3 % v porovnání s kontrolní skupinou. Podání antioxidantů neovlivnilo TAM-indukovanou aktivitu ALT. **Aktivita AST** zůstávala na kontrolní hodnotě jak po podání samotného TAM tak po současné medikaci antioxidanty. Samotné antioxidanty vyvolaly významné snížení aktivity AST v porovnání s kontrolní skupinou. Tamoxifen samotný nevyvolal navýšení **aktivity GLDH** v séru. Aktivita GLDH byla statisticky významně navýšena u skupiny TAM+SIL ($p < 0,05$). Samostatně podané antioxidanty neovlivnily kontrolní hodnotu aktivity GLDH.

Tamoxifen navýšil hladinu **peroxidace lipidů** v jaterních homogenátech o 20 % oproti kontrolní hladině. Silymarin a naringin zcela zabránily indukci LP navozené tamoxifenem. Resveratrol nezměnil hodnotu LP vzhledem ke skupině TAM; viz obrázek 5.10. Hodnoty **GSH** v jaterních homogenátech u všech testovaných skupin zůstávaly na kontrolní úrovni. Ve skupině, která dostávala opakovaně tamoxifen, byla aktivita **GPx** v jaterních homogenátech statisticky významně redukována ($p < 0,05$). Medikace antioxidanty nezměnila významně tuto hodnotu. Samostatně podávané antioxidanty nezpůsobily změny v aktivitě GPx. Aktivita **CAT**, resp. **koncentrace železa** v játrech zůstávaly na kontrolní úrovni u všech testovaných skupin.



Obrázek 5.10: **Hladina peroxidace lipidů** v jaterních homogenátech po podání tamoxifenu (TAM) a silymarinu (SIL), naringinu (NAR) nebo resveratrolu (RES). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SD. * $p < 0,05$ vztaheno ke kontrole; # $p < 0,05$ vztaheno ke skupině TAM.

Závěr:

Tamoxifen výrazně navýšil aktivitu ALT v séru. Aktivitu AST a GLDH neovlivnil. Po podání tamoxifenu došlo k indukci LP v jaterní tkáni. Oxidační stav byl dále ovlivněn na úrovni GPx, kdy tamoxifen snížil aktivitu tohoto antioxidantního enzymu.

Silymarin ovlivnil aktivitu GLDH, přičemž hodnota byla výrazně navýšena oproti kontrolní i TAM skupině. Po podání samotného SIL došlo ke snížení aktivity AST. Silymarin prokázal antioxidantní vlastnosti, když působil preventivně proti TAM-indukovanému zvýšení LP.

Naringin, podobně jako silymarin, prokázal antioxidantní působení na hladinu peroxidace lipidů, když snížil obsah MDA v jaterních homogenátech. Dále byla snížena aktivita AST v porovnání s kontrolní skupinou. Na ostatní parametry neměl naringin vliv.

Resveratrol měl vliv pouze na aktivitu AST, kterou snížil vzhledem ke kontrolní skupině. Ostatní parametry zůstaly neovlivněny.

V tomto experimentu se projeví antioxidantní účinky silymarinu a naringinu, přičemž tyto antioxidanty zcela zamezí TAM-indukované lipoperoxidaci.

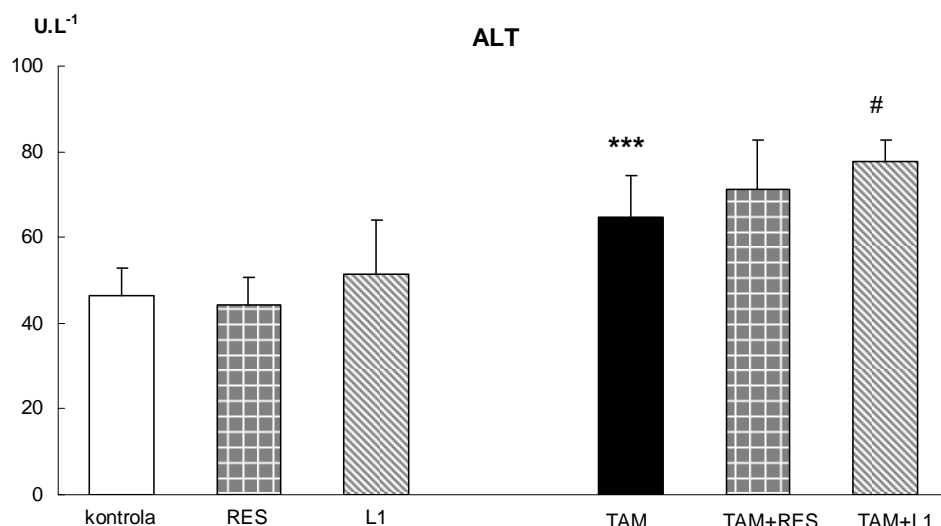
5.3.2 Vliv RES a L1 na intoxikaci tamoxifenem

Pokus s tamoxifenem byl proveden v podobném uspořádání jako u 5.3.1, přičemž byl sledován vliv resveratrolu a deferipronu (L1) na tamoxifenem indukované poškození jater. Experiment probíhal na samicích. Zvířata byla rozdělena do šesti skupin po 8 zvířatech. Pokus trval 5 dnů.

Potkanům v kontrolní skupině byla podána 0,5% metylcelulóza 1krát denně po dobu 4 dnů. Resveratrol (5,5 mg/kg), resp. deferipron (50 mg/kg), byl podáván 1krát denně po dobu 4 dnů. Třetí a čtvrtý den pokusu byl podán potkanům IV.-VI.skupiny tamoxifen *p.o.* v dávce 75 mg/kg, přičemž zvířata V.a VI. skupiny jej obdržela 2 hod po podání RES, resp. L1. Pokus byl ukončen dekapitací 24 hod po poslední dávce TAM. Byla odebrána krev za účelem získání séra pro stanovení aktivity ALT, AST a GLDH. Dále byla vyjmuta játra pro stanovení LP, GSH, aktivity CAT a GPx a koncentrace železa.

Výsledky:

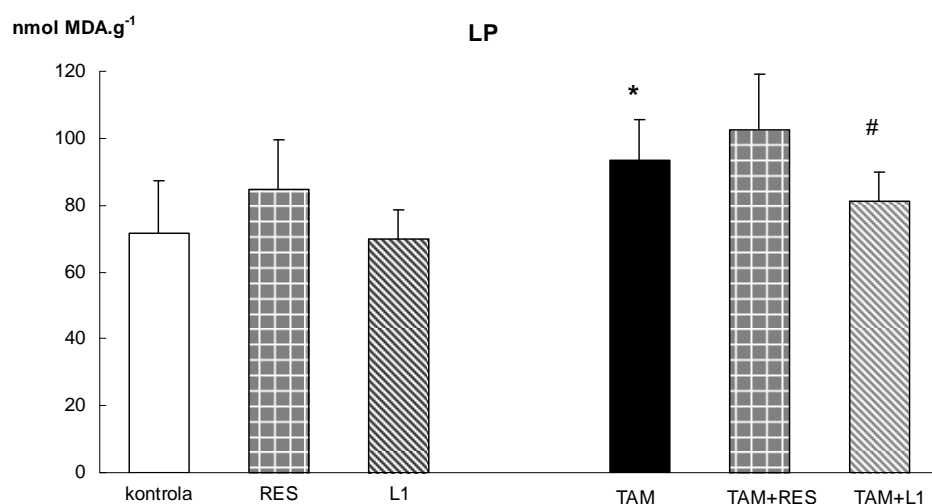
Tamoxifen indukoval navýšení **aktivity ALT** v séru o 40 % v porovnání s kontrolní skupinou. Deferipron zvýšil tuto hodnotu o dalších 20 %. Resveratrol navýšenou hodnotu ALT nezměnil, viz obrázek 5.11. **Aktivita AST** v séru byla snížena deferipronem o 17 % v porovnání s kontrolní skupinou. U ostatních testovaných skupin zůstala aktivita AST neovlivněna. Aktivita **GLDH** v séru byla ve všech testovaných skupinách na kontrolní hladině..



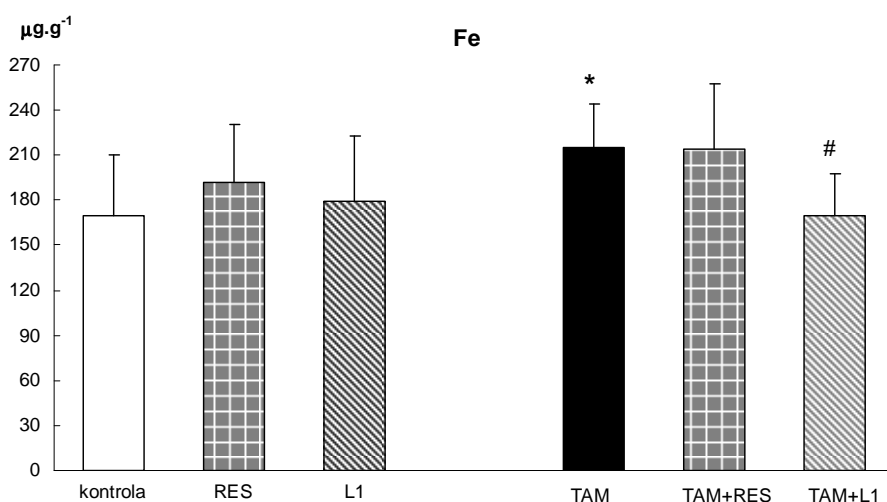
Obrázek 5.11: **Aktivita alanin aminotransferázy** v séru po podání tamoxifenu (TAM) a resveratrolu (RES) nebo deferipronu (L1). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr \pm SD. *** $p < 0,005$ vztaheno ke kontrole; # $p < 0,05$ vztaheno ke skupině TAM.

