

Sledování antioxidačního a antidiabetického efektu pomiferinu u alloxanem navozeného diabetes mellitus v experimentu – pilotní studie

BARTOŠÍKOVÁ L.¹, NEČAS J.¹, BARTOŠÍK T.², PAVLÍK M.², FRÁŇOVÁ J.³, KUZMINA G.¹, LUŽA J.¹

¹Lékařská fakulta Univerzita Palackého v Olomouci, Ústav fyziologie

²Fakultní nemocnice U svaté Anny v Brně, Anesteziologicko-resuscitační klinika

³Fakultní nemocnice Brno, Dětská nemocnice, II. dětská klinika

Došlo: 23. března 2007 / Přijato: 11. května 2007

SOUHRN

Sledování antioxidačního a antidiabetického efektu pomiferinu u alloxanem navozeného diabetes mellitus v experimentu – pilotní studie

Pilotní studie sledovala antioxidační a antidiabetický efekt pomiferinu u alloxanového diabetu v experimentu. Zvířata byla metodou náhodného výběru rozdělena do 2 skupin (n=7). Skupině léčené byl podáván pomiferin v dávce 10 mg/kg v 0,5% roztoku Avicelu perorálně 1x denně, skupině placebo byl podáván pouze roztok Avicelu. Intaktní skupina byla bez zákroku a bez medikace. Byly stanoveny vybrané laboratorní parametry (glukosa, urea a cholesterol v séru, ztráty glukosy a bílkovin močí), diuréza, antioxidační enzymy (superoxiddismutasa, glutathionperoxidasa), celková antioxidační kapacita a hladina malondialdehydu, a to na konci experimentu. Byly odebrány vzorky ledvinné tkáně a pankreatu pro histopatologické vyšetření. Byl zjištěn statisticky významný pokles hladiny glukosy v séru ($p \leq 0,01$), statisticky významný vzestup ($p \leq 0,01$) katalytické aktivity glutathionperoxidasy a celkové antioxidační kapacity ($p \leq 0,05$) u léčené skupiny ve srovnání se skupinou placebo. Dále byl zjištěn statisticky významný pokles hladiny malondialdehydu ($p \leq 0,01$), statisticky vysoce významný pokles ($p \leq 0,01$) diurézy, glykosurie a ztrát bílkovin močí u léčené skupiny ve srovnání se skupinou placebo. Superoxiddismutasa nevykázala signifikantní změny. Hodnoty cholesterolu a urey vykázaly nesignifikantní změny.

Výsledky biochemického vyšetření ukazují na antioxidační a antidiabetický efekt pomiferinu. Histopatologické nálezy s těmito výsledky korelují pouze částečně.

Klíčová slova: pomiferin – diabetes mellitus – antioxidanty

Čes. slov. Farm., 2007; 56, 135–140

SUMMARY

Examination of the antioxidative and antidiabetic effect of pomiferin in alloxan-induced diabetes mellitus in an experiment (a pilot study)

The antioxidative and antidiabetic effect of pomiferin was monitored under the experimental conditions of alloxan-induced diabetes mellitus. The animals were divided by random selection into 2 groups (n=7). The treated group was administered pomiferin in peroral doses of 10 mg/kg in Avicel, the placebo group was given only a solution of Avicel, and the last group was intact. Selected laboratory parameters (glucose, urea, cholesterol, antioxidative enzymes, total antioxidative capacity, malondialdehyde in serum; diuresis, total glucose and protein losses through urine) were determined. Kidney tissue and pancreas samples were taken for histopathological analysis. The findings included a statistically significant decrease ($p \leq 0,01$) in blood glucose level, a significant increase ($p \leq 0,01$) in glutathione peroxidase, total antioxidative capacity ($p \leq 0,05$) and a significant decrease ($p \leq 0,01$) in malondialdehyde level in the treated group compared to the placebo group. A highly significant decrease ($p \leq 0,01$) in diuresis, glucose

Adresa pro korespondenci:

MUDr. PharmDr. Lenka Bartošíková, Ph.D.
Ústav fyziologie LF UP
Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc
e-mail: bartosil@tunw.upol.cz

and protein losses through urine were identified in the treated group compared to the placebo group. The superoxide dismutase catalytic activity, urea and cholesterol levels involved non-significant changes. The results of biochemical examination show a protective antioxidative and antidiabetic effect of pomiferin. The results of histopathological examination correlate with them only partially.

