

# PŮVODNÍ PRÁCE

ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE  
Ročník LV – Číslo 4 – ČERVENEC 2006

## PROTEKTIVNÍ EFEKT FLAVONOIDŮ OSAJINU A POMIFERINU NA ISCHÉMII – REPERFUZI SRDCE

NEČAS J.<sup>1</sup>, BARTOŠÍKOVÁ L.<sup>1</sup>, FLORIAN T.<sup>1</sup>, KLUSÁKOVÁ J.<sup>3</sup>, SUCHÝ V.<sup>2</sup>, NAGGAR E. M. B.<sup>1</sup>,  
JANOŠTÍKOVÁ E.<sup>1</sup>, BARTOŠÍK T.<sup>4</sup>, LIŠKOVÁ M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav humánní farmakologie a toxikologie

<sup>2</sup>Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav přírodních léčiv

<sup>3</sup>Masarykova univerzita Brno, Lékařská fakulta, I. patologicko-anatomický ústav

<sup>4</sup>Úrazová nemocnice, Brno

### SOUHRN

#### Protektivní efekt flavonoidů osajinu a pomiferinu na ischemii – reperfuzi srdce

Studie se zabývá kardioprotektivním potenciálem flavonoidů osajinu a pomiferinu na modelu izolovaného perfundovaného myokardu v podmínkách ischemicko-reperfuzního poškození. Studie byla provedena na 40 izolovaných srdcích laboratorního potkana, které byly perfundovány modifikovanou metodou dle Langendorffa. Po stabilizační, 10 minutové fázi (koronární perfuze 14 ml.min<sup>-1</sup>) byla navozena ischemie srdce zástavou perfuze na dobu 30 minut, poté následovala reperfuze na dobu 60 minut (průtok 14 ml.min<sup>-1</sup>). Zvířata byla rozdělena do 4 skupin (n=10). První skupina – léčená (osajin 5 mg/kg v 0,5% Avicelu); druhá skupina léčená (pomiferin 5 mg/kg v 0,5% Avicelu); placebo skupina (0,5% Avicel); intaktní skupina – bez aplikace. Látky byly podávány v jedné denní dávce, perorálně, gastrickou sondou, po dobu 15 dnů. Sledovány byly biochemické indikátory oxidativního poškození: malondialdehyd, superoxid dismutasa, glutathion peroxidasa, celková antioxidantní kapacita v séru, respektive v myokardu. Dále byly sledovány srdeční funkce: end-diastolický tlak v levé komoře, tlak v levé komoře a kontraktilita. Výsledky dokazují, že osajin i pomiferin zmírní dysfunkce myokardu provokované navozenou ischemií – reperfuzí. Tuto skutečnost potvrzuje vzestup hladin antioxidantních enzymů a celkové antioxidantní kapacity v séru. Kardioprotekce podávanými flavonoidy rezultuje ze suprese oxidativního stressu a koreluje se zachováním ventrikulární funkce izolovaného srdce.

**Klíčová slova:** *Maclura pomifera* – flavonoid osajin a pomiferin – ischemie - reperfuze srdce – volné kyslíkové radikály

Čes. slov. Farm., 2006; 55, 168–174

### SUMMARY

#### Protective Effects of the Flavonoids Osajin and Pomiferin on Heart Ischemia – Reperfusion

The study was undertaken to evaluate the cardioprotective potential of the flavonoids osajin and pomiferin against ischemia-reperfusion induced injury in rat hearts as a model of antioxidant-based composite therapy. Studies were performed with isolated, modified Langendorff-perfused rat hearts and ischemia of the heart was initiated by stopping the coronary flow for 30 min followed by 60 min of reperfusion (14 ml.min<sup>-1</sup>). Wistar rats were divided into four groups. The treated groups received osajin or pomiferin (5 mg/kg/day in 0.5% Avicel), the placebo group received only 0.5 Avicel; the intact group was left without any applications. Biochemical indicators of oxidative damage – malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, total antioxidant activity in serum and the myocardium have been evaluated. We also examined the effect of osajin and pomiferin on cardiac function: left ventricular end-diastolic pressure, left ventricular pressure, and peak positive dP/dt. Our results demonstrate that the flavonoids osajin and pomiferin attenuate the myocardial dysfunction provoked by ischemia-reperfusion. This was confirmed by an increase in both the antioxidant enzyme values and the total antioxidant activity. The cardioprotection provided by osajin and pomiferin treatment results from the suppression of oxidative stress and correlates with the improved ventricular function.

**Key words:** *Maclura pomifera* – flavonoids osajin and pomiferin – heart ischemia-reperfusion – free oxygen radicals

Čes. slov. Farm., 2006; 55, 168–174

Má

## Úvod

Řada vyšších rostlin obsahuje látky, které mají příznivý vliv na lidský organizmus a jsou často užívány v lidové medicíně. Do této skupiny látek patří flavonoidy. Běžně se vyskytují v lidské potravě, zvláště v ovoci a zelenině a jejich denní příjem ve vyvážené stravě je cca 1–2 g. Je popsána řada efektů flavonoidů na živočišné buňky<sup>1–4)</sup>. V onkologii jsou flavonoidy používány jako podpůrné látky, redukující nežádoucí vedlejší efekt terapie cytostatiky, na druhé straně podporují terapeutický efekt cytostatik<sup>5–8)</sup>.

Flavonoidy jsou často používány v terapii zánětlivých onemocnění, protože jsou schopny ovlivňovat klíčový enzym v syntéze prostaglandinů – cyklooxygenasa (COX)<sup>9–11)</sup>. Testovány byly i v post-transplantačních stavech<sup>12, 13)</sup>.