Tamoxifen indukoval navýšení **peroxidace lipidů** v jaterních homogenátech o 30 % v porovnání s kontrolními potkany. Deferipron zcela zamezil indukci lipoperoxidace. Resveratrol neovlivnil hladinu LP, viz obrázek 5.12. Tamoxifen indukoval navýšení **obsahu železa** v játrech o 26 % v porovnání s kontrolní skupinou. Deferipron zcela zabránil kumulaci železa v játrech. Resveratrol neovlivnil koncentraci železa v jaterní tkáni, viz obrázek 5.13.

Hodnoty **GSH** v jaterních homogenátech nebyly medikací ovlivněny a zůstávaly na kontrolní úrovni. Samostatně podaný deferipron snížil aktivitu **GPx** v jaterních homogenátech o 14 %, zatímco aktivitu **CAT** zvýšil o 22 % ve srovnání s kontrolními hladinami. Aktivita GPx (obrázek 5.30) a CAT (obrázek 5.31) nebyly v ostatních testovaných skupinách ovlivněny.



Obrázek 5.12: **Hladina peroxidace lipidů** v jaterních homogenátech po podání tamoxifenu (TAM) a resveratrolu (RES) nebo deferipronu (L1). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr ± SD. * $p < 0,05$ vztaheno ke kontrole; # $p < 0,05$ vztaheno ke skupině TAM.



Obrázek 5.13: **Koncentrace železa** v jaterní tkáni po podání tamoxifenu (TAM) a resveratrolu (RES) nebo deferipronu (L1). Data jsou vyjádřena jako aritmetický průměr ± SD. * $p < 0,05$ vztaheno ke kontrole; # $p < 0,05$ vztaheno ke skupině TAM.

Závěr:

Podobně jako v předchozím pokusu s tamoxifenem, v tomto experimentu došlo po podání TAM ke zvýšení aktivity ALT a LP. Navíc byla navýšena ještě koncentrace železa v játrech. Ostatní parametry zůstaly neovlivněny.

Resveratrol v dávce 5,5 mg/kg (celkem 4krát) neovlivnil žádný parametr.

Deferipron zvýšil tamoxifenem indukovaný nárůst aktivity ALT. Výrazný vliv měl také na indukci LP a koncentraci Fe po podání tamoxifenu, přičemž zcela zamezil jak navýšení LP, tak navýšení koncentrace železa. Deferipron dále zvýšil aktivitu katalázy a snížil aktivitu glutathion peroxidázy vzhledem ke kontrolní skupině. Výrazné preventivní působení deferipronu na peroxidaci lipidů koresponduje s protektivními účinky na hladinu železa v játrech. Zde se pravděpodobně uplatňují známé chelatační účinky tohoto léčiva. V porovnání s resveratrolem měl deferipron jednoznačně lepší protektivní působení proti oxidačnímu stresu vyvolanému tamoxifenem.

V následujících dvou tabulkách jsou znázorněny účinky jednotlivých látek na vybrané parametry. Tabulka 5.1 shrnuje účinky hepatotoxicky působících látek – paracetamolu, thioacetamidu a tamoxifenu - na parametry jaterního poškození. Tabulka 5.2 shrnuje účinky silymarinu, naringinu, resveratrolu a deferipronu na parametry jaterního poškození vyvolané jednotlivými hepatotoxikanty.

Tabulka 5.1 Účinky xenobiotik na parametry jaterního poškození

(↑ zvýšení hodnoty, ↓ snížení hodnoty, 0 bez účinku, n.a není analyzováno)

	APAP	TAA	TAM 1	TAM 2
ALT / AST / GLDH	↑ / ↑ / ↑	↑ / ↑ / ↑	↑ / 0 / 0	↑ / 0 / 0
LP / GSH / Fe	0 / 0 / 0	↑ / 0 / n.a.	↑ / 0 / 0	↑ / 0 / ↑
GPx / CAT	↓ / 0	↓ / ↓	↓ / 0	0 / 0

Tabulka 5.2 Účinky antioxidantů na parametry jaterního poškození vztahované

k intoxikovaným skupinám (+ prospěšný účinek, - nepříznivý účinek, 0 bez účinku)

	SIL	NAR	RES	L1
APAP ALT / AST / GLDH	0 / 0 / +	+ / + / +	+ / + / +	
LP / GSH / Fe	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0	
GPx / CAT	- / 0	- / +	- / 0	
TAA ALT / AST / GLDH	0 / + / 0	0 / 0 / 0	+ / 0 / 0	
LP / GSH	+ / 0	0 / 0	+ / 0	
GPx / CAT	0 / +	0 / 0	0 / 0	
TAM 1 ALT / AST / GLDH	0 / 0 / -	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0	
LP / GSH / Fe	+ / 0 / 0	+ / 0 / 0	0 / 0 / 0	
GPx / CAT	0 / 0	0 / 0	0 / 0	
TAM 2 ALT / AST / GLDH			0 / 0 / 0	- / 0 / 0
LP / GSH / Fe			0 / 0 / 0	+ / 0 / +
GPx / CAT			0 / 0	0 / 0

6 Diskuse

V pokusu na potkanech jsme sledovali vliv přírodních antioxidantů silymarinu, naringinu a resveratrolu a dále syntetického léčiva (chelátoru) deferipronu na jaterní poškození vyvolané vybranými xenobiotiky. Pro pokusné účely byly zvoleny tři potenciálně hepatotoxické látky: paracetamol, thioacetamid a tamoxifen. Experimenty s paracetamolem a thioacetamidem jsme prováděli na potkanech samcích. Pokusy s tamoxifenem byly prováděny na samicích potkana, jelikož tamoxifen je léčivo používané u žen v terapii karcinomu prsu. Rozdíly v hodnotách měřených parametrů ve vztahu k pohlaví nebyly předmětem zkoumání.

Dávka **paracetamolu** 900 mg/kg byla zvolena na základě dostupné literatury, přičemž pro indukci jaterního poškození u potkana se nejčastěji uvádí dávkování v rozmezí 750-2000 mg/kg, a to cestou perorální nebo intraperitoneální (Hwang, 2008; Abdel-Zaher, 2008; Chandrasekaran, 2009). V našem pokusu po jednorázovém podání paracetamolu došlo k navýšení aktivity ALT, AST a GLDH v séru, potvrdili jsme tedy popsání účinky paracetamolu na aktivitu jaterních enzymů (Mroueh, 2004; Ishida 1995). Zvýšená aktivita jaterních enzymů v séru je dána poškozením buněk v určité funkční oblasti jaterního lobulu a vyjitím obsahu buněk, včetně enzymů, do krevního řečiště. Aktivita ALT převažuje v periportální zóně, zatímco aktivita GLDH je vyšší v centrilobulární oblasti, enzym AST je v zónách homogenně rozptýlen (O'Brien, 2002). Nárůst aktivity daného enzymu pak charakterizuje nekrózu v dané oblasti lobulu. Z hlediska parametrů oxidačního stavu v jaterní tkáni, po podání paracetamolu byla navýšena koncentrace GSH a snížena aktivita GPx v jaterních homogenátech. V našem případě jsme neprokázali navýšení peroxidace lipidů ani sníženou koncentraci GSH, jak uvádí např. Soares (2013). Zde může hrát roli jednak velikost podané dávky (u Soarese 2 g), jednak časový interval od podání po usmrcení potkanů, který byl v práci Soarese (2013) 48 hod. Naproti tomu u Senera a kol. (2006) byla LP indukována po 4 hod od *i.p.* aplikace paracetamolu. Domníváme se tedy, že hladina peroxidace lipidů závisí nejen na velikosti podané dávky ale též na časovém rozmezí od podání APAP do ukončení pokusu. **Thioacetamid** byl podáván v dávce 150 mg/kg, přičemž rozmezí dávek, které se experimentálně používají k indukci hepatotoxicity *in vivo*, se pohybuje od 70 do 600 mg/kg intravenózní nebo intraperitoneální aplikací. (Chen, 2008; Sawant, 2007; Uskokovič-Markovič, 2007). Podle Chen a kol. (2008) je maximální hladiny aminotransferáz v séru dosaženo 24 – 48 hod po *i.v.* podání. V našem pokusu byla 48 hod od *i.p.* podání thioacetamidu aktivita ALT, AST i GLDH výrazně navýšena oproti kontrolní skupině. Byla indukována hladina peroxidace lipidů a inhibována aktivita katalázy a glutathion peroxidázy v jaterních homogenátech. Koncentrace redukovaného glutathionu nebyla thioacetamidem ovlivněna. Hepatotoxicita **tamoxifenu** u potkana je v dostupné literatuře méně popisována, než experimenty s výše zmíněnými xenobiotiky. V pracích převažuje intraperitoneální podání tamoxifenu v dávkách 45-100 mg/kg tělesné hmotnosti (El-Beshbishy, 2005; Süzme, 2001; Albukhari, 2009). V předpokusu jsme porovnali intraperitoneální a perorální podání tamoxifenu v dávce 75 mg/kg a zjistili jsme navýšení aminotransferáz a lipoperoxidace u *p.o.* podání, kdežto při *i.p.* podání nedošlo k ovlivnění těchto parametrů (není v této práci graficky znázorněno). V experimentu s tamoxifenem (2krát 75 mg/kg, *p.o.*) a antioxidanty (SIL, NAR, RES) jsme po aplikaci tamoxifenu zaznamenali navýšení aktivity alanin aminotransferázy;

aktivita aspartát aminotransferázy a glutamát dehydrogenázy nebyla tamoxifenem ovlivněna. Tamoxifen indukoval navýšení hladiny peroxidace lipidů a snížení aktivity glutathion peroxidázy oproti kontrolním zvířatům. Koncentrace glutathionu, železa a aktivita katalázy zůstaly po aplikaci tamoxifenu na kontrolní úrovni. Tamoxifen (2krát 75 mg/kg, *p.o.*) jsme podali také v pokusu s deferipronem a resveratrolem, kde jsme porovnávali jejich potencionálně protektivní účinky. Tamoxifen navodil zvýšení aktivity alanin aminotransferázy a zvýšení hladiny peroxidace lipidů. Současně došlo k navýšení koncentrace železa v jaterní tkáni. Koncentrace GSH a aktivity GPx, CAT, AST a GLDH po podání tamoxifenu zůstaly nezměněny.