Key words: pomiferin – diabetes mellitus – antioxidant

Čes. slov. Farm., 2007; 56, 135–140

Má

Úvod

Diabetes mellitus je syndrom, který je v začátku charakterizován ztrátou glukosové homeostázy. Onemocnění je progresivní a je spojeno s vysokým rizikem makroangiopatických (aterosklerotických) a mikroangiopatických komplikací, tj. především diabetické nefropatie, neuropatie a retinopatie, která může vyústit i v úplnou slepotu. Odchylky v regulaci peroxidů a v metabolismu přechodných kovů jsou schopné vyústit v onemocnění, tak jako v jeho dlouhodobé komplikace¹⁾. Diabetes mellitus je spojen s oxidativními reakcemi, které jsou částečně katalyzovány přechodnými kovy, ale jejich příčinný vliv na poškození diabetických tkání je stále diskutován²⁾.

Mnoho důkazů objasňujících úlohu oxidativních pochodů v indukci diabetes mellitus pochází ze studií, ve kterých byl u experimentálních zvířat navozen modelový patologický stav pomocí alloxanu²⁻⁴⁾. Alloxan selektivně toxicky poškozuje β buňky Langerhansových ostrůvků pankreatu a vede v závislosti na dávce k rozvoji různě závažné inzulínopenie, a tedy i diabetu typu I. Alloxan vyvolá nejprve přechodnou stimulaci β buněk, při které dojde k uvolnění intracelulárních zásob inzulínu a vznikne krátkodobá hypoglykémie. Po několika dnech se pak u zvířat objeví inzulínopenie

bě a působení reaktivních kyslíkových a dusíkových radikálů, látek, které vznikají *in vivo* a způsobují poškození DNA, lipidů, proteinů a dalších součástí buněk. Oxidativní poškození buněk a tkání hraje důležitou roli v etiologii většiny tzv. civilizačních onemocnění⁶⁾. Endogenní antioxidační ochrana lidského organismu, např. v podobě superoxiddismutasy a enzymů odstraňujících peroxid vodíku či bílkovin vázících kovy, je vzhledem k současnému způsobu života ve vyspělých zemích nedostačující. Efektivní se jeví cesta, spočívající v minimalizování zdrojů tvorby volných radikálů a posílení přirozeného antioxidačního mechanismu podáváním látek, které působí jako antioxidanty nebo tzv. zhášecí volných radikálů. Proto při studiu antioxidačně působících látek je zvláštní pozornost věnována právě hledání takových látek, jejichž používání by bylo možné při tzv. radikálově podmíněných stavech zejména v prevenci^{7, 8)}.

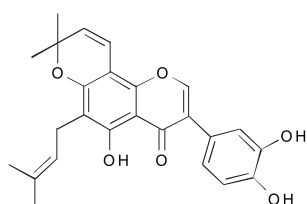
Flavonoidy jsou v přírodě velmi rozšířenou skupinou polyfenolických látek, které se vyskytují v rostlinách převážně ve formě glykosidů. Farmakologicky účinné jsou zejména aglykony. Řada z nich vykazuje účinky hepatoprotektivní, diuretické, vazodilatační, antibakteriální, chemoprotektivní, byly popsány rovněž účinky protizánětlivé, antidiabetické, antialergické aj.⁹⁻¹¹⁾. V posledních letech je zvýšená pozornost věnována studiu jejich antioxidační aktivity a schopnosti zhášet nebo vychytávat volné radikály¹²⁻¹⁴⁾.

Pomiferin, izolovaný z plodenství rostlin *Maclura pomifera* (RAFINESQUE) *Moraceae*, patří do skupiny prenylovaných flavonoidů (obr. 1). Prostorově se molekula jeví jako planární¹⁵⁾.