Nejčastěji popisovanou vlastností flavonoidů je jejich antioxidační aktivita, uplatňující se v případech oxidativního poškození<sup>14, 15)</sup>. Jsou schopny bránit lipoperoxidaci buněčných membrán, vylučují a zhasí volné kyslíkové radikály a inaktivují pro-oxidativní ionty (železo,

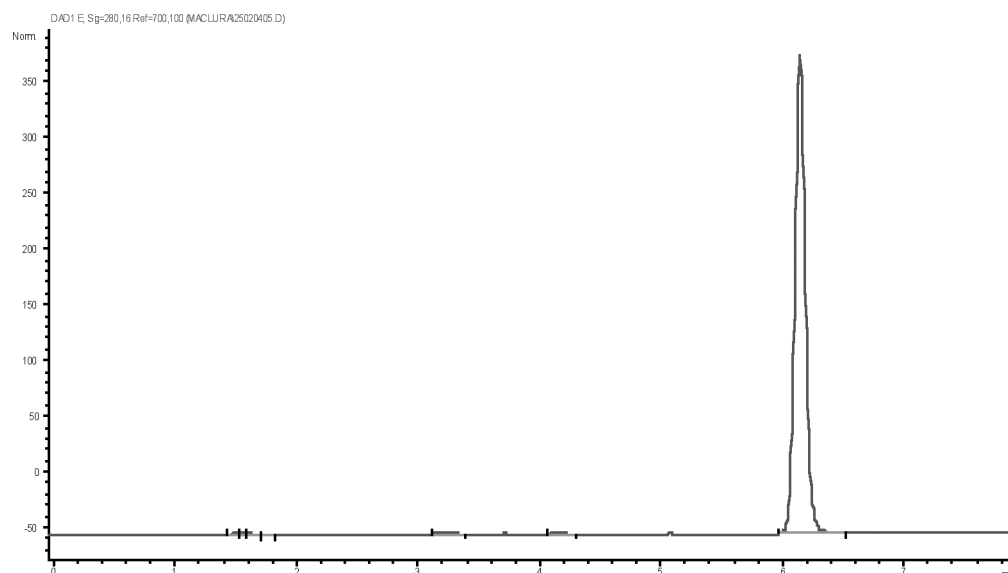
na skutečnost, že fyziologické funkce srdce jsou zásadně dependentní na vysoké spotřebě kyslíku, při které může být jeho neutilizovaná část zdrojem kyslíkových radikálů, je vyloučení  $O_2^{\bullet-}$  patologie ischemicko-reperfúzního poškození jedním z možných terapeutických zásahů.

V prezentované studii jsme zkoumali, zda je možné ovlivnit tvorbu  $O_2^{\bullet-}$  a jeho toxických metabolitů, generovaných během ischemie-reperfuze (I/R) srdce 15denním předléčením perorálně podávaných flavonoidů osajinu v jednorázové dávce 5 mg/kg/den a pomiferinu v jednorázové dávce 5 mg/kg/den.

## POKUSNÁ ČÁST

### Preparace extraktu

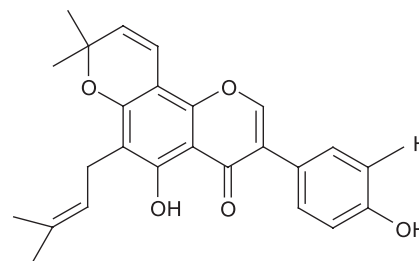
Z rozdrčených plodů *Maclura pomifera* (*Moraceae*) byla za použití Soxhletovy extrakce získána směs krystalů osajinu a pomiferinu (obr. 1, 2, 3, 4). Tato byla filtrována, promývána a rozpuštěna v zahřátém methanolu.



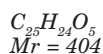
Obr. 1. HPLC osajinu z plodenství *Maclura pomifera* (*Moraceae*) (LC - 8 – metoda *Maclura*)

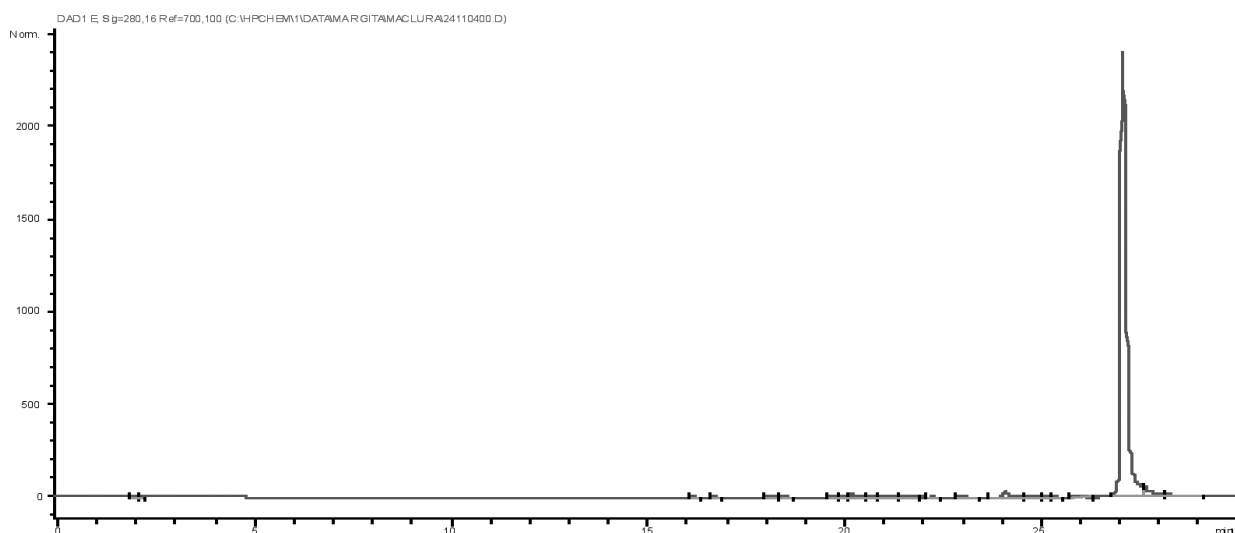
měď). Scavengerová aktivita flavonoidů je jednou z jejich nejvíce probádanou a nejčastěji prezentuje jejich terapeutický význam<sup>16, 17)</sup>. Antioxidační aktivita flavonoidů je závislá na počtu a pozici jejich hydroxylových skupin v jejich molekule a na její glykosylaci. Optimální vlastnosti byly nalezeny u flavonoidů s orto-hydroxy strukturou na kruhu B; dvojnou vazbou v poloze 2,3 a 4-oxo funkční skupinou v kruhu C a 3,5-hydroxy skupinou kruhu A a C<sup>18)</sup>.