V našich pokusech jsme sledovali **vliv premedikace silymarinem** na intoxikaci paracetamolem, thioacetamidem a tamoxifenem. V jednotlivých experimentech jsme použili různé dávky silymarinu. V pokusu s thioacetamidem jsme aplikovali silymarin 5krát v denní dávce 175 mg/kg, přičemž z předchozích pokusů víme, že látka v tomto množství vykazovala antioxidační účinky. Tyto účinky jsme znovu prokázali. Výrazný antioxidační účinek silymarinu se projevil na hladinu peroxidace lipidů, přičemž silymarin redukoval thioacetamidem-indukované zvýšení LP. Dále byl zaznamenán příznivý vliv na aktivitu katalázy, která - thioacetamidem redukována - byla silymarinem navýšena. Též byla vyšší aktivita katalázy u samostatně podaného silymarinu v porovnání s kontrolní skupinou. Mírný nárůst, ačkoliv statisticky nevýznamný, byl pozorován u thioacetamidem snížené aktivity GPx. V případě samostatně podaného silymarinu však došlo ke snížení aktivity GPx. Antioxidační efekt silymarinu se projevil též v nárůstu koncentrace redukovaného GSH v porovnání s kontrolní skupinou, jak popisuje např. Basaga (1997). Shaker a kol. ve své práci (2011) sledovali vliv chronického podávání (8 týdnů) silymarinu (50 mg/kg) na jaterní fibrózu vyvolanou thioacetamidem, přičemž silymarin výrazně redukoval thioacetamidem-indukované navýšení aminotransferáz až pod úroveň kontrolních hodnot. V tomto chronickém pokusu nebyly, na rozdíl od našeho experimentu, navozeny thioacetamidem změny v LP, ale podobně jako v našem pokusu, silymarin způsobil navýšení GSH. Hepatoprotektivní účinky silybin-fytosomu (fytosom- komplex přírodní aktivní látky s fosfolipidem) na TAA-intoxikaci byly popsány také v 7-týdenním pokusu autora Ali a kol. (2014), přičemž zde se manifestovaly, mimo jiné, preventivní účinky jak na zvýšenou aktivitu aminotransferáz, tak na lipoperoxidaci a sníženou hladinu GSH.

V pokusu s paracetamolem jsme aplikovali silymarin 3krát v dávce 131 mg/kg. Dávka odpovídá $\frac{3}{4}$ dávky 175 mg/kg z pokusu s thioacetamidem. V tomto případě silymarin nevyvolal snížení ALT ani AST, nicméně redukoval APAP-indukované zvýšení GLDH až na kontrolní hodnotu. Hladina peroxidace lipidů nebyla silymarinem ovlivněna, u skupiny APAP však byla také na úrovni kontroly, takže nelze posoudit případné protektivní účinky na peroxidaci lipidů. Hodnota GSH byla navýšena u skupiny, která obdržela paracetamol spolu se silymarinem. Je však diskutabilní, která ze dvou podaných látek navýšení vyvolala, protože jak paracetamol tak silymarin, samostatně podané, hladinu redukovaného glutathionu zvyšovaly. Naopak, v práci Muriela a kol. (1992) paracetamol snižoval GSH a tomuto poklesu silymarin (200 mg/kg) nezabránil. V našem pokusu silymarin samotný snížil aktivitu GPx a v kombinaci s paracetamolem snížení více prohloubil. Snížení GPx jsme podobně

pozorovali také v pokusu s thioacetamidem, viz výše. Aktivita katalázy v jaterních homogenátech nebyla v tomto pokusu ovlivněna ani paracetamolem, ani silymarinem.

Redukovaný glutathion slouží jako zhášec reaktivních forem kyslíku a jako substrát glutathion peroxidázy. Domníváme se, že pokud exogenní antioxidanty působí jako zametače volných radikálů, je zabráněno snížení koncentrace endogenního scavengeru GSH. Přesto je ale GSH spotřebováván glutathion peroxidázou, jejíž aktivita se během oxidačního stresu snižuje. Navýšená koncentrace GSH spolu se sníženou aktivitou GPx tak může znamenat jistou „obrannou“ reakci tkáně, kdy je snaha kompenzovat zvýšenou ztrátu enzymové aktivity zvýšenou koncentrací redukovaného glutathionu, jakožto substrátu GPx.

V našem experimentu byla měřena koncentrace železa v jaterní tkáni, kterou silymarin v této dávce (131 mg/kg) navýšil, což je v rozporu se známými chelatačními účinky silymarinu (Valenzuela, 1994). Může zde hrát roli způsob aplikace, jelikož Najafzadeh a kol. ve své práci (2010) popisují účinky silymarinu (200 mg/kg) na snižování obsahu železa v jaterní tkáni, přičemž pouze u *i.p.*, nikoliv u *p.o.* podaného silymarinu došlo ke snížení koncentrace železa v jaterní tkáni; obsah železa v séru byl však redukován oběma způsoby podání. V našem pokusu s paracetamolem jsme tedy pozorovali jednak hepatoprotektivní účinky silymarinu na aktivitu GLDH, jednak jeho antioxidantní působení vyjádřené zvýšenou hladinou redukovaného glutathionu.

V pokusu s tamoxifenem byl silymarin podáván 6krát v denní dávce 98 mg/kg (odpovídá $\frac{3}{4}$ dávky 131 mg/kg z pokusu s paracetamolem). Zde jsme pozorovali opět antioxidantní účinky silymarinu, přičemž silymarin zcela zabránil tamoxifenem indukované lipoperoxidaci. V ostatních parametrech charakterizujících oxidační stav (GSH, CAT, obsah Fe) nedošlo ke změně ani v případě tamoxifenu, ani po podání silymarinu. Pouze u GPx byl mírný pokles v aktivitě, kterou silymarin zvýšil, avšak statisticky nevýznamně. V séru byla po podání tamoxifenu naměřena zvýšená hladina ALT, kterou silymarin neovlivnil. Aktivita GLDH významně vzrostla po podání tamoxifenu+silymarinu, přičemž po podání jednotlivých látek byla na kontrolní úrovni. V tomto pokusu nedošlo k výrazné manifestaci jaterního poškození. Nicméně silymarin podaný v dávce 98 mg/kg vykazoval protektivní účinky vůči zvýšené lipoperoxidaci, což koresponduje s výsledky práce Conti a kol. (1992), kde jsou též vyjádřeny inhibiční účinky na peroxidaci membránových lipidů.

Hepatoprotektivní účinky silymarinu (5krát 175 mg/kg, resp. 6krát 98 mg/kg) se projeví především v experimentu s thioacetamidem, resp. tamoxifenem, kde působil jako inhibitor peroxidace lipidů a přispěl k antioxidantní ochraně zvýšením aktivity katalázy.

Sledovali jsme **vliv podávání naringinu** na intoxikaci výše zmíněnými xenobiotiky. Nejvyšší dávka naringinu 30 mg/kg byla podána celkem 5krát v kombinaci s thioacetamidem. V této dávce se nám nepodařilo dosáhnout žádného protektivního, nicméně ani prooxidativního účinku. Došlo ke změně pouze v aktivitě GPx, kterou naringin, podobně jako silymarin 5krát podaný, snížil oproti kontrole. Ostatní parametry zůstaly beze změny oproti zvířatům, která obdržela thioacetamid.

Snížení dávky naringinu o $\frac{1}{4}$ na 22,5 mg/kg v počtu tří dávek přineslo významné snížení aktivit jaterních enzymů, které byly navýšeny paracetamolem. Aktivita ALT byla snížena o 17 % oproti skupině APAP, aktivita AST a GLDH byla snížena dokonce na kontrolní hladinu. Peroxidace lipidů nebyla podáním paracetamolu ovlivněna, ani naringin

(3krát 22,5 mg/kg) na ni neměl vliv. Naringin v této dávce zvýšil aktivitu CAT a koncentraci redukovaného glutathionu oproti kontrolní skupině. Samostatně podaný naringin snížil aktivitu GPx a snížení bylo dále prohloubeno v kombinaci s paracetamolem. Na koncentraci železa v jaterní tkáni nemělo podání naringinu vliv. Takto uspořádané schéma dávkování naringinu (3krát 22,5 mg/kg) jsme již dříve použili v pokusu s CCl₄, kdy jsme prokázali jak antioxidační účinky- snížení LP, tak protektivní účinky na zvýšené aktivity jaterních enzymů- ALT, AST. Práce byla prezentována a publikována jako krátké sdělení v rámci konference Toxcon 2008 (Černá, 2008).