Antioxidační působení pomiferinu bylo prokázáno ve studiích *in vitro* metodou stanovení peroxidace lipidů na jaterních mikrozómech laboratorního potkana za použití butylhydroxytoluenu (BHT) jako referenčního standardu a následně v *in vivo* studii^{15, 16)}.

Cílem práce bylo sledovat antioxidační a antidiabetický efekt pomiferinu na alloxanem navozený diabetes mellitus u laboratorního potkana.

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.



Obr. 1. Struktura pomiferinu

3-(3,4-dihydroxyfenyl)-5-hydroxy-8,8-methyl 6-(3-methyl-but-2-enyl)-8H-pyranol[2,3-f]chromen-4-on

$C_{25}H_{24}O_6$ $Mr = 420,46$

s klasickými příznaky diabetu: hyperglykémie, glykosurie, polydipsie a polyurie. Toxicita alloxanu *in vitro* a *in vivo* může být inhibována cheláty, zhášecí hydroxylových radikálů a antioxidanty rozpustnými v tucích^{2, 5)}.

Úloha volných radikálů a antioxidantů v lidském organismu je v odborné literatuře diskutována již více než 25 let. Antioxidanty působí preventivně proti tvor-

POKUSNÁ ČÁST

Materiál a metodika

Vlastní *in vivo* studie byla prováděna na laboratorních potkanech kmene Wistar SPF (původ AnLab s.r.o., SRN), samčího pohlaví, stejného stáří a srovnatelné tělesné hmotnosti (300±14 g). Zvířata byla umístěna jednotlivě ve skleněných metabolických klecích, byla krmena standardní dietou (Dieta pro malá laboratorní zvířata SPF M 1) a napájena vodou ad libitum.

Po době nezbytné pro aklimatizaci byl 20 zvířatům jednorázově podán alloxan tetrahydrát v dávce 50 mg/kg hmotnosti intravenózně. Po 5 dnech bylo provedeno stanovení hodnot glykémie pomocí přístroje Glucochir a diagnostických testovacích proužků Glucocard. Do pokusu byla zařazena zvířata, u nichž byla hladina krevního cukru zvýšena z primárních 4–6 mmol/l na 18±2 mmol/l. Metodou náhodného výběru byla zvířata rozdělena do 2 skupin (n=7). Skupině léčené byl podáván pomiferin v dávce 10 mg/kg perorálně v 0,5% roztoku Avicelu 1× denně. Placebo skupině byl podáván pouze 0,5% roztok Avicelu v množství 2 ml, rovněž perorálně 1× denně. Do experimentu byla zařazena ještě skupina zvířat intaktních (n=7), bez navození patologického stavu a bez medikace.

Na začátku experimentu byla u zvířat všech skupin stanovena hodnota glukosy v séru, na konci experimentu byly u všech zvířat stanoveny vybrané laboratorní parametry (hladina glukosy, urey a cholesterolu v séru) spektrofotometricky za pomoci laboratorních testovacích souprav Diagnostika Lachema, anti-oxidační enzymy (superoxiddismutasa, glutathionperoxidasa) a celková antioxidační kapacita na automatickém analyzátoru Cobas Mira S, pomocí testovacích setů firmy Randox, Dublin. Rovněž byla jednorázově na konci experimentu stanovena hladina malondialdehydu v séru spektrofotometricky metodou Tvare¹⁷⁾. Dále byla stanovena diuréza a celkové ztráty glukosy (glykosurie) a bílkovin močí spektrofotometricky za pomoci laboratorních testovacích souprav Diagnostika Lachema.

Tab. 1. Hladina glukosy v séru

Hladina glukosy v séru (mmol/l)	léčená skupina	placebo skupina	intaktní skupina
začátek experimentu	19,45±0,73	19,50±0,52	4,35±0,06
konec experimentu	8,62±1,43**	20,35±0,45	4,92±0,72

** p≤0,01 léčená vs placebo

Tab. 2. Hodnoty SOD, GSHPx, AOC a MDA stanovené na konci experimentu

	SOD (U/ml)	GSHPx (μkat/l)	AOC (mmol/l)	MDA (mmol/l)
léčená skupina	207,15±10,31	1245,13±89,31**	0,85±0,05*	1,29±0,49**
placebo skupina	204,05±8,74	1079,32±79,91	0,77±0,08	3,40±0,93
intaktní skupina	58,82±2,76	1821,60±55,07	1,20±0,06	1,01±0,05