Mezi různými reaktivními formami kyslíku (ROS) vygenerovanými během chorobných procesů, které jsou příčinou nebo doprovází ischemicko-reperfúzní poškození, hraje klíčovou roli  $O_2^{\bullet-}$ . Přestože tento radikál sám není příliš reaktivní, má vliv na tvorbu následných toxických radikálů, nebo jejich tvorbu zahajuje. S ohledem

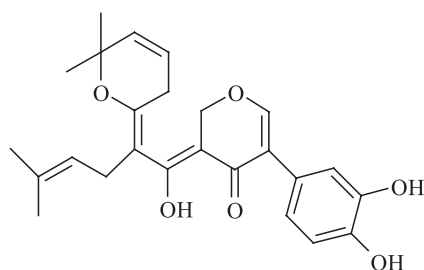


Obr. 2. Chemická struktura osajinu





Obr. 3. HPLC pomiferinu z plodenství *Maclura pomifera* (Moraceae) (Supelcosil ABZ+Plus – metoda Muscar)



Obr. 4. Chemická struktura pomiferinu

$C_{27}H_{24}O_5$   
 $M_r = 420,46$

Pomiferin byl separován ze směsi přidáním octanu olovnatého, který reaguje s dvěma OH skupinami v pozici 3 a 4 kruhu B pomiferinu za tvorby nažloutlého nerozpustného koagulátu, zatímco osajin zůstává v roztoku (má jen jednu hydroxylovou skupinu na kruhu B). Osajin byl poté rekrystalizován z methanolu.

#### Procedura separace

10 gramů krystalické směsi osajinu a pomiferinu bylo rozpuštěno ve 200 ml methanolu a smícháno s 15 gramy trihydrátu octanu olovnatého. Světle žlutý koagulát byl filtrován a rozpuštěn v acetonu. Osajin a pomiferin byl získán metodou rekrystalizace z roztoku.

Pro zjištění čistoty a identifikaci osajinu a pomiferinu byla použita metoda stanovení dle HPLC.

#### HPLC stanovení

Pro stanovení byl použit HPLC (HP 1100) systém s detektorem DAD, analytická kolona Supelcosil ABZ+ Plus a LC-8, 15 cm x 4,6 mm, 3  $\mu$ m.

Mobilní fáze: (A) acetonitril a (B) 40 mM kyselina mravenčí.  
 Separace s gradientem profilu: 1 min, 70:30; 15 min, 100:0.

Chromatografie při 40 °C na pohyblivé fázi při průtoku 1,0 ml/min a detekci při vlnové délce 280 nm a 350 nm.

#### Zvířata a terapie

Studie byla provedena na 40 laboratorních potkanech pohlaví samčího Wistar SPF (AnLab, SRN), stejného věku (7 měsíců) a srovnatelné tělesné hmotnosti (354 $\pm$ 27 g).

Vlastní studie a její průběh byl schválen a monitorován Etickou komisí Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Zdravotní stav všech zvířat byl pravidelně kontrolován několikrát denně jak po dobu aklimatizace zvířat, tak i v průběhu celého prováděného experimentu pracovní skupinou, jejíž členové jsou držitelé osvědčení Ústřední komise pro ochranu zvířat o způsobilosti dle § 17, zákona České národní rady č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání.

Zvířata byla umístěna v laboratoři se standardním teplotním režimem, potrava a voda byly podávány dle potřeby. Po adaptační fázi byla zvířata rozdělena náhodným výběrem do čtyř stejných skupin (n=10).

První skupina – léčená přijímala žaludeční sondou osajin v denní dávce 5 mg.kg<sup>-1</sup> v 1 ml 0,5% Avicelu; druhá skupina – léčená přijímala stejnou metodou pomiferin v denní dávce 5 mg.kg<sup>-1</sup> v 1 ml 0,5% Avicel<sup>19)</sup>; třetí skupina – placebo přijímala jen 1 ml 0,5% Avicelu stejnou aplikační formou jako skupiny léčené; čtvrtá skupina – intaktní byla bez jakékoli terapeutické intervence.