Další snížení dávky naringinu o ¼ na 16 mg/kg v počtu šesti dávek bylo zvoleno pro pokus s tamoxifenem. Naringin neovlivnil tamoxifenem navýšenou aktivitu ALT. Aktivita AST byla po naringinu snížena oproti kontrole ($p < 0,005$), avšak ve skupině, která obdržela naringin spolu s tamoxifenem, ke snížení nedošlo. V tomto parametru se takto projeví všechny tři testované antioxidanty silymarin, naringin a resveratrol - snížily aktivitu AST v porovnání s kontrolní skupinou i se skupinou TAM. Aktivita GLDH nebyla naringinem ovlivněna. Naringin v tomto dávkování (6krát 16 mg/kg) měl vliv na tamoxifenem zvýšenou hladinu peroxidace lipidů, přičemž tuto hladinu významně snížil na kontrolní hodnotu. V tomto parametru se tedy projevil antioxidační potenciál naringinu, který je popisován např. v práci Amudhy (2011), kde byl naringin podáván potkanům při toxickém poškození navozeném niklem. Další parametry oxidačního stavu (GSH, GPx, CAT) ani koncentrace Fe v játrech nebyly v našem pokusu ovlivněny. V potkaních hepatocytech (Cavia-Saiz, 2010) byly zkoumány antioxidační vlastnosti naringinu (glykosid) a jeho aglykonu naringenin. Oba citrusové flavonoidy vykazovaly protektivní účinky na lipoperoxidaci vyvolanou hydroxylovým a peroxylovým radikálem, přičemž naringenin byl dle IC₅₀ hodnoty účinnější zřejmě z důvodu volné hydroxylové skupiny na uhlíku C7. Podobně jako v naší práci, v této práci autorky Cavia-Saiz (2010) též nebyl zaznamenán nárůst redukovaného glutathionu, pouze u aglykonu došlo k velmi mírnému zvýšení koncentrace GSH.

Premedikace naringinem (6krát 16 mg/kg) v našem pokusu působila protektivně na tamoxifenem indukovanou peroxidaci lipidů u samic potkana. Prokázali jsme hepatoprotektivní působení naringinu na intoxikaci paracetamolem, přičemž naringin (3krát 22,5 mg/kg) inhiboval paracetamolem indukované navýšení jaterních enzymů.

Dále jsme sledovali **vliv resveratrolu** na toxicitu vybraných látek. V pokusu s thioacetamidem byla zvolena dávka 10 mg/kg v počtu pěti dávek. Velikost dávky jsme zvolili na základě našich předchozích nepublikovaných pokusů. Z dostupné literatury nejsou známy příklady působení resveratrolu na toxicitu thioacetamidu, i když se resveratrolem a jeho různými protektivními účinky, včetně hepatoprotektivních, zabývají mnohá pracoviště (např Farghali, 2009). V našem experimentu resveratrol významně snížil thioacetamidem navýšenou aktivitu ALT, neovlivnil však navýšení AST ani GLDH. V této dávce (10 mg/kg) se projevil antioxidační potenciál resveratrolu, když zmírnil thioacetamidem indukovanou lipoperoxidaci v játrech, což je v souladu s prací Abdina a kol. (2014), kde uvedený antioxidant (10 mg/kg) blokoval oxidační stres mimo jiné tím, že snížil koncentraci MDA *in vivo*. Na aktivitu glutathion peroxidázy, která byla v našem pokusu po TAA snižená, neměl resveratrol vliv. Nicméně samostatně podaný resveratrol, na rozdíl od silymarinu a naringinu, nepůsobil snížení aktivity tohoto antioxidačního enzymu. Aktivita katalázy byla statisticky

významně navýšena samostatně podaným resveratrolem ($p < 0,05$), avšak při podání spolu s thioacetamidem zvýšil resveratrol aktivitu tohoto enzymu pouze nevýznamně. Hladina glutathionu po premedikaci resveratrolem zůstávala na kontrolní hladině. Příspěvek o účinku resveratrolu na intoxikaci TAA byl publikován v *Toxicology Letters* v rámci konference Eurotox 2008 (Černá, 2008) a dále citován autory Roy a kol. (2011).

V pokusu s paracetamolem jsme snížili dávku resveratrolu o $\frac{1}{4}$ na 7,5 mg/kg, přičemž tento jsme podali celkem 3krát. Paracetamol indukoval zvýšenou aktivitu jaterních enzymů ALT, AST, GLDH. Premedikací resveratrolem bylo dosaženo významného snížení aktivity ALT ($p < 0,05$) a GLDH ($p < 0,01$), aktivita AST poklesla na kontrolní hladinu. Antioxidační působení resveratrolu lze demonstrovat zvýšenou hladinou redukováného GSH ($p < 0,005$), avšak i paracetamol samotný zvýšil koncentraci GSH ($p < 0,05$). Aktivita GPx poklesla podáním APAP, premedikace resveratrolem toto snížení více prohloubila. Též samostatně podaný RES, stejně jako NAR a SIL, způsobil pokles v aktivitě tohoto enzymu. V minulosti jsme sledovali vliv resveratrolu na jaterní poškození vyvolané tetrachlormethanem u potkana. Pokus byl proveden v podobném dávkovacím schématu (resveratrol 3krát 7,5 mg/kg), přičemž tetrachlormethan indukoval zvýšení ALT a AST, LP a snížení GPx. Resveratrol významně snížil aktivitu ALT ($p < 0,01$), aktivitu AST normalizoval na kontrolní hodnotu, snížil též koncentraci GSH, měl však významný protektivní vliv na peroxidaci lipidů. Práce byla prezentována a publikována jako krátké sdělení v rámci konference Toxcon 2008 (Černá, 2008). Působením resveratrolu na CCl_4 indukovanou hepatotoxicitu se zabývá též práce Rivera a kol. (2008), kde RES (10 mg/kg) ve shodě s naším pokusem redukoval aktivitu ALT a hladinu LP.

V pokusu s tamoxifenem, který byl prováděn na samicích potkana, jsme zvolili dávku resveratrolu 5,5 mg/kg, což je o $\frac{1}{4}$ méně než v pokusu s paracetamolem. Resveratrol byl podán celkem 6krát. Tamoxifen indukoval navýšení aktivity ALT a hodnoty LP a snížení aktivity GPx. Resveratrol v tomto dávkovacím schématu nevykazoval protektivní účinky na tamoxifenem indukované jaterní poškození. Neovlivnil tamoxifenem zvýšenou lipoperoxidaci, zvýšenou aktivitu ALT ani sníženou aktivitu GPx. Domníváme se, že zde může mít vliv zvolené pohlaví zvířat, jelikož u samců resveratrol v řádově podobném dávkovacím uspořádání (3krát 7,5 mg/kg, resp. 5krát 10 mg/kg) měl určité protektivní účinky na APAP, resp. na TAA vyvolané poškození jater (snížení ALT, AST, GLDH, resp. snížení ALT a LP). Není známa studie zabývající se vztahem pohlaví a účinku přírodních antioxidantů na parametry oxidačního poškození nebo jaterních dysfunkcí. Nicméně z experimentálních výsledků víme, že u samic je až 2krát vyšší bazální hodnota hladiny lipoperoxidace a aktivity glutathion peroxidázy než u samců (Kotyzová, 2010). Hodnoty ostatních sledovaných parametrů jsou u obou pohlaví relativně shodné. Je možné, že antioxidační potenciál resveratrolu by se projevil při jiném dávkovacím uspořádání (např. větší dávka, více dávek).

Protektivní vliv resveratrolu na jaterní poškození se projevil zejména v experimentu s paracetamolem, kdy resveratrol (3krát 7,5 mg/kg) příznivě ovlivnil aktivitu jaterních enzymů. V experimentu s thioacetamidem měl resveratrol (5krát 10 mg/kg) příznivý vliv na snížení peroxidace lipidů.

Antioxidační vlastnosti přírodních sloučenin jsou dány zejména jejich schopností vychytávat (zhášet) volné radikály. Volné radikály mohou být generovány buď enzymaticky (např. xantin/xantinoxidázovým systémem) nebo neenzymaticky např. Fentonovou reakcí za přítomnosti tranzitních kovů (Fe^{2+} , Cu^+). Přírodní antioxidanty snižují oxidační stres také tím, že vychytávají (chelatují) ionty přechodných kovů, a tak omezují vznik reaktivních forem kyslíku a dusíku. Chelatační účinky jsou závislé na chemické struktuře, především na přítomnosti ligandů, které umožňují vytvoření koordinační vazby s iontem/ionty kovu (Hatcher, 2009). Deferipron je syntetický chelátor železa, jehož účinky na intoxikaci tamoxifenem jsme sledovali. **Deferipron** samostatně podaný jednak snížil aktivitu glutathion peroxidázy a aspartát aminotransferázy, naproti tomu zvýšil aktivitu katalázy. Při podání s tamoxifenem byla zvýšena aktivita alanin aminotransferázy. Nicméně, deferipron měl protektivní účinky proti oxidačnímu stresu vyvolanému tamoxifenem, když zcela zabránil tamoxifenem indukované peroxidaci lipidů a vrátil na kontrolní hodnotu tamoxifenem navýšenou koncentraci železa v játrech. Tato skutečnost koresponduje s chelatačními vlastnostmi deferipronu, které byly na našem pracovišti v minulosti demonstrovány jak v pokusu na myších (Eybl, 2002), tak na potkanech (Hodková, 2010). Práce o účinku deferipronu na intoxikaci tamoxifenem byla publikována v časopise Hemoglobin (Černá, 2011).