* p≤0,05 léčená vs placebo, ** p≤0,01 léčená vs placebo

Po ukončení medikace 20. den byla zvířata utrácena exsanguinací a byly odebrány vzorky ledvinové tkáně a pankreatu pro histopatologické vyšetření. Materiál byl fixován v neutrálním 10% formolu a rutinně barven hematoxylinem–eosinem. Preparáty byly vyšetřeny v optickém mikroskopu erudovaným histopatologem bez znalosti experimentálního protokolu.

Získané hodnoty sledovaných laboratorních parametrů byly zpracovány pomocí tabulkového procesoru Microsoft Excel a statisticky vyhodnoceny za pomoci programu UNISTAT, testu ANOVA a Studentova T-testu, hodnota p≤0,05 byla považována za signifikantní.

VÝSLEDKY

Výsledky laboratorních vyšetření

Na začátku experimentu nebyl při srovnání skupiny zvířat léčených a placebo zjištěn signifikantní rozdíl. Na konci experimentu došlo k vysoce signifikantnímu snížení hodnoty glukosy v séru u skupiny léčené (p≤0,01) (tab. 1).

Tab. 3. Hodnoty denní diurézy, glykosurie a ztrát bílkovin močí na konci experimentu

	Diuréza (ml/den)	glykosurie (mmol/l)	ztráty bílkovin močí (g/l)
léčená skupina	14,50±0,35	1,17±0,45	0,83±0,37
placebo skupina	27,65±1,50**	3,49±0,63**	1,36±0,35**
intaktní skupina	12,45±0,45	1,13±0,54	0,43±0,16

* p≤0,05 léčená vs placebo, ** p≤0,01 léčená vs placebo

Tab. 4. Hodnoty cholesterolu a urey v séru na konci experimentu

	Cholesterol (mmol/l)	urea (mmol/l)
léčená skupina	1,82±0,34	6,57±1,51
placebo skupina	1,89±0,36	7,61±1,04
intaktní skupina	1,95±0,32	5,95±1,01

** p≤0,01 léčená vs placebo

Skupina intaktní nevykázala v průběhu experimentu žádné změny (tab. 2).

Hodnoty superoxidodismutasy vykazaly nesignifikantní změny při porovnání hodnot skupiny léčené a placebo na konci terapie (v průběhu terapie nedošlo ke změně hodnoty naměřených hladin).

Byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) hladiny glutathionperoxidasy u skupiny léčené, na konci terapie, ve srovnání se skupinou placebo.

Byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,05$) hodnot celkové antioxidační kapacity u skupiny léčené, na konci terapie, ve srovnání se skupinou placebo.

Byl zjištěn statisticky vysoce významný pokles ($p \leq 0,01$) hladiny MDA u skupiny léčené ve srovnání se skupinou placebo na konci terapie (tab. 2).

Hodnoty denní diurézy i glykosurie vykazaly vysoce signifikantní rozdíly ($p \leq 0,01$) při porovnání hodnot léčené a placebo skupiny na konci experimentu. Rovněž byl zjištěn vysoce signifikantní rozdíl ($p \leq 0,01$) u ztrát bílkovin močí při porovnání obou skupin (tab. 3).

Porovnáním hodnot cholesterolu a urey v séru u skupin léčené a placebo nebyl zjištěn signifikantní rozdíl na konci experimentu (tab. 4).

Výsledky histopatologického vyšetření

Ledvinná tkáň

Skupina léčená

Ve 20 % případů bylo zjištěno mírné edematózní prosáknutí parenchymu a mírné překrvení jako projev dřevňových změn. Dále byly pozorovány změny glomerulů ve smyslu jejich zvýšené buněčnosti, způsobené přítomností erytrocytů a zmnožením mesangia zhruba ve 20 % případů. Cévní změny v obou sledovaných skupinách, spočívající v mírném ztluštění stěny cév středního a malého kalibru, se daly najít ve 20 % případů.