#### Experimentální postup

Po 15denní periodě byla zvířata anestetizována intraperitoneálním podáním anestetické směsi 2% Rometaru (xylazín) 0,5 ml + 1% Narkamonu (ketamin) 10 ml, v přepočtené dávce 0,5 ml roztoku/100 g tělesné hmotnosti a po intraperitoneálním podání heparinu (500 IU) bylo odebráno srdce pro následnou perfuzi. U všech experimentů byla použita metoda modifikovaného modelu perfuze dle Langendorffa, a univerzální aparatura Hugo Sachs Electronic UP 100 (Germany HSE). Pracovní režim byl nastaven: stabilizace – ischémie – reperfuze s jednotlivými intervaly: 10–30–60 minut. V krvi byly sledovány biochemické parametry: malondialdehyd (MDA) sérové hodnoty – TBARS metoda, celková antioxidační kapacita (TAA), glutathionperoxidasa (GSHPx), superoxididismutasa (SOD), použita byla RANDOX testovací souprava (Dublin, Ireland).

Sledované biomechanické parametry izolovaného srdce: systolický tlak v levé komoře (LVP), end-diastolický tlak v levé komoře (LVEDP) a kontraktilita ( $+dP/dt_{max}$ ) byly měřeny balónkem zavedeným přes levé atrium do levé komory (8–12 mmHg), pomocí analogového převaděče (Isotec HSE, DIF modul HSE) <sup>20</sup>. Po skončení perfuze bylo srdce zchlazeno v tekutém dusíku a uloženo při teplotě -78 °C pro následné analýzy. Pro stanovení lipoperoxidační aktivity bylo srdce homogenizováno, hodnoty MDA byly stanoveny spektroskopickou metodou <sup>21</sup>.

Aktivita antioxidantních enzymů: buněčná GSHPx <sup>22</sup>; aktivita buněčné aktivity SOD <sup>23</sup>.

#### Příprava homogenizátu a měření biochemických parametrů

Tkáňový homogenizát ze srdce byl připraven pomocí homogenizátoru DI 25 Basic, Germany v poměru 1 g mokré tkáně ku 10 dílům vody (w/v) v 0,05 M- fosfátovém pufru (pH 7,4). Pro stanovení lipoperoxidace byla použita metoda popsána dle Buege a Austa (1978).

Celulární aktivita GSHPx byla stanovena dle metody popsané autory Flohé and Gunzler (1984). GSHPx aktivita byla vypočítána použitím koeficientu  $6,22 \text{ mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$  a vyjádřena v nanomolech NADPH spotřebovaných za 1 minutu na jeden miligram buněčného proteinu.

Celková buněčná aktivita SOD byla determinována modifikovanou metodou dle autorů Spitz and Oberley (1989). Celulární aktivita SOD byla vyjádřena v mezinárodních jednotkách/miligram buněčného proteinu.

#### Statistická analýza

Získaná experimentální data byla zpracována tabulkovým procesorem Microsoft® Excel®, statisticky vyhodnocena s použitím programu UNISTAT. Všechny hodnoty jsou uváděny jako průměr  $\pm$  SD. Test ANOVA a následně nepárový Studentův t-test byl použit pro stanovení statistické významnosti biochemických a biomechanických dat v různých skupinách. Hodnoty  $p \leq 0,05$  byly považovány za statisticky signifikantní.

## VÝSLEDKY

#### Biochemické výsledky – krev

Po perorálním podávání osajinu a pomiferinu po dobu 15 dnů, byly zjištěny MDA hladiny signifikantně ( $p \leq 0,01$ ) sníženy u skupiny léčené osajinem i pomiferi-

Tab. 3. Hodnoty myokardiální MDA, a aktivity GSHPx a SOD

| Skupiny zvířat (n=10) | dávka                     | MDA (nmol/mg protein) | GSHPx (nmol/min/mg protein) | SOD (U/mg protein) |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------|
| léčená osajinem       | 5 mg/kg/den + 0,5% Avicel | 2,670,21<br>**++      | 62,02,5                     | 6,70,5<br>*+       |
| léčená pomiferinem    | 5 mg/kg/den + 0,5% Avicel | 3,260,23<br>*+        | 63,12,3                     | 6,40,6<br>*+       |
| placebo skupina       | 0,5% Avicel               | 4,550,15              | 65,55,0                     | 5,60,6             |
| intaktní skupina      | —                         | 4,710,19              | 68,04,0                     | 5,80,7             |

\*\*  $p \leq 0,01$  léčená vs. placebo skupina

\*  $p \leq 0,01$  léčená vs. placebo skupina

++  $p \leq 0,01$  léčená vs. intaktní skupina

+  $p \leq 0,01$  léčená vs. intaktní skupina

nem ve srovnání s placebo skupinou a skupinou intaktní.

Sérové hodnoty TAA byly signifikantně ( $p \leq 0,01$ ) redukovány v placebo a intaktní skupině v porovnání se skupinami léčenými osajinem a pomiferinem. Hodnoty MDA a TAA jsou sumarizovány v tabulce 1.

Hodnoty superoxiddismutasy (SOD) byly signifikantně ( $p \leq 0,01$ ) vyšší ve skupinách zvířat léčených osajinem a pomiferinem ve srovnání se skupinou placebo a skupinou intaktní.