7 Souhrn

V pokusech na potkanech jsme porovnávali vliv silymarinu, naringinu a resveratrolu, resp. deferipronu na poškození jater vyvolané paracetamolem, thioacetamidem a tamoxifenem.

1. Parametry oxidačního stavu byly nejvíce ovlivněny po podání thioacetamidu, kdy byla jednak indukována zvýšená peroxidace lipidů, jednak došlo ke snížení aktivit antioxidačních enzymů glutathion peroxidázy a katalázy. Po podání tamoxifenu byl oxidační stres demonstrován zvýšenou lipoperoxidací a koncentrací železa v játrech a sníženou aktivitou GPx. Oxidační stres navozený paracetamolem nebyl vyjádřen tak významně jako u TAA nebo TAM, jelikož paracetamol neindukoval v jaterní tkáni zvýšenou peroxidaci lipidů, nicméně snížil aktivitu GPx.
2. Ze všech tří použitých antioxidantů (SIL, NAR, RES) se v parametrech oxidačního stavu nejvíce uplatnil silymarin, který v pokusu s thioacetamidem zmírnil zvýšenou lipoperoxidaci a zmírnil pokles aktivity katalázy v porovnání se skupinou TAA. Samotný silymarin dále zvýšil hladinu GSH a aktivitu CAT. V pokusu s tamoxifenem silymarin zcela zabránil TAM indukovanému zvýšení peroxidace lipidů. Antioxidační potenciál naringinu se projevil v pokusu s tamoxifenem, když naringin zcela zamezil TAM vyvolané indukci peroxidace lipidů. V pokusu s paracetamolem zvýšil naringin hladinu redukováného glutathionu a aktivitu antioxidačního enzymu katalázy.

Resveratrol prokázal výrazné protektivní účinky proti lipoperoxidaci vyvolané thioacetamidem. V pokusu s paracetamolem resveratrol zvýšil koncentraci redukováného glutathionu.

3. Aktivity jaterních enzymů v séru byly ovlivněny všemi třemi studovanými hepatotoxickými látkami (APAP, TAA, TAM). Paracetamol a thioacetamid vyvolaly zvýšení aktivit ALT, AST a GLDH. Tamoxifen zvýšil pouze aktivitu ALT, aktivity AST a GLDH zůstaly nezměněny.
4. Proti zvýšení aktivity jaterních enzymů protektivně působil především resveratrol, jenž v pokusu s paracetamolem normalizoval zvýšenou aktivitu AST a vrátil na téměř kontrolní hodnoty zvýšené aktivity ALT a GLDH. V pokusu s thioacetamidem se projevil protektivní účinek resveratrolu na TAA navýšenou aktivitu ALT. Naringin vykazoval hepatoprotektivní účinky na paracetamolem indukované poškození jater, přičemž způsobil, podobně jako resveratrol, výrazné snížení aktivit všech tří sledovaných jaterních enzymů- ALT, AST i GLDH. Silymarin měl ze všech tří jmenovaných antioxidantů nejméně výrazný vliv na aktivitu jaterních enzymů, když u zvířat intoxikovaných paracetamolem snížil aktivitu GLDH a u zvířat intoxikovaných thioacetamidem snížil aktivitu AST.
5. Hepatoprotektivní účinky silymarinu se nejvíce projevily v poškození jater thioacetamidem. Naringin působil protektivně zejména v intoxikaci paracetamolem. Resveratrol vykazoval prospěšné účinky na jaterní poškození vyvolané jednak paracetamolem, jednak thioacetamidem.
6. Deferipron zcela zamezil tamoxifenem indukované lipoperoxidaci a zvýšení koncentrace železa. V porovnání s resveratrolelem měl deferipron jednoznačně lepší protektivní působení proti oxidačnímu stresu vyvolanému tamoxifenem.

Použitá literatura:

- Abdel-Zaher A, Abdel-Hady RH, Mahmoud MM, Farrag MM. The potential protective role of alpha-lipoic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. *Toxicology*. 2008 Jan 20;243(3), p. 261-270.
- Abdin A, Sarhan N. Resveratrol protects against experimental induced Reye's syndrome by prohibition of oxidative stress and restoration of complex I activity. *Can J Physiol Pharmacol*. 2014 Sep;92(9), p. 780-788.
- Abenavoli L, Capasso R, Milic N et al. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother Res*. 2010 Oct; 24(10), p. 1423-1432.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105, p. 121-126
- Akhondi-Meybodi M, Mortazavy-Zadah MR, Hashemian Z et al. Incidence and risk factors for non-alcoholic steatohepatitis in females treated with tamoxifen for breast cancer. *Arab J Gastroenterol*. 2011 Mar;12(1), p. 34-36.
- Albukhari AA, Gashlan HM, El-Beshbishy HA et al. Caffeic acid phenethyl ester protects against tamoxifen-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 2009 Jul;47(7), p: 1689-1695.
- Ali SO, Darwish HA, Ismail NA. Modulatory effects of curcumin, silybin-phytosome and alpha-R-lipoic acid against thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Chem Biol Interact*. 2014 Jun 5;216, p. 26-33.
- Amar PJ, Schiff ER. Acetaminophen safety and hepatotoxicity--where do we go from here? *Expert Opin Drug Saf*. 2007 Jul;6(4), p. 341-355.
- Amudha K, Pari L. Beneficial role of naringin, a flavanoid on nickel induced nephrotoxicity in rats. *Chem Biol Interact*. 2011 Aug 15;193(1), p. 57-64.
- Bacon BR, Park CH, Brittenham GM et al. Hepatic mitochondrial oxidative metabolism in rats with chronic dietary iron overload. *Hepatology*. 1985 Sep-Oct;5(5), p. 789-797.
- Bailey DG, Malcolm J, Arnold O et al. Grapefruit juice-drug interactions. *Br J Clin Pharmacol*. 1998 Aug;46(2), p. 101-110.
- Bartoš L. a kolektiv autorů. Ochrana, chov a využití pokusných zvířat. 1. díl. Společnost pro vědu o laboratorních zvířatech, Brno 2005, str. 89.
- Basaga H, Poli G, Tekkaya C et al. Free radical scavenging and antioxidative properties of 'silibin' complexes on microsomal lipid peroxidation. *Cell Biochem Funct*. 1997 Mar; 15(1), p. 27-33.
- Baskin SI and Salem H. Oxidants, antioxidants, and free radicals. Taylor and Francis, Washington 1997. 364 s.
- Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci*. 2001 Feb;26(2), p. 112-117.
- Bishayee A, Darvesh AS, Politis T, McGory R. Resveratrol and liver disease: from bench to bedside and community. *Liver Int*. 2010 Sep;30(8), p. 1103-1114.
- Bokkenheuser VD, Shackleton CH, Winter J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochem J*. 1987 Dec 15;248(3), p. 953-956.
- Boobis AR, Tee LB, Hampden CE, Davies DS. Freshly isolated hepatocytes as a model for studying the toxicity of paracetamol. *Food Chem Toxicol*. 1986 Jun-Jul; 24(6-7), p.731-736.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*. 1998 Nov;56(11), p. 317-333.
- Brevíř 23.vydání. Medical Tribune CZ 2014.Praha

- Brodanová M. Toxické poškození jater I. díl. *Interní Med.* 2002; 12, p. 590-594.
- Brodanová M. Toxické poškození jater II. díl. *Interní Med.* 2003;1, p. 19-23.
- Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J Agric Food Chem.* 2001 Jun;49(6), p. 2774-2779.
- Cavia-Saiz M, Busto MD, Pilar-Izquierdo MC et al. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *J Sci Food Agric.* 2010 May;90(7), p. 1238-1244.
- Cole LK, Jacobs RL, Vance DE. Tamoxifen induces triacylglycerol accumulation in the mouse liver by activation of fatty acid synthesis. *Hepatology.* 2010 Oct;52(4), p. 1258-1265.
- Conti M, Malandrino S, Magistretti MJ. Protective activity of silipide on liver damage in rodents. *Jpn J Pharmacol.* 1992 Dec;60(4), p. 315-321.
- Černá P, Kotyzova D, Eybl V. Comparative study of natural antioxidants- resveratrol, naringin and quercetin- in CCl₄-induced liver injury in rats. *Inter Toxicology* 2008; 1(1), p.62.
- Černá P, Kotyzova D, Eybl V. Protective effect of resveratrol in acute liver damage in rats. *Toxicology Letters* 2008, vol. 180, p. 45–46.
- Černá P, Kotyzová D, Eybl V. The effect of the oral iron chelator deferiprone on the liver damage induced by tamoxifen in female rats. *Hemoglobin.* 2011;35(3):255-261.
- Červený P. Polékové poškození jater. *Prakt. lékařn.* 2013; 9(3), p. 123-126
- Český lékopis 1997. Léčivé a pomocné látky, M-Z. Léčivé přípravky. 3. díl, Praha: Grada Publishing, s.r.o., 1997, 1327 s.
- Dahan A, Altman H. Food-drug interaction: grapefruit juice augments drug bioavailability--mechanism, extent and relevance. *Eur J Clin Nutr.* 2004 Jan;58(1), p. 1-9.
- de Castro WV, Mertens-Talcott S, Derendorf H et al. Grapefruit juice-drug interactions: Grapefruit juice and its components inhibit P-glycoprotein (ABCB1) mediated transport of talinolol in Caco-2 cells. *J Pharm Sci.* 2007 Oct;96(10), p. 2808-2817.
- de la Lastra CA and Villegas I and Martin AR. In Aggarwal BB and Shishodia S et al. Resveratrol in health and disease. Boca Raton, CRC Press, 2006. p. 33-56.
- de la Lastra CA and Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans.* 2007 Nov; 35(Pt 5), p. 1156-1160.
- Dehmlow C, Erhard J, de Groot H. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology.* 1996 Apr;23(4), p. 749-754.
- DeLeve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther.* 1991 Dec;52(3), p. 287-305.
- Díez-Fernández C, Sanz N, Cascales M. Intracellular calcium concentration impairment in hepatocytes from thioacetamide-treated rats. Implications for the activity of Ca(2+)-dependent enzymes. *J Hepatol.* 1996 Apr;24(4), p. 460-467.
- Edwards DJ, Bernier SM. Naringin and naringenin are not the primary CYP3A inhibitors in grapefruit juice. *Life Sci.* 1996;59(13), p. 1025-1030.
- Ehrmann J, Strojil J. Lékové postižení jater – současný stav problematiky se zaměřením na morfologický obraz. *Čes.-slov. Patol.*, 44, 2008, No. 1, p. 4-7.

