

MORIN V TERAPII ISCHEMICKO-REPERFUZNÍHO POŠKOZENÍ LEDVINNÉ TKÁNĚ LABORATORNÍHO POTKANA

BARTOŠÍKOVÁ L., NEČAS J., SUCHÝ V.¹, JANKOVSKÁ D.¹, JANOŠTÍKOVÁ E., BARTOŠÍK T.²,
KLUSÁKOVÁ J.³, JUŘICA J.⁴, FLORIAN T., FRYDRYCH M., KRČMÁŘ J., FRÁŇA P.⁵, FRÁŇOVÁ J.⁶

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav humánní farmakologie a toxikologie

¹Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav přírodních léčiv

²Úrazová nemocnice, Brno

³Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, I. Patologicko-anatomický ústav, Brno

⁴Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Farmakologický ústav, Brno

⁵Fakultní nemocnice U sv. Anny, II. interní klinika, Brno

⁶Dětská nemocnice FN, Brno

SOUHRN

Morin v terapii ischemicko-reperfučního poškození ledvinné tkáně laboratorního potkana

Cílem předložené studie bylo sledovat protektivní efekt morinu podávaného v rámci terapie ischemicko-reperfučního poškození. Zvířata byla randomizovaně rozdělena do 5 skupin (n=10). Jedna skupina byla intaktní. U tří skupin léčených a jedné placebo skupiny byla navozena ischemie ledviny a následná reperfuze levé ledviny v celkové anestezii. Třem skupinám zvířat (n=10) – skupiny léčené – byl podáván morin ve vzestupných koncentracích 5 mg/kg, 10 mg/kg a 20 mg/kg, a to perorálně v 0,5% roztoku Avicelu 1x denně. Čtvrté skupině zvířat (n=10) – placebo skupina – byl aplikován pouze 0,5% roztok Avicelu v množství a způsobem podání jako v případě skupiny léčené. Na konci experimentu 15. den byla zvířata v celkové anestezii exsanguinována a byly vyšetřeny zvolené biochemické parametry (superoxiddismutasa, glutathionperoxidasa, celková antioxidační kapacita, malondialdehyd, kreatinin, urea a kyselina močová). V moči byly analyzovány kreatinin, urea a celková bílkovina; byla měřena diuréza v průběhu 24 hodin. Dále byly odebrány vzorky ledvinné tkáně pro histopatologické vyšetření. Morin podporuje vlastní obranné reakce organismu proti volným radikálům, jeho podávání vede k poklesu peroxidace lipidů v buněčných membránách a ke zlepšení ledvinných funkcí. Nejlepšího histopatologického výsledku bylo dosaženo u dávky 20 mg/kg.

Klíčová slova: antioxidační efekt – ischemie-reperfuze – ledviny – morin – terapie

Čes. slov. Farm., 2006; 55, p. 78–83

SUMMARY

Morin in the Therapy of the Ischemia-Reperfusion Damage Model of the Rat Kidney

The aim of this study was to analyze the protective effects of morin administered during the therapy of reperfusion injury of the laboratory rat kidney. Animals were randomly divided into five groups (n=10). One group was left intact. Three medicated groups and one placebo group were subjected to ischemia (60 min) and reperfusion of the left kidney. Morin was suspended in a 2 ml of 0.5% Avicel solution and administered orally by a gastric probe at doses of 5, 10, and 20 mg.kg⁻¹ once a day for 15 days. The placebo group was given only 2 ml of 0.5% Avicel in the same way. On the 15th day, all the animals were exsanguinated and the reperfused kidneys were recovered. Selected biochemical markers in blood were assessed: superoxide dismutase, glutathion peroxidase, total antioxidative capacity, malondialdehyde, creatinine, urea, and uric acid. Creatinine, urea, and total protein were analyzed in urine, and a 24-hour diuresis was recorded. The kidney tissue samples were used for histopathological examination. Morin supported the organism's own defensive reactions against free radicals and decreased lipid peroxidation in the cell membranes and contributed to the recovery of kidney functions. The histopathological results confirm 20 mg.kg⁻¹ as the most effective dose.

Keywords: antioxidative effect – ischemia-reperfusion – kidney – morin – therapy

Čes. slov. Farm., 2006; 55, p. 78–83

Má

Úvod

Studium biologické aktivity a mechanismu účinku flavonoidů je předmětem výzkumu řadu let. Flavonoidy tvoří jednu z největších skupin přírodních fenolů. V rostlinách se vyskytují zpravidla jako glykosidy, jsou obsaženy také v ovoci a zelenině.