Hodnoty GSHPx byly signifikantně ( $p \leq 0,01$ ) vyšší u skupin léčených osajinem a pomiferinem ve srovnání s placebo skupinou a skupinou intaktní. Hodnoty SOD a GSHPx jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 1. Efekt podávání osajinu a pomiferinu na hladiny MDA a celkovou antioxidantní kapacitu TAA

| Skupiny zvířat         | dávka                     | MDA (mmol/l)             | TAA (mmol/L)             |
|------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| (n=10) léčená osajinem | 5 mg/kg/den + 0,5% Avicel | 0,80 $\pm$ 0,08<br>** ++ | 0,49 $\pm$ 0,03<br>** ++ |
| léčená pomiferinem     | 5 mg/kg/den + 0,5% Avicel | 0,89 $\pm$ 0,11<br>** ++ | 0,52 $\pm$ 0,05<br>** ++ |
| placebo skupina        | 0,5% Avicel               | 1,77 $\pm$ 0,12          | 0,41 $\pm$ 0,04          |
| intaktní skupina       | —                         | 1,89 $\pm$ 0,16          | 0,43 $\pm$ 0,03          |

\*\*  $p \leq 0,01$  léčená vs. placebo skupina

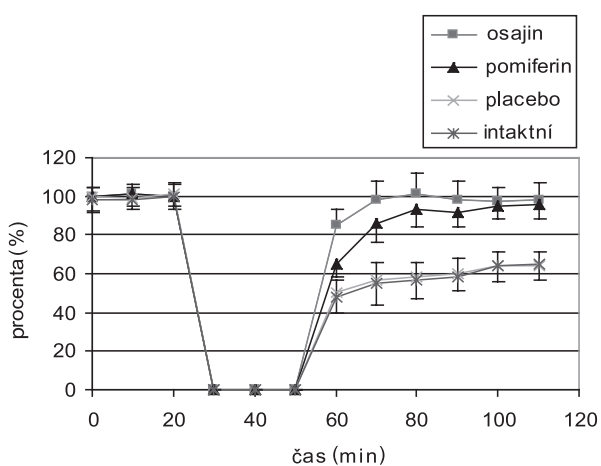
++  $p \leq 0,01$  léčená vs. intaktní skupina

Tab. 2. Efekt osajinu a pomiferinu na hladinu enzymů, participujících na scavengerových reakcích

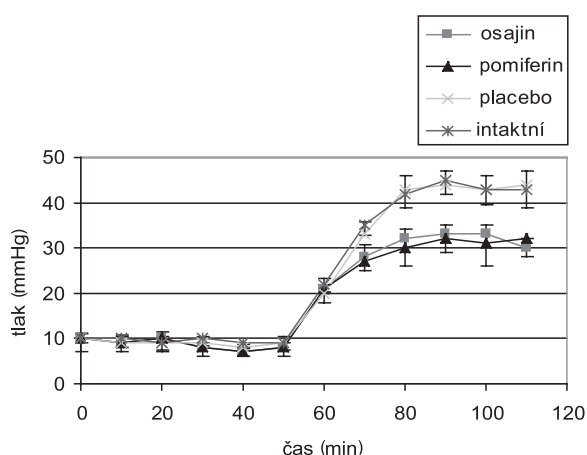
| Skupiny zvířat (n=10) | dávka                     | SOD (U/ml)                  | GSHPx ( $\mu$ kat/l)          |
|-----------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| léčená osajinem       | 5 mg/kg/den + 0,5% Avicel | 232,23 $\pm$ 17,62<br>** ++ | 1569,48 $\pm$ 133,93<br>** ++ |
| léčená pomiferinem    | 5 mg/kg/den + 0,5% Avicel | 227,98 $\pm$ 19,21<br>** ++ | 1619,81 $\pm$ 146,23<br>** ++ |
| placebo skupina       | 0,5% Avicel               | 70,39 $\pm$ 2,79            | 1229,10 $\pm$ 120,45          |
| intaktní skupina      | —                         | 67,37 $\pm$ 3,97            | 1121,37 $\pm$ 152,21          |

\*\*  $p \leq 0,01$  léčená vs. placebo skupina

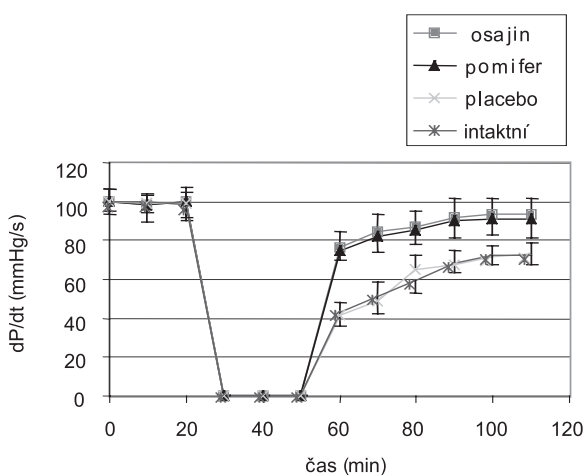
++  $p \leq 0,01$  léčená vs. intaktní skupina



Graf 1. Systolický tlak v levé komoře



Graf 2. End-diastolický tlak v levé komoře



Graf 3. Kontraktilita myokardu

### Biochemické hodnoty – srdce

Zjištěn byl signifikantní pokles myokardiálních hodnot MDA ve skupině léčené osajinem ( $p \leq 0,01$ ) i pomiferinem ( $p \leq 0,05$ ) v dávce 5 mg/kg/den v porovnání s placebo a intaktní skupinou. Nesignifikantní změny byly

zjištěny v myokardiálních hodnotách MDA mezi skupinou placebo a intaktní.