- El-Beshbishy HA. The effect of dimethyl dimethoxy biphenyl dicarboxylate (DDB) against tamoxifen-induced liver injury in rats: DDB use is curative or protective. *J Biochem Mol Biol.* 2005 May 31;38(3), p. 300-306.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H et al. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 1992 Oct; 13(4), p. 341-390.
- Eybl V, Kotyzová D, Kolek et al. The influence of deferiprone (L1) and deferoxamine on iron and essential element tissue level and parameters of oxidative status in dietary iron-loaded mice. *Toxicol Lett.* 2002 Mar 10;128(1-3), p. 169-175.
- Eybl V., Kotyzová D., Koutenský J.: Comparative study of natural antioxidants – curcumin, resveratrol and melatonin – in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology* 2006; 225 (2-3), p. 150-156.
- Farghali H, Cerný D, Kameníková L et al. Resveratrol attenuates lipopolysaccharide-induced hepatitis in D-galactosamine sensitized rats: role of nitric oxide synthase 2 and heme oxygenase-1. *Nitric Oxide.* 2009 Nov-Dec;21(3-4), p. 216-225.
- Favari L, Pérez-Alvarez V. Comparative effects of colchicine and silymarin on CCl4-chronic liver damage in rats. *Arch Med Res.* 1997 Spring;28(1), p. 11-17.
- Fernandez SP, Nguyen M, Yow TT et al. The flavonoid glycosides, myricitrin, gossypin and naringin exert anxiolytic action in mice. *Neurochem Res.* 2009 Oct; 34(10), p. 1867-1875.
- Ferner RE, Dear JW, Bateman DN. Management of paracetamol poisoning. *BMJ.* 2011 Apr 19; p. 342-350.
- Fulda S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug Discov Today.* 2010 Sep; 15(17-18), p. 757-765.
- Furtado KS, Prado MG, Aguiar E Silva MA et al Coffee and caffeine protect against liver injury induced by thioacetamide in male Wistar rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012 Nov;111(5), p. 339-347.
- Günzler WA, Kremers H, Flohé L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 1974 Oct;12(10), p. 444-448.
- Hajovsky J, Hu G, Koen Y et al. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-oxide in rat hepatocytes. *Chem. Res. Toxicol.* 2012 Sept 17; 25 (9), p. 1955-1963.
- Hatcher HC, Singh RN, Torti FM et al. Synthetic and natural iron chelators: therapeutic potential and clinical use. *Future Med Chem.* 2009 Dec;1(9), p. 1643-1670.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002 Oct;13(10), p. 572-584.
- Hirsimäki P, Hirsimäki Y, Nieminen L et al. Tamoxifen induces hepatocellular carcinoma in rat liver: a 1-year study with two antiestrogens. *Arch Toxicol.* 1993;67(1), p. 49-54.
- Hladík M, Olosová A, Jourová I et al. Akutní poškození jater paracetamolem. *Pediatric pro praxi* 2005, 4; p. 212-214.
- Hodková A, Cerná P, Kotyzová D, Eybl V. The effect of iron(III) on the activity of selenoenzymes and oxidative damage in the liver of rats. Interaction with natural antioxidants and deferiprone. *Hemoglobin.* 2010 Jun;34(3), p. 278-283.
- Holley AE, Cheeseman KH. Measuring free radical reactions *in vivo*. *Br Med Bull.* 1993 Jul;49(3), p. 494-505.
- Hollman PC, Bijlsman MN, van Gameren Y et al. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res.* 1999 Dec;31(6), p. 569-573.
- Hollmann PC, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother.* 1997; 51(8), p. 305-310.

- Hollmann PC, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol*. 1999 Sep-Oct;37(9-10), p. 937-942.
- Holt MP and Ju C. Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J*. 2006 Feb 3;8(1), p. 48-54.
- Huang YC, Yang CH, Chiou YL. Citrus flavanone naringenin enhances melanogenesis through the activation of Wnt/ β -catenin signalling in mouse melanoma cells. *Phytomedicine*. 2011 Nov;18(14), p. 1244-1249.
- Hwang HJ, Kwon MJ, Kim IH, Nam TJ. Chemoprotective effects of a protein from the red algae *Porphyra yezoensis* on acetaminophen-induced liver injury in rats. *Phytother Res*. 2008 Sep;22(9), p. 1149-1153.
- Chanda S, Mehendale M. Role of nutritional fatty acid and L-carnitine in the final outcome of thioacetamide hepatotoxicity. *FASEB J*. 1994 Oct;8(13), p. 1061-1068.
- Chandrasekaran VR, Hsu DZ, Liu MY. The protective effect of sesamol against mitochondrial oxidative stress and hepatic injury in acetaminophen-overdosed rats. *Shock*. 2009 Jul;32(1), p. 89-93.
- Chen IS, Chen YC, Chou CH et al. Hepatoprotection of silymarin against thioacetamide-induced chronic liver fibrosis. *J Sci Food Agric*. 2012 May;92(7), p. 1441-1447.
- Chen TM, Subeq YM, Lee RP et al. Single dose intravenous thioacetamide administration as a model of acute liver damage in rats. *Int J Exp Pathol*. 2008 Aug;89(4), p. 223-231.
- Cheng IF, Breen K. On the ability of four flavonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals*. 2000 Mar;13(1), p. 77-83.
- Chilakapati J, Korrapati MC, Shankar K et al. Role of CYP2E1 and saturation kinetics in the bioactivation of thioacetamide: Effects of diet restriction and phenobarbital. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Feb 15;219(1), p. 72-84.
- Chilapakati J, Shankar K, Korrapati CM et al. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. *Drug Met and Disp*. 2005; 33(12), p. 1877-1885.
- IARC. Tamoxifen. In: *Some Pharmaceutical Drugs*. Lyon: IARC, 1996, p. 253
- Ishida K, Hanada T, Sakai T et al. Effects of fructose-induced hypertriglyceridemia on hepatorenal toxicity of acetaminophen in rats. *Exp Toxicol Pathol*. 1995 Dec;47(6), p. 509-516.
- Jagetia GC, Reddy TK, Venkatesha VA et al. Influence of naringin on ferric iron induced oxidative damage in vitro. *Clin Chim Acta*. 2004 Sep;347(1-2), p. 189-197.
- Jatobá CA, de Rezende AA, de Paiva Rodrigues SJ et al. Liver iron overload induced by tamoxifen in diabetic and non-diabetic female Wistar rats. *Biometals*. 2008 Apr;21(2), p. 171-178.
- Jia JD, Bauer M, Cho JJ et al. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fibrosis is mediated by downregulation of procollagen alpha1(I) and TIMP-1. *J Hepatol*. 2001 Sep;35(3), p. 392-398.
- Jones DP. Intracellular catalase function: analysis of the catalytic activity by product formation in isolated liver cells. *Arch Biochem Biophys*. 1982 Apr 1;214(2), p. 806-814.
- Kanno S, Shouji A, Asou K et al. Effects of naringin on hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and apoptosis in P388 cells. *J Pharmacol Sci*. 2003 Jun;92(2), p. 166-170.
- Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci*. 2007 Feb 20;80(11), p. 1033-1039.
- Kolek M. Oxidační stres navozený železem a jeho ovlivnění flavonoidy a bisfosfonáty. Doktorská dizertační práce. Plzeň 2005.