Histologické změny jsou hodnoceny jako minimální a nesignifikantní.

Skupina placebo

Ve dřeni byly patrné pouze fokálně vakuolární degenerace epitelů proximálních tubulů s jejich mírným překrvením téměř v 80 % případů. V koře byly sledovatelné jednak změny glomerulů a jednak změny cévních. V případě glomerulů se jednalo o změny jejich buněčnosti, a to ve smyslu jejich zvýšení (erytrocyty, zánětlivý infiltrát a zmnožení mesangiálních buněk) nebo snížení (hyalinizace s tvorbou eosinofilních depozit – obdoba Kimmelstiel Wilsnova syndromu). Snížená buněčnost glomerulů je projevem spíše dlouhodobého průběhu nemoci, ve sledovaném souboru se vyskytly náznaky asi v 10 % případů. Zvýšená buněčnost zde zastoupená převážně erytrocyty se vyskytla ve 40–50 % případů.

Histologické změny jsou hodnoceny jako minimální a nesignifikantní.

Skupina intaktní

Normální stavba.

Pankreas

Skupina léčená

Normální stavba byla zjištěna jak ve složce zevní i vnitřně sekretorické, bez fibrózy a infiltrace.

Skupina placebo

Byla zjištěna mírná variace, co do velikosti i počtu ostrůvků, ojedinele zastižena mitotická aktivita beta buněk. Nebyla zachycena fibróza (svědčící pro dlouhodobý proces) ani zánětlivá lymfocytární infiltrace, která se pravidelně vyskytuje u infekcí nastoleného diabetu.

Histologické změny jsou nepříznačné a jen zcela minimální. I mírnou variabilitu ve velikosti a počtu ostrůvků je třeba hodnotit s rezervou, vzhledem k tomu že se tyto veličiny mění v závislosti na lokalitě odběru (hlava pankreatu × tělo pankreatu).

Skupina intaktní

Normální stavba.

DISKUZE

Účinky látek s potenciálním antioxidačním a antidiabetickým efektem *in vivo* jsou studovány experimentálně na patologických biomodelech, za stavů, u nichž významná účast volných radikálů v patogenezi byla prokázána^{3, 4, 18}). Diabetes mellitus je jedním z patologických stavů, které jsou vždy provázeny oxidačním stresem, tj. převahou oxidačních reakcí nad antioxidační ochranou tkání¹⁹). V krvi a tkáních nemocných je prokazatelně vyšší tvorba reaktivních forem kyslíku a lipoperoxidů a současně snížené hladiny antioxidačně působících látek (vitamin C, vitamin E, kyselina lipová, glutathion) a antioxidačně působících enzymů, např. superoxidodismutasa, katalasa^{20–22}). Podle současných názorů hraje oxidační stress významnou roli v etiopatogenezi diabetu 1. i 2. typu a má klíčový význam pro vznik a rozvoj diabetických komplikací.

Diabetes mellitus je charakterizován zvýšenou glykemií a často současnou glykosurií. Základním patogenetickým činitelem, který k hyperglykémii vede, je chybějící či nedostatečná sekrece insulinu nebo jeho nedostatečný účinek na úrovni buněk periferních tkání. Metabolické důsledky tohoto se promítají nejen do metabolismu sacharidů, často se projeví i jako porucha metabolismu proteinů, jindy jako porucha metabolismu lipidů, jejíž patogeneze je však složitější^{23, 24}).

Zvýšení hladiny glukosy v séru, stanovené na začátku experimentu a její monitorace v průběhu experimentu byly nezvratným důkazem navozeného patologického stavu pomocí alloxanu. Rovněž tak glykosurie jako důsledek překročení ledvinného prahu pro glukosu. Změny obou sledovaných parametrů vykazaly při statistickém vyhodnocování signifikantní změny při vzájemném porovnání hodnot léčené a placebo skupiny.