V hodnotách aktivity myokardiální GSHPx nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami léčenými osajinem, pomiferinem, placebo skupinou a skupinou intaktní.

Podávání osajinu i pomiferinu statisticky významně zvyšovalo aktivitu myokardiální SOD ( $p \leq 0,05$ ) ve skupinách léčených v porovnání s placebo a intaktní skupinou. Nesignifikantní změny v aktivitě SOD byly nalezeny mezi skupinami placebo a intaktní (tab. 3).

### Biomechanické výsledky

Graf 1 ukazuje efekt podávání osajinu a pomiferinu na hodnoty systolického tlaku v levé komoře během ischemie a reperfuze. LVP srdce ze skupiny placebo a skupiny intaktní vykazovaly na konci reperfuze 64±7 %, respektive 65±6 % původních hodnot před ischemií. Předléčení osajinem a pomiferinem vedlo k návratu LVP hodnot na 98±8 %, respektive 96±8 % výchozího stavu na konci reperfuze.

Graf 2 ukazuje změny end-diastolického krevního tlaku v levé komoře, vyvolané 15denním podáváním osajinu a pomiferinu. U neléčených zvířat došlo po 60 minutách reperfuze ke vzestupu LVEDP u placebo skupiny z původních 10,0±0,5 mmHg na 44±3 mmHg, respektive na 43±4 mmHg u skupiny intaktní. Podávání osajinu a pomiferinu tomuto vzestupu výrazně zabránilo. LVEDP byl na konci reperfuze u léčených skupin zvýšen jen na 30±2 mmHg, respektive 32±4 mmHg.

Graf 3 ukazuje efekt osajinu a pomiferinu na kontraktilitu myokardu ( $dP/dt_{max}$ ) během ischemie a reperfuze. Předléčení osajinem a pomiferinem vedlo k zotavení kontraktility myokardu ( $+dP/dt_{max}$ ) ve srovnání s výchozí hodnotou na 93±4 %, respektive na 91±10 % po 60minutové reperfuzi. Tyto hodnoty jsou statisticky významně vyšší v porovnání s placebo a intaktní skupinou (73±5 % a 72±4 %).

### DISKUZE

Myokard je ve své fyziologické funkci výrazně dependentní na vysoké spotřebě kyslíku, který je využíván v metabolických dějích, zajišťujících tvorbu a utilizaci energie. I ve fyziologickém stavu část molekul kyslíku uniká fyziologických pochodům a je zdrojem tvorby toxických kyslíkových radikálů<sup>24</sup>. Patologický stav, představovaný akutní ischemií-reperfuze (I/R) myokardu, vede k tvorbě velkého množství kyslíkových radikálů, které limitují základní funkci srdce a zhoršují prognózu tohoto stavu<sup>25</sup>. Kyslíkové radikály mohou být generovány řadou mechanismů, například mitochondriální respirací, aktivovanými neutrofilny nebo xantin-oxidázovou aktivitou. Uvolňování reaktivních forem kyslíku v časné fázi reperfuze, v kombinaci s ischemií a následnou reperfuze podmíněným poklesem antioxidační aktivity, představuje extrémně vulnerabilní stadium pro myokard<sup>16</sup>.



Skutečnost, že ROS hrají významnou roli během I/R srdce je dobře známa a souvisí s aktivitou SOD, GSHPx, nedostatkem nebo poklesem TAA<sup>17)</sup>. Záměr naší studie spočíval v posouzení potenciálního kardioprotektivního efektu dvou příbuzných flavonoidů, osajinu a pomiferinu, separovaných z plodenství rostliny *Maclura pomifera* (Moraceae)<sup>1)</sup>. Efekt osajinu a pomiferinu byl sledován v podmínkách ischemicko-reperfuze poškození srdce laboratorního potkana na modelu 15 denní antioxidační profylaktické terapie. U laboratorních zvířat byly sledovány biochemické parametry v krvi na konci terapie (SOD, GSHPx, MDA, TAA), následně na modelu perfundovaného myokardu byly sledovány biomechanické parametry (LVP, LVEDP,  $+dP/dt_{max}$ ) a aktivita antioxidačních systémů myokardu (SOD, GSHPx, MDA).

Sérové hodnoty SOD byly statisticky významně zvýšeny u zvířat léčených osajinem i pomiferinem ( $p \leq 0,01$ ) v porovnání s placebo a intaktní skupinou. Myokardiální aktivita SOD byla statisticky významně vyšší ( $p \leq 0,05$ ) u osajinem i pomiferinem léčených zvířat v porovnání s placebo a intaktní skupinou. Statisticky nevýznamné změny byly nalezeny v porovnání skupin placebo a intaktní.

Je zřejmé, že vzestup SOD aktivity může být pro organizmus škodlivý. Přestože SOD může produkovat  $H_2O_2$  (prekurzor hydroxylového radikálu), může být tento exces redukován činností hydroperoxidáz.

Hodnoty sérové GSHPx byly statisticky významně vyšší ( $p \leq 0,01$ ) u zvířat léčených osajinem i pomiferinem v porovnání s placebo a intaktní skupinou. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami placebo a intaktní nebyly shledány. V aktivitě myokardiální GSHPx nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi léčenými skupinami a skupinami placebo a intaktní.

GSHPx je schopná aktivity jen v přítomnosti dostatečného množství redukovaného glutationu (GSH). GSH je oxidován na GSSG a GSSG (oxidovaný glutation) může být redukován na GSH prostřednictvím NADPH – dependentním flavoenzymem glutation reduktázou. Tímto mechanismem je udržována aktivita GSHPx. Významný je poměr GSSG/GSH, jako marker antioxidačních pochodů během intracelulárního oxidativního stresu.