- Kontoghiorghes GJ, Barr J, Baillo RA. Studies of aluminium mobilization in renal dialysis patients using the oral chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one. *Arzneimittelforschung*. 1994 Apr;44(4), p. 522-526.
- Kontoghiorghes GJ, Jackson MJ, Lunec J. In vitro screening of iron chelators using models of free radical damage. *Free Radic Res Commun*. 1986;2(1-2), p. 115-124.
- Kontoghiorghes GJ, Pattichi K, Hadjigavriel M et al. Transfusional iron overload and chelation therapy with deferoxamine and deferiprone (L1). *Transfus Sci*. 2000 Dec;23(3), p. 211-223.
- Kontoghiorghes GJ. Comparative efficacy and toxicity of desferrioxamine, deferiprone and other iron and aluminium chelating drugs. *Toxicol Lett*. 1995 Oct;80(1-3), p. 1-18.
- Kontoghiorghes GJ. Decrease solubilisation of ferritin iron and fresh iron (III) precipitate following repeated chelator treatments. *Inorg Chim Acta*. 1987;138, p. 36-40.
- Kotyzová D, Cerná P, Lesetický L, Eybl V. Trace elements status in selenium-deficient rats--interaction with cadmium. *Biol Trace Elem Res*. 2010 Sep;136(3), p. 287-293.
- Kotyzová D., Eybl V.: The effect of resveratrol on cadmium induced oxidative damage and essential elements changes in mice. *Toxicology Letters* 2005; Volume 158, Issue 1, (Supplement 1), p. 182.
- Lee JW, Shin KD, Lee M et al. Role of metabolism by flavin-containing monooxygenase in thioacetamide-induced immunosuppression. *Toxicol Lett*. 2003 Jan 13;136(3), p. 163-172.
- Lee WM. Acute liver failure in the United States. *Semin Liver Dis*. 2003 Aug;23(3), p. 217-226.
- Lelliott CJ, Lopez M, Curtis RK et al. Transcript and metabolite analysis of the effects of tamoxifen in rat liver reveals inhibition of fatty acid synthesis in the presence of hepatic steatosis. *FASEB J* 2005;19, p. 1108-1119.
- Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F et al. The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *FASEB J*. 1997 Sep;11(11), p. 851-857.
- Losa GA. Resveratrol modulates apoptosis and oxidation in human blood mononuclear cells. *Eur J Clin Invest*. 2003 Sep; 33(9), p. 818-823.
- Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ et al. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest*. 1997 May 15;99(10), p. 2545-2553.
- Ma ZH and Ma QY. Resveratrol: A medical drug for acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11 (21), p. 3171-3174.
- Maher JJ, Zia S, Tzagarakis C. Acetaldehyde-induced stimulation of collagen synthesis and gene expression is dependent on conditions of cell culture: studies with rat lipocytes and fibroblasts. *Alcohol Clin Exp Res*. 1994 Apr;18(2), p.403-409.
- Martín AR, Villegas I, La Casa C, de la Lastra CA. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. *Biochem Pharmacol*. 2004; 67(7), p. 1399-1410.
- Martin EA, Carthew P, White IN et al. Investigation of the formation and accumulation of liver DNA adducts in mice chronically exposed to tamoxifen. *Carcinogenesis*. 1997 Nov;18(11), p. 2209-2215.
- Maruyama S, Hirayama C, Abe J et al. Chronic active hepatitis and liver cirrhosis in association with combined tamoxifen/tegafur adjuvant therapy. *Dig Dis Sci*. 1995 Dec;40(12), p. 2602-2607.
- Merck Index, 12th Edition, 1996, Merck Research Laboratories, Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ, p. 9450.

- Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978 May;86(1), p. 271-278.
- Morazzoni P, Montalbetti A, Malandrino S et al. Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarin in rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1993 Jul-Sep;18(3), p. 289-297.
- Morel I, Lescoat G, Cogrel P et al. 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), p. 13-19.
- Motekaitis RJ and Martell AE. Stabilities of the iron(III) chelates of 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridinone and related ligands. *Inorg. Chim. Acta* 1991; 183(1), p 71-80.
- Mouly P. P., Arzouyan C. R., Gaydou E. M. et al. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavonone glycosides. *J. Agric. Food Chem.*, 1994;42, p. 70-79.
- Mroueh M, Saab Y, Rizkallah R. Hepatoprotective activity of Centaurium erythraea on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother Res.* 2004 May;18(5), p. 431-433.
- Muriel P, Garcapiña T, Perez-Alvarez V, Mourelle M. Silymarin protects against paracetamol-induced lipid peroxidation and liver damage. *J Appl Toxicol.* 1992 Dec;12(6), p. 439-442.
- Najafzadeh H, Jalali MR, Morovvati H, Taravati F. Comparison of the prophylactic effect of silymarin and deferoxamine on iron overload-induced hepatotoxicity in rat. *J Med Toxicol.* 2010 Mar;6(1), p. 22-26.
- O'Brien PJ, Slaughter MR, Polley SR et al Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Lab Anim.* 2002 Jul;36(3), p. 313-321.
- Olivieri NF, Koren G, Matsui D et al. Reduction of tissue iron stores and normalization of serum ferritin during treatment with the oral iron chelator L1 in thalassemia intermedia. *Blood.* 1992 May 15;79(10), p. 2741-2748.
- Orallo F. Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. *Curr. Med. Chem.* 2006; 13 (1), p. 87-98.
- Ortuño A, Garcia-Puig D, Fuster MD et al. Flavanone and nootkatone levels in different varieties of grapefruit and pummelo. *J Agric Food Chem* 1995;43, p.1-5.
- Osborne CK, Zhao H, Fuqua SA. Selective estrogen receptor modulators: structure, function, and clinical use. *J Clin Oncol.* 2000 Sep;18(17), p. 3172-3186.
- Ozer J, Ratner M, Shaw M et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology.* 2008 Mar 20;245(3), p. 194-205.
- Pari L, Amudha K. Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats. *Eur J Pharmacol.* 2011 Jan 10;650(1), p. 364-370.
- Pervaiz S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *FASEB J.* 2003 Nov; 17(14), p. 1975-1985.
- Pinto HC, Baptista A, Camilo ME et al. Tamoxifen-associated steatohepatitis--report of three cases. *J Hepatol.* 1995 Jul;23(1), p. 95-97.
- Plumb GW, Price KR, Williamson G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. *Redox Rep.* 1999;4(1-2), p. 13-16.
- Porter WR, Gudzinowicz MJ, Neal RA. Thioacetamide-induced hepatic necrosis. II. Pharmacokinetics of thioacetamide and thioacetamide-S-oxide in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1979 Mar;208(3), p. 386-391.
- Pradhan SC and Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res.* 2006 Nov; 124(5), p. 491-504.
- Příbramská V a Husová L. Jaterní cirhóza. *Interní Med.* 2007; 9 (11), p. 486-489

- Rajaniemi H, Mäntylä E, Hemminki K. DNA adduct formation by tamoxifen and structurally-related compounds in rat liver. *Chem Biol Interact.* 1998 May 15;113(2), p.145-159.
- Ratty AK, Das NP. Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol.* 1988 Feb;39(1), p. 69-79.
- Richardson JA. Management of acetaminophen and ibuprofen toxicoses in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care* 2000; 10, p. 285–291.
- Rivera H, Shibayama M, Tsutsumi V et al. Resveratrol and trimethylated resveratrol protect from acute liver damage induced by CCl₄ in the rat. *J Appl Toxicol.* 2008 Mar;28(2), p. 147-155.
- Roy S, Sannigrahi S, Majumdar S et al. Resveratrol regulates antioxidant status, inhibits cytokine expression and restricts apoptosis in carbon tetrachloride induced rat hepatic injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2011;2011, p. 1-12.
- Saller R, Brignoli R, Melzer J et al. An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Forsch Komplementmed.* 2008 Feb;15(1), p. 9-20.
- Saller R, Meier R and Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs.* 2001; 61(14), p. 2035-2063.
- Saller R, Melzer J, Reichling J et al. An updated systematic review of the pharmacology of silymarin. *Forsch Komplementmed.* 2007 Apr;14(2), p. 70-80.
- Sarma D, Hajovsky H, Koen YM et al. Covalent modification of lipids and proteins in rat hepatocytes, and in vitro, by thioacetamide metabolites. *Chem. Res. Toxicol* 2012 Sept 17; 25(9), p. 1868-1877.
- Sawant SP, Dnyanmote AV, Mehendale HM. Mechanisms of inhibited liver tissue repair in toxicant challenged type 2 diabetic rats. *Toxicology.* 2007 Apr 11;232(3), p. 200-215.
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968 Oct 24;25(1), p. 192-205.
- Sener G, Toklu HZ, Sehirli AO et al. Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepatol Res.* 2006 May;35(1), p. 62-68.
- Shaker ME, Shiha GE, Ibrahim TM. Comparison of early treatment with low doses of nilotinib, imatinib and a clinically relevant dose of silymarin in thioacetamide-induced liver fibrosis. *Eur J Pharmacol.* 2011 Nov 30;670(2-3), p. 593-600.
- Sherlocková S a Dooley J. Nemoci jater a žlučových cest. Hradec Králové, vyd. Olga Čermáková 2004, 703 s
- Schneiderka P. Vybrané kapitoly z klinické biochemie. Praha, Karolinum 1998, 119 s.
- Siemann EH and Creasy LL. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 1992; 43(1), p. 49-52.
- Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984 Aug 15;222(1), p.1-15.
- Slíva J. Hepatotoxicitá léčiv se zaměřením na paracetamol a NSA. *Med. praxi* 2013; 10(1), p. 26-27.
- Soares AA, de Oliveira AL, Sá-Nakanishi AB et. al. Effects of an *Agaricus blazei* aqueous extract pretreatment on paracetamol-induced brain and liver injury in rats. *Biomed Res Int.* 2013; p. 1-12.
- Sonnenbichler J, Zetl I. Biochemical effects of the flavonolignane silibinin on RNA, protein and DNA synthesis in rat livers. *Prog Clin Biol Res.* 1986; 213, p. 319-331.
- Spencer JP. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *Br J Nutr.* 2010 Oct;104 Suppl 3, p. 40-47.
- Staňková P, Kučera O, Lotková H et al. The toxic effect of thioacetamide on rat liver in vitro.

Toxicol In Vitro. 2010 Dec;24(8), 2097-2103

Süzme R, Gürdöl F, Deniz G, Ozden T. Response in DNA ploidy of hepatocytes to tamoxifen and/or melatonin in vivo. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2001;109(5-6), p. 275-286.

Šmidrkal J, Filip V, Melozoch K et al. Resveratrol. *Chem. Listy* 2001; 95, 602-609.