V rámci experimentu bylo zjištěno zlepšení hodnot ukazatelů antioxidačního systému, zejména významně

zvýšení aktivity GSHPx a celkové antioxidační kapacity při srovnání hodnot léčené a placebo skupiny. Hodnoty SOD nevykázaly signifikantní změny v průběhu experimentu. Vyšetřované enzymy působí intracelulárně a jejich aktivita na sebe většinou navazuje²⁵⁾. Statisticky významně vyšší hodnoty celkové antioxidační kapacity u léčené skupiny, která se uplatňuje extracelulárně, je zřejmě důsledkem suplementace látkou s prokázaným antioxidačním účinkem *in vitro*.

Výsledky statistického porovnání hodnot MDA obou skupin (léčené a placebo) ukazují signifikantní změny, u skupiny léčené byla nalezena statisticky významně nižší průměrná hodnota tohoto vedlejšího toxického produktu lipoperoxidace, ve srovnání se skupinou placebo na konci terapie.

Hladina cholesterolu byla v rámci experimentu monitorována jako doprovodný biochemický parametr a zároveň jako jeden z ukazatelů stavu tukového metabolismu za daného uměle navozeného patologického stavu u laboratorního potkana. Dle některých autorů se laboratorní potkan nejeví jako ideální pokusné zvíře pro monitorování hladiny cholesterolu v séru, neboť zde není analogie s lidským organizmem a potkan oproti člověku vykazuje velmi podstatné odchylky²⁶⁻²⁸⁾. Na druhé straně existuje celá řada preklinických studií, kdy právě laboratorní potkan byl použit jako vhodné zvíře v rámci testování potenciálního hypolipidemického účinku aplikovaných látek^{29, 30)}. Hodnoty cholesterolu vykázaly v průběhu experimentu nesignifikantní změny.

U pacientů s déletrvajícím diabetem a zvláště u tzv. dekompenzovaných diabetiků se setkáváme s výskytem chronických komplikací specifických a nespecifických³¹⁾. Jednou z chronických specifických komplikací je nález diabetické nefropatie, která je charakterizovaná proteinurií, často hypertenzí a pomalou postupnou alterací renálních funkcí. Diabetická nefropatie byla poprvé posána v roce 1936 Kimmelstielem a Wilsonem jako interkapilární nodulární glomeruloskleróza. V užším smyslu slova diabetickou nefropatií rozumíme mikroangiopatické poškození ledvin.

V rámci experimentu byla monitorována hladina urey v séru, ztráty celkových bílkovin močí a diuréza u pokusných zvířat, jako ukazatele možného navození diabetické nefropatie. Hodnoty urey vykázaly nesignifikantní změny, diuréza byla signifikantně vyšší u placebo skupiny ve srovnání se skupinou léčených zvířat. Ztráty bílkovin močí rovněž vykázaly signifikantní změny při porovnání hodnot skupiny léčené a placebo.

Histopatologicky hodnotitelné změny v ledvinách závisí na délce trvání diabetu a na tom, zda a jak byl diabetes léčen. U krátkodobě trvajících neléčeného onemocnění je za určitých okolností možno prokázat poškození charakteru diabetické nefrosy, která se mikroskopicky projevuje kalným zduřením, vakuolární degenerací, steatosou buněk proximálních tubulů, ztlustěním bazálních membrán a přítomností glykogenu v buňkách Armanioho zóny.

Histopatologické změny v pankreatu nebývají mikroskopicky příznačné a nález nebývá jednotný. U juvenilního diabetu může být počet ostrůvků snížen, někdy

nacházíme degranulaci beta buněk, fibrózu ostrůvků a někdy lymfocytární infiltrace. U dospělých diabetiků bývá počet ostrůvků většinou normální nebo lehce snížený, ale není možno diabetes jednoznačně histologicky diagnostikovat.

Pomiferin je přírodní látkou, která byla zatím ojedinele použita pro testování *in vivo* na patologických biomodelech¹⁶⁾. Převážná většina literárních odkazů je proto charakteru *in vitro* prováděných studií, ve kterých je často porovnáván účinek sledovaných zástupců skupiny flavonoidů mezi sebou.

Není možnost srovnání námi zjištěných výsledků získaných při testování pomiferinu na modelu alloxanového diabetu v preklinickém pokusu s výsledky jiných autorů.