Antioxidanty přírodního původu mohou reagovat s kyslíkovými radikály různým mechanismem, mohou působit synergně s probíhajícími antioxidačními reakcemi nebo na principu chelatačních reakcí inhibovat tvorbu ROS. Z tohoto důvodu jsme stanovili celkovou antioxidační kapacitu krve (TAA) jako schopnost eliminace radikálů v krvi. Po 15denní perorální aplikaci osajinu a pomiferinu byly hodnoty TAA v séru statisticky významně vyšší u skupin léčených ( $p \leq 0,01$ ) v porovnání se skupinou placebo a skupinou intaktní.

Po 15denní perorální medikaci osajinu a pomiferinu (5 mg/kg), byly sérové MDA hodnoty statisticky významně sníženy ( $p \leq 0,01$ ) v léčených skupinách v porovnání se skupinou placebo a intaktní.

MDA, jako finální produkt a marker metabolismu ROS, generovaných během patologických reakcí, způsobených I/R, byl statisticky významně ( $p \leq 0,01$ ) redukován v myokardu zvířat léčených osajinem i pomiferinem v porovnání se skupinou placebo i intaktní.

Biochemické nálezy ze séra a myokardu pokusných zvířat podporují funkční změny v perfundovaných srdcích u léčených zvířat v porovnání s placebo a intaktní skupinou.

Perfundovaná srdce ze skupiny zvířat předléčených osajinem a pomiferinem vykazovala návrat systolického tlaku v levé komoře (LVP) na konci reperfuze na hodnoty  $98 \pm 8$  % a  $96 \pm 8$  % v porovnání s hodnotou výchozí, zatím co perfundovaná srdce ze skupiny placebo a intaktní dosahovala na konci reperfuze jen  $64 \pm 7$  %, respektive  $65 \pm 8$  % hodnot výchozích.

U srdcí z placebo a intaktních zvířat nastalo zvýšení LVEDP z původních  $10,0 \pm 0,5$  mmHg na  $44 \pm 3$  mmHg, respektive  $43 \pm 4$  mmHg po 60 minutách reperfuze. Toto zvýšení nebylo pozorováno u zvířat předléčených osajinem a pomiferinem, u těchto skupin byl LVEDP na konci 60 minut reperfuze  $30 \pm 2$  mmHg, respektive  $32 \pm 2$  mmHg.

Předléčení osajinem a pomiferinem zlepšilo zotavení myokardu a vedlo k návratu kontraktility ( $+dP/dt_{max}$ ) po 60 minutové reperfuze na hodnotu  $93 \pm 8$  %, respektive  $91 \pm 10$  % původního stavu. Tyto hodnoty jsou statisticky významně vyšší v porovnání s hodnotami skupiny placebo a intaktní. V těchto skupinách byl zaznamenán návrat na  $73 \pm 5$  %, respektive  $72 \pm 4$  % výchozí hodnoty.

Z výsledků našeho experimentu docházíme k závěru, že profylaktické 15denní perorální podávání osajinu a pomiferinu v denní dávce 5 mg/kg u laboratorních potkanů vykazuje kardioprotektivní potenciál, chrání myokard v podmínkách experimentálně navozené ischemie-reperfuze. Tuto skutečnost potvrzuje vzestup hladin nebo aktivity enzymů, účastnicích se antioxidačních reakcí (vzestup hladin enzymů v séru, vzestup hodnot celkové antioxidační kapacity organismu, vzestup aktivity enzymů v srdečních buňkách) v léčených skupinách zvířat.

Protektivní efekt osajinu a pomiferinu potvrzují i funkční biomechanické parametry perfundovaných srdcí u léčených skupin zvířat (LVP, LVEDP,  $+dP/dt_{max}$ ).

Flavonoidy osajin a pomiferin mohou antagonizovat myokardiální poškození, vyvolané I/R, inhibicí oxidativního stresu. V naší experimentální práci vedlo 15denní perorální předléčení osajinem a pomiferinem v dávce 5 mg/kg/den k významnému poklesu produkce MDA v myokardu u léčených skupin zvířat, což je ukazatelem inhibice tvorby tohoto markeru a schopnosti flavonoidů blokovat oxidativní stres, navozený I/R poškozením. Je možné konstatovat, že profylaktické podávání flavonoidů osajinu a pomiferinu vykazuje kardioprotektivní efekt v perfundovaných srdcích laboratorního potkana, vystavených celkové ischemii s následnou reperfuze. Protektivní efekt je zprostředkovaný antioxidačním efektem flavonoidů, působících prostřednictvím inhibice lipoperoxidace. Ačkoliv byla v práci prokázána účinnost flavonoidů osajinu a pomiferinu v ochraně proti oxidativnímu stresu, vyvolanému I/R, jejich účinek a optimální metoda aplikace ještě není zcela objasněna.

Porovnání vlastních dosažených výsledků se zkušenostmi jiných autorů s testovanými látkami není možné vzhledem k tomu, že se jedná o prvotní údaje, které doposud nebyly popsány.