Štípek S. a kol. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. 1. vydání. Grada Publishing, Praha 2000. 320s

Tani Y, Kamai Y, Yamate K et al. Restitutive response of Mini rat liver to injury induced by a single oral administration of thioacetamide. *J Toxicol Sci*. 2001 Feb;26(1), p. 25-37.

Töndury P, Zimmermann A, Nielsen P et al. Liver iron and fibrosis during long-term treatment with deferiprone in Swiss thalassaemic patients. *Br J Haematol*. 1998 Jun;101(3), p. 413-415.

Tunali-Akbay T, Sehirlı O, Ercan F et al. Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. *J Pharm Pharm Sci*. 2010;13(2), p. 303-310.

Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R et al. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*. 1995;252, p. 38-53

Uskoković-Marković S, Milenković M, Topić A et al. Protective effects of tungstophosphoric acid and sodium tungstate on chemically induced liver necrosis in wistar rats. *J Pharm Pharm Sci*. 2007;10(3), p. 340-349.

Valenzuela A, Garrido A. Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biol Res*. 1994;27(2), p. 105-112.

Vennat B, Bos MA, Pourrat A et al. Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biol Pharm Bull*. 1994 Dec;17(12), p. 1613-1615.

Vitaglione P, Ottanelli B, Milani S et al. Dietary trans-resveratrol bioavailability and effect on CCl4-induced liver lipid peroxidation. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Apr;24(4), p. 618-622.

Walgren RA, Karnaky KJ Jr, Lindenmayer GE et al. Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Sep;294(3), p. 830-836.

White IN. The tamoxifen dilemma. *Carcinogenesis*. 1999 Jul;20(7), p. 1153-1160.

Williams GM, Iatropoulos MJ, Djordjevic MV et al. The triphenylethylene drug tamoxifen is a strong liver carcinogen in the rat. *Carcinogenesis*. 1993 Feb;14(2), p. 315-317.

Wogan GN. Review of the toxicology of tamoxifen. *Semin Oncol*. 1997 Feb;24(1 Suppl 1), p. 87-97.

Wu JW, Lin LC and Tsai TH. Drug-drug interactions of silymarin on the perspective of pharmacokinetics. *J Ethnopharmacol*. 2009 Jan 21; 121(2), p. 185-193.

Yen GC, Duh PD and Lin CW. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Res*. 2003 May; 37(5), p. 509-514.

Zini R, Morin C, Bertelli A et al. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res*. 1999; 25(2-3), p. 87-97.

Přehled publikační činnosti autora

Učebnice a kapitoly v učebnicích

Eybl V., Černá P.: Základy geriatrické farmakologie. Nakladatelství Karolinum – Univerzita Karlova v Praze. Praha 2008; 1. vydání – 77 stran. (Skripta pro VŠ)

Práce in extenso

Černá P., Kotyzová D., Eybl V.: The effect of the oral iron chelator deferiprone on the liver damage induced by tamoxifen in female rats. Hemoglobin 2011; 35(3): 255-261 (IF=1.31)

Hodková A., Černá P., Kotyzová D., Eybl V. The effect of iron (FeIII) on the activity of selenoenzymes and oxidative damage in the liver of rats - interaction with natural antioxidants and deferiprone. Hemoglobin 2010, 34(3):1–6 (IF=1.31)

Černá P., Kotyzová D., Eybl V.: Comparative study of natural antioxidants- silymarin and resveratrol- in thioacetamide-induced liver injury in rats. Prague Medical Report 2008; 109 (Supplement):18-20.

Černá P., Kotyzová D., Eybl V.: Comparative study of the effects of natural antioxidants on acute paracetamol hepatotoxicity. Biomedical Papers 2007; 151 (Supplement 1): 17-19.

Eybl V., Kotyzová D., Černá P., Koutenský J.: Effect of melatonin, curcumin, quercetin, and resveratrol on acute ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced renal oxidative damage in rats. Human & Experimental Toxicology 2008; 27:347-353 (IF=1,46)

Kotyzová D., Černá P., Eybl V.: Effect of carvedilol on trace elements levels and antioxidant status of the liver – interaction with cadmium. Prague Medical Report 2008; 109 (Supplement):65-67.

Kotyzová D., Černá P., Lešetický J., Eybl V.: Trace Elements Status in Selenium-Deficient Rats— Interaction with Cadmium. Biological Trace Element Research 2010; 136 (3): 287-293. (IF = 1.607)

Krátká sdělení

Černá P., Kotyzová D., Eybl V.: Interaction of natural antioxidants with indium in vivo. Chemické listy 2007; 101, s174-s175 (IF=0.72)

Kotyzová D., Černá P., Koutenský J., Hes O., Jelínek F., Eybl V.: Effect of curcumin and quercetin on oxidative tissue damage induced by ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA). Chemické listy 2007; 101, s199-s200 (IF=0.72)

Abstrakty ve sbornících

Černá P., Kotyzová D., Eybl V.: Tamoxifen hepatotoxicity - interaction with resveratrol and deferiprone in rats. Toxicology Letters 2009; 189S: S164 - S165

Černá P., Kotyzová D., Eybl V.: Effect of deferiprone on tamoxifen-induced liver injury in rats. Interdisciplinary Toxicology 2009; 2 (2): 96.

Černá P., Hodková A., Kotyzová D., Eybl V.: Comparative study of the effects of natural antioxidants - naringin and silymarin - in thioacetamide-induced liver injury in rats. Farmakológia 2009 Zborník prác 59. Farmakologické dni. 2.-4. September 2009. Str. 63.

Černá P., Kotyzová D., Eybl V.: The effect of the oral iron chelator deferiprone on the liver damage induced by tamoxifen in female rats. 19th International Conference on Chelation (ICOC), London, United Kingdom, November 13-16, 2009. Str. 45.

Černá P.: Protektivní účinek resveratrolu v akutním jaterním poškození thioacetamidem u potkana. 48.vědecká konference Lékařské fakulty UK v Plzni, 14. května 2008 Šafránkův pavilon - Program a abstrakta.

Černá P., Kotyzová D., Eybl V.: Comparative study of natural antioxidants - resveratrol, naringin and quercetin - in CCl₄-induced liver injury in rats. *Interdisciplinary Toxicology* 2008; 1(1):62

Černá P., Kotyzová D., Eybl V. Protective effect of resveratrol in acute liver damage in rats. *Toxicology Letters*, 2008; 180S: S45-46

Černá P., Kotyzová D., Eybl V.: Interakce přírodních antioxidantů s indiem in vivo. 12. Mezioborová česko – slovenská toxikologická konference. Praha, Lékařský dům 11. - 13. červen 2007. Sborník abstrakt.

Černá P.: Interakce kurkuminu s indiem in vivo. 47.Studentská vědecká konference Lékařské fakulty UK v Plzni, 23. května 2007 – Šafránkův pavilon, Plzeň. Program a abstrakta.

Černá P., Kotyzová D., Eybl V.: Interaction of natural antioxidants curcumin and alpha-lipoic acid with indium in mice. *Toxicology Letters* 2007;172S (S1): S208-S209

Kotyzová D., Černá P., Hodková A., Eybl V.: Effect of zinc pretreatment on acute hepatic oxidative damage induced by ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) in rats. *Toxicology Letters* 2009; 189S: S223.

Hodková A., Černá P., Kotyzová D., Eybl V.:Melatonin increases the activity of selenoenzymes thioredoxin reductase and glutathione peroxidase in acute experiments in rats and mice. *Free Radical Research* 2009; 43 (1): S75.

Kotyzová D., Černá P., Koutenský J., Hes O., Jelínek F., Eybl V. Effects of quercetin and curcumin on ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) induced renal and hepatic damage in rats. *Toxicology Letters*, 2008; 180S: S51

Kotyzová D., Černá P., Koutenský J., Hes O., Jelínek F., Eybl V.:Vliv přírodních antioxidantů na oxidativní poškození tkání navozené Fe(III) nitrilotriacetátem (Fe-NTA). 12. Mezioborová česko – slovenská toxikologická konference. Praha, Lékařský dům 11. - 13. červen 2007. Sborník abstrakt.

Eybl V., Kotyzová D., Koutenský J., Černá P.: Antioxidant effect of hydroxytyrosol and olive oil in acute cadmium intoxication. 11th. Interdisciplinary Slovak-Czech Toxicology Conference Slovak and Czech Toxicology in the European Union. Programme & Abstracts Trenčianské Teplice June 5 – 7, 2006; str. 26.

Tato disertační práce vznikla za podpory grantu GAČR 305/05/0344, Výzkumného záměru MSM 0021620819 a Specifického výzkumu LF UK v Plzni.

Poděkování:

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Vladislavu Eyblovi, DrSc. za velkou podporu během mého postgraduálního studia. Velmi si cením jeho trpělivosti a důvěry v moji práci, které mi dodaly energii disertační práci dokončit.

Také děkuji vedoucím Ústavu farmakologie a toxikologie LF UK v Plzni doc. MUDr. Jaroslavu Koutenskému, CSc. a doc. RNDr. Evě Kmoníčkové, CSs. za podporu a vytvoření vhodných podmínek pro vědeckou činnost a pro sepsání disertační práce.

Poděkování patří Ing. Daně Kotyzové za ochotu, pomoc, cenné rady a připomínky. Práce s ní mi byla vždy přínosem.

Děkuji také ostatním pracovníkům Ústavu farmakologie a toxikologie za přátelskou atmosféru a pomoc, zejména paní Ireně Zemenové.