ZÁVĚR

Rozšíření poznatků o antioxidačních účincích flavonoidů *in vivo* vede k závěru, že patologický vliv volných radikálů může být ovlivněn nebo snížen za předpokladu, že je zabráněno jejich vzniku nebo působení na buněčné membrány, spojené s jejich dezintegrací a následnou poruchou funkce.

V současné době existuje řada látek, které mají schopnost lapat nebo zhášet volné radikály. Jednou z nich je pomiferin, jehož antioxidační aktivita byla prokázána při testování *in vitro*.

Výsledky předložené studie ukazují na pozitivní antioxidační a antidiabetický efekt testovaného flavonoidu pomiferinu *in vivo* v podmínkách alloxanem navozeného diabetes mellitus. Experimentálně získané výsledky by se mohly stát impulzem pro další preklinické analýzy s následným ověřením efektu této látky v klinické praxi.

LITERATURA

1. **Yahia, R. B., Lichnovská, R., Brychta, T.:** Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub., 2005; 149, 237-241.
2. **Wolff, S. P.:** British Med. Bull., 1993; 49, 642-652.
3. **Tang, L., Wei, W., Chen, L., Liu, S.:** J. Ethnopharmacol., 2006; 108, 109-115.
4. **Zanatta, L., de Sousa, E., Cazarolli, L. H. et al.:** J. Ethnopharmacol., 2007; 109, 151-155.
5. **Malaisse, W. J.:** Biochem. Pharmacol., 1982; 22, 3527-3534.
6. **Holeček, V., Racek, J.:** Klin. Biochem. Metab., 1994; 2, 137-141.
7. **Nečas, J., Bartošiková, L., Drápelová, L. et al.:** Vnitř. Lék., 1997; 43, 707-711.
8. **Bartošiková, L., Nečas, J., Pavlíček, V. et al.:** Cs. Slov. Farm., 1998; 47, 151-154.
9. **Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, A., Vanden Berghe, D.:** Planta Med., 1996; 62, 222-226.
10. **Read, M. A.:** Am. J. Pathol., 1995; 147, 235-237.
11. **Perez, R. M., Zaval, M. A., Perez, S., Perez, C.:** Phytomed., 1998; 5, 55-57.

12. **Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M. et al.:** J. Am. Chem. Soc., 1994; 116, 4846-4851.
13. **Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell et al.:** Free Rad. Res., 1995; 22, 375-383.
14. **Catapano, A. L.:** Angiol., 1997; 48, 39-44.
15. **Veselá, D., Kubínová, R., Muselík, J. et al.:** Fitoterapia, 2003; 75, 2029-211.
16. **Bartošíková, L., Nečas, J., Suchý, V. et al.:** Jahrestagung-Joint Meeting 2004, Regensburg, SRN, October 6-9, 2004 (Abstract In: ISBN: 3-00-014723-3)
17. **Kosugy, H., Kikugava, K.:** Free Rad. Biol. Med., 1989; 7, 205-207.
18. **Sharma, S. B., Nasir, A., Prabhu, K. M., Murthy, P. S.:** J. Ethnopharmacol., 2006; 104, 367-373.
19. **Sinclair, A. J.:** Diabet. Rev., 1993; 2, 7-11.
20. **Giugliano, D., Ceriello, A., Paoliso, G.:** Diabet. Care, 1996; 19, 257-267.
21. **Packer, L., Witt, E. H., Tritschler, H. J.:** Biol. Med., 1995; 19, 227-250.
22. **Wohaieb, S. A., Godin, D. V.:** Diabetes, 1987; 36, 1014-1018.
23. **Klener, P. et al.:** Vnitř. Lék., 1. vyd. Praha, Galén, 1999, s. 725
24. **Roy, S., Seghal, R., Padhy, B. M., Kumar, V. L.:** J. Ethnopharmacol., 2005; 102, 470-473.
25. **Machartová, V., Racek, J., Kohout, J. et al.:** Vnitř. Lék., 2000; 46, 444-446.
26. **Stone, K. J., Willis, A. L., Hart, W. M. et al.:** Lipids, 1979; 14, 174-180.
27. **Siguel, E. N.:** Nutr. Cancor, 1983; 4, 285-291.
28. **Nishina, P. M., Schneeman, B. O., Freedland, R. A.:** J. Nutr., 1991; 121, 431-437.
29. **Sharma, R. D.:** Lipids, 1979; 14, 535-540.
30. **John, W., Loechleiter, F., Weber, F.:** J. Lipid. Res., 1988; 29, 1359-1366.
31. **Anděl, M. et al.:** Diabetes mellitus. 1. vyd. Praha, Galén, 2001, s. 78.