## LITERATURA

1. Lee, S. J., Wood, A. R., Maier, C. G. A. et al.: *Phytochemistry*, 1998; 49, 2573-2577.
2. Havsteen, B. H.: *Pharmacol. Therapeut.*, 2002; 96, 67-202.
3. Kollár, P., Kotolová, H.: *Čes. slov. Farm.*, 2003; 52, 272-281.
4. Rao, Y. K., Fang, S. H., Tzeng, Y. M.: *J. Ethnopharmacol.*, 2005; 100, 249-253.
5. Kandaswami, C., Perkins, E., Soloniuk, D.S. et al.: *Cancer Lett.*, 1991; 56, 147-152.
6. Nishino, H., Tokuda, H., Satomi, Y. et al.: *Biofactors*, 2004; 22, 57-61.
7. Scambia, G., Ranelletti, F. O., Panici, P. B. et al.: *Gynecol. Oncol.*, 1992; 45, 13-19.
8. Štípek, S. et al.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. 1. vyd. Praha, Grada Publishing, 2000, s. 117-137.
9. O'Leary, K. A., de Pascual-Tereasa, S., Needs, P. W. et al.: *Mutat. Res-Fund. Mol. M.*, 2004; 551, 245-254.
10. Seaver, B., Smith, J. R.: *J. Herb. Pharmacother.*, 2004; 4, 11.
11. Selvam, C., Jachak, S. M., Bhutani, K. K.: *Phytother. Res.*, 2004; 8, 582-584.
12. Bayer, J., Gomer, A., Demir, Y. et al.: *Clin. Immunol.*, 2004; 110, 100-108.
13. Zhong, Z., Connor, H. D., Froh, M. et al.: *Free Radical. Bio. Med.*, 2004; 36, 1248-1258.
14. Manach, C., Donovan, J. L.: *Free Radical. Res.*, 2004; 38, 771-785.
15. Valachovičová, T., Slivová, V., Sliva, D.: *Mini. Rev. Med. Chem.*, 2004; 4, 881-887.
16. Maxwell, S. R. J., Lip, G. Y. H.: *Int. J. Cardiol.*, 1997; 58, 95-117.
17. Urquiaga, I., Leighton, F.: *Biol. Res.*, 2000; 33, 55-64.
18. Aherne, S. A., O'Brien, N. M.: *Nutrition*, 2002; 18, 75-81.
19. Vetchý, D., Rabišková, M.: *Int. J. Pharm.*, 2002; 242, 353-356.
20. Kozlovski, V. I., Vdovichenko, V. P., Chlopicki, S. et al.: *Pol. J. Pharmacol.*, 2004; 56, 767-774.
21. Buege, J. A., Aust, S. D.: *Method. Enzymol.*, 1978; 52, 302-309.
22. Flohé, L., Gunzler, W. A.: *Method. Enzymol.*, 1984; 105, 114-121.
23. Spitz, D. R., Oberley, L. W.: *Anal. Biochem.*, 1989; 179, 8-18.
24. Štejf, M. et al.: *Kardiologie*, 2. vyd. Praha, Grada Publishing, 1998, s. 57-64.
25. Kaneko, M. Y., Matsumoto, H., Hayashi, A. et al.: *Mol. Cell. Biochem.*, 1994; 139, 91-100.

Došlo 16. 1. 2006.

Přijato ke zveřejnění 27. 2. 2006.

doc. MUDr. Jiří Nečas, CSc.  
Palackého 1-3, 612 42 Brno  
e-mail: necasj@vfu.cz

## NOVÉ KNIHY

Bartl, R.: **Anti-Osteoporotika: Osteologische Grundlagen, Pharmakologie und Klinische Anwendung**. Sv. 15 Medizinisch-pharmakologisches Kompendium, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2006, 182 s., 44 obr., 19 tab. Cena 34 EUR.

Nejnovější svazek této monotematické řady o léčení a léčivech se zabývá aktuální otázkou osteoporózy. Problematika choroby a její léčení, psaná předním odborníkem oboru, je tu v pěti kapitolách pojednána jak z hlediska teoretického, tak i klinického.

Úvodní kapitola stručně informuje o anatomii a fyziologii kostní hmoty, její struktuře, formě a funkci kostních buněk a fyziologických procesech její přestavby.

Na ni navazující klinická kapitola za definicí osteoporózy probírá její jednotlivé formy včetně různých forem fraktur i rizikových faktorů vzniku. Kapitulu uzavírá přehled diagnostických postupů.

Nejrozsáhlejší a z hlediska terapeutické praxe nejzajímavější třetí kapi-

tola přehledně shrnuje současné možnosti medikamentózní terapie choroby. Za stručnou úvodní statí o strategii léčení osteoporózy v následujících jsou totiž uvedeny informace o jednotlivých léčivech nebo skupinách léčiv. Za stručným pojednáním o analgetických následují podrobnější statě o léčivech, jakými jsou vápník, kolekalciferol (vitamin D<sub>3</sub>), z novějších stroncium-ranelát, ze starších fluoridy, dále bisfosfonáty a zejména hormony ovlivňující vápníkový metabolismus (kalcitonin, parathormon a teriparatid). Z pohlavních hormonů kniha vedle estrogenů a gestagenů uvádí i antiestrogen raloxifen. Z doplňkových farmak vedle anabolik jsou to ještě statiny, růstový hormon a některá diuretika.

Pozornost čtvrté kapitoly je zaměřena na zvláštní formy osteoporózy, kterými jsou osteoporóza dětí a mládeže, mužů nebo osteoporóza vyvolaná farmaky.

Závěrečná pátá kapitola uvádí vedle některých pro terapeutickou praxi užitečných informací přehled HVLP používaných antiosteoporotik, která jsou v současnosti k dispozici.

Svazek uzavírá citace literatury (téměř padesát knižních publikací).

A. Borovanský