Farmakologicky účinné jsou zejména aglykony. Řada z nich vykazuje účinky hepatoprotektivní, diuretické, vazodilatační, antibakteriální, chemoprotektivní, byly popsány rovněž účinky protizánětlivé, antidiabetické, anti-alergické aj.¹⁻⁴⁾

V posledních letech je zvýšená pozornost věnována studiu jejich antioxidační aktivity a schopnosti zhaset nebo vychytávat volné radikály⁵⁻⁸⁾. Benefit je flavonoidy zprostředkovan v mnoha procesech. Zabraňují peroxidaci lipidů, likvidují volné kyslíkové radikály, váží a inaktivují některé prooxidační ionty kovů (železo, měď). Scavengerová aktivita flavonoidů je jednou z nejznámějších vlastností a představuje významné léčebné využití⁹⁾. Flavonoidy byly testovány i u post-transplantačních stavů¹⁰⁾. Antioxidační aktivita flavonoidů závisí na počtu a poloze hydroxylových skupin v molekule a také na jejich glykosylaci. Optimální vlastnosti byly nalezeny u flavonoidů s o-hydroxy strukturou v kruhu B, 2,3 dvojnou vazbou a 4-oxo funkční skupinou v kruhu C a 3 a 5 -OH skupinami na kruzích A a C¹¹⁾.

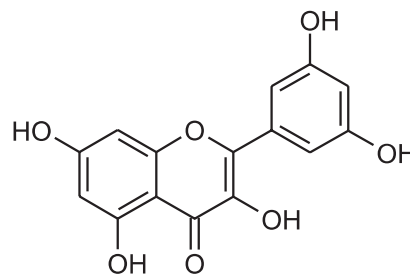
Morin (3, 5, 7, 3', 5' – pentahydroxyflavon) je obsahovou látkou *Morus tinctoria* L., ze které byl vyizolován. Patří do skupiny flavonolů, základní skelet je substituovaný pěti hydroxylovými skupinami v polohách 3, 5, 7, 3', 5'. Výsledky testování *in vitro* prokázaly jeho antioxidační aktivitu ve srovnání s butylhydroxytoluenem. Předchozí pilotní studie *in vivo* prokázaly jeho antioxidační aktivitu^{12, 13)}. Z tohoto důvodu byla látce věnována pozornost v rámci dalších preklinických experimentů *in vivo*.

Cílem studie bylo sledovat antioxidační efekt morinu v rámci terapeutického podávání v podmínkách ischemie-reperfuze ledviny 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.

POKUSNÁ ČÁST

Pokusy byly prováděny na 50 laboratorních potkanech kmene Wistar SPF (AnLab, SRN) samčího pohlaví, stejného stáří a srovnatelné tělesné hmotnosti (250 ± 10 g). Zvířata byla po dobu aklimatizace ustájena v místnosti se standardním teplotním režimem, byla krmena standardní dietou pro malá laboratorní zvířata a napájena vodou dle potřeby. Poté byla u 40 laboratorních zvířat navozena ischemie ledviny (naložením cévní svorky na



Obr. 1. Chemická struktura morinu

levou arteria renalis po dobu 60 minut) a následná reperfuze v celkové anestezii – 2% Rometar (xylazin) 0,5 ml + 1% Narkamon (ketamin) 10 ml, dávka 0,5 ml roztoku/100 g hmotnosti potkana. Po zotavující periodě byla tato zvířata metodou náhodného výběru rozdělena do 4 skupin (3 léčené skupiny a 1 placebo skupina) a byla umístěna jednotlivě v metabolických skleněných klecích. Třem skupinám zvířat ($n=10$) – skupiny léčené – byla podávána testovaná látka ve vzestupných koncentracích 5 mg/kg, 10 mg/kg a 20 mg/kg (pro každou skupinu zvířat 1 zvolená koncentrace), a to perorálně v 0,5% roztoku Avicelu (mikrokrytalická celulóza) 1x denně. Čtvrté skupině zvířat ($n=10$) – placebo skupina – byl aplikován pouze 0,5% roztok Avicelu v množství a způsobem podání jako v případě skupiny léčené. Další skupina zvířat ($n=10$) – intaktní – byla bez aplikace jakékoliv látky a bez úvodního zákroku. Na konci pokusu 15. den byla zvířata v celkové anestezii (viz výše) exsanguinována a byly vyšetřeny zvolené laboratorní parametry.

V krvi: superoxiddismutasa (SOD), glutathionperoxidasa (GSHPx), celková antioxidační kapacita (AOC) – pomocí testovacích souprav firmy RANDOX, Dublin, Ireland comp. na automatickém analyzátoru COBAS MIRA S.

Dále malondialdehyd (MDA) v séru – metoda TBARS¹⁴⁾; urea, kreatinin, kyselina močová.

V moči: urea, kreatinin, celková bílkovina a byla měřena denní diuréza. Hodnoty močových parametrů byly následně vztaženy k denní diuréze a stanoveny jako odpady za 24 hodin.