EXCERPTA

● Světová produkce biotechnologických léčiv

Pod pojem biotechnologie se zahrnuje soubor výrobních a servisních procesů využívajících přírodních, biologických dějů, příkladem jsou výroby kvasných produktů, léčiv nebo krmiv. Tato technologie se již dlouho používá v potravinářství: např. to jsou kvasné procesy (zpracování vinných šťáv na víno) nebo fermentační metody, což bývají chemické změny organických látek působením enzymů (mléčné či octové kvašení) a zde lze zařadit i výroby určitých druhů sýrů s jejich zráním, kdy dochází také k biotechnickému dění.

Za počátek genetického inženýrství se pokládá provedení rekombinace DNS *in situ* a je již řada biotechnologicky připravených léčiv, z nichž je asi 50 % ve stadiu různého stupně klinických zkoušek. Při srovnání obou způsobů výroby léčiv lze nejlépe ukázat na jisté přednosti biotechnologie. Léčiva vyráběná klasickými chemickými metodami mají menší molekuly, přesně definované struktury, jsou jen málo nebo částečně citlivé na výrobní změny a relativně stabilní. Naproti tomu léčiva vyráběná biotechnologicky tvoří velké komplexní molekuly získávané z buněčných kultur, ty jsou citlivé na jakékoliv změny při výrobních postupech a značně reagují na změněné podmínky. V této výrobě se pracuje s živými systémy nebo s organizmy charakterů proteinů uspořádaných do trojrozměrných molekul.

V této výrobě a dalším zpracování těchto léčiv se neustále musí kontrolovat jakost, aby se zajistily požadované účinky.

Toto nebezpečí se prokázalo již při výrobě erythropoetinu, kdy došlo k záměně přidané pomocné látky, a tím se získalo léčivo naprosto odlišného účinku, způsobující těžké formy anémie. Dále se zjistilo, že bioobdobná generika těchto látek nejsou identická s originály a musí také mít jiné INK.

Mezi přední biotechnologické světové výrobce patří americká firma AMGEN, která od roku 1980 vyrábí léčiva a léky ve svých šesti závodech (celkem má zde asi 18 000 spolupracovníků). Centrála je v Kalifornii, nejnovější závod bude vystavěn v Corku (Irsko). Od roku 1992 má také velkou továrnu (13 objektů) v Jucosu na ostrově Portoriko. Portoriko je přidruženým státem USA a je na nejmenším ostrovu Velkých Antil. Žije zde asi čtyři miliony obyvatel, je tu rozsáhlý potravinářský průmysl a také výroba léčiv a léků. Na ostrově jsou továrny řady významných světových farmaceutických výrobců (celkem 15), které zde vyrábí kolem 25 % biotechnologické světové produkce léčiv. Firma AMGEN produkuje nyní tři druhy HVLP: antianemikum Darbepoetin (u nás to je Eprex, příp. Neorecormon), dále haemopoetický růstový faktor Filgrastin (u nás Neupogen) a Pegfilgrastin.

V klinických zkouškách má dalších 20 biotechnologických léčiv různějších typů terapeutických indikací (např. šest je na léčbu určitých druhů nádorů aj.). Zajímavý je i výběr personálního obsazení těchto závodů, v nichž pracuje asi 67 % vysokoškolsky vzdělaných zaměstnanců. Nová továrna v Irsku bude největším závodem AMGENU a vnitřně je členěna obdobně jako závod na Jucosu, protože se počítá s možnými obměnami pracovníků mezi oběma závody.

Heinze, S.: Krankenhauspharmaziem 2007; 28, 14-16.

J. Malý