Získané hodnoty sledovaných laboratorních parametrů byly zpracovány pomocí tabulkového procesoru Microsoft Excel a statisticky vyhodnoceny pomocí programu UNISTAT, testu ANOVA a následně Studentova t-testu. Hodnota $p \leq 0,05$ byla považována za signifikantní.

Dále byly odebrány vzorky ledvinové tkáně pro histopatologické vyšetření. Materiál byl fixován v 10% formaldehydu a zpracován ručním způsobem. Z každého vzorku byly zhotoveny 2 bloky, řezy byly barveny hematoxylinem – eosinem. Všechny hodnocené vzorky byly ve výborné kvalitě, hodnocení provedl histopatolog bez znalosti experimentálního protokolu.

Princip histopatologického hodnocení

V materiálu byly hodnoceny a bodovány zvláště všechny vzorky ve 3 oblastech ledviny, výsledek byl sečten a na závěr bylo stanoveno průměrné skóre každé medikované skupiny a jednak byly srovnávány i jednotlivé oblasti z medikovaných skupin navzájem.

Schéma bodování

1. oblast – dřevě ledviny

Zde byl hodnocen stupeň destrukce tkáně krvácením (1 – drobné disperzní extravazáty, 2 – pravidelné hemoragie na rozhraní kory a dřevě, 3 – krvácení i s destrukcí tkáně).

2. oblast – kora a glomeruly

Zde byla hodnocena jak přítomnost hemoragií extraglomerulárně – 2, tak zvýšená celularita a extravazáty v rozsahu vlastní

Tab. 1. Hodnoty sledovaných laboratorních parametrů v krvi vyjádřené jako $X \pm SD$

Skupina zvířat (n=10)	SOD (U/ml)	GSHPx (μ kat/l)	AOC (mmol/l)	MDA (mmol/l)
léčená (5 mg/kg morinu)	266,93 $\pm$ 15,94 ^{***}	1230,23 $\pm$ 153,02 ⁺⁺	0,49 $\pm$ 0,03 ^{***}	0,37 $\pm$ 0,19 ^{***}
léčená (10 mg/kg morinu)	246,80 $\pm$ 31,61 ^{***}	1201,24 $\pm$ 159,91 ⁺⁺	0,54 $\pm$ 0,09 ^{***a}	0,21 $\pm$ 0,04 ^{***}
léčená (20 mg/kg morinu)	266,91 $\pm$ 15,32 ^{***}	1259,25 $\pm$ 156,52 ⁺⁺	0,51 $\pm$ 0,02 ^{***}	0,88 $\pm$ 0,36 ^{***}
placebo skupina	70,39 $\pm$ 2,79	1329,00 $\pm$ 91,41 ^{●●}	0,41 $\pm$ 0,04	17,17 $\pm$ 1,12 ^{●●}
intaktní skupina	67,37 $\pm$ 3,97	1509,38 $\pm$ 147,93	0,43 $\pm$ 0,03	1,89 $\pm$ 0,16

Vysvětlivky k tabulkám 1–3:

* $p \leq 0,05$ léčená vs placebo skupina+ $p \leq 0,05$ léčená vs intaktní skupina● $p \leq 0,05$ placebo vs intaktní skupina** $p \leq 0,01$ léčená vs placebo skupina++ $p \leq 0,01$ léčená vs intaktní skupina●● $p \leq 0,01$ placebo vs intaktní skupina

ho glomerulu – 3. Ojedinelé extravazáty s dilatací a překrváním cév v koře byly hodnoceny – 1.

3. oblast – vlastní kanálky ledvin

Zde byla hodnocena přítomnost regresivních změn epitelii od edému po nekrózu (3 – v případě nekrózy, 2 – v případě regrese epitelii nedosahující stupně nekrózy a bíkovinného obsahu s hyalinnými válci v kanálcích, 1 – v případě edému epitelii).

4. *Zánětlivý infiltrát* byl hodnocen značkou Z, eventuálně doplňujícím popisem.

VÝSLEDKY

Krev

Byl zjištěn statisticky vysoce významný nárůst hodnot SOD ($p \leq 0,01$) u skupin léčených morinem v dávkách 5, 10 a 20 mg/kg ve srovnání s placebo skupinou 15. den experimentu a rovněž ve srovnání s intaktní skupinou zvířat. Vzájemným porovnáním hodnot SOD získaných od skupin zvířat léčených různými dávkami morinu nebyl zjištěn signifikantní rozdíl 15. den experimentu, porovnáním hodnot SOD získaných od placebo skupiny a intaktní skupiny zvířat signifikantní rozdíl rovněž zjištěn nebyl (tab. 1).

Nebyly zjištěny signifikantní změny hodnot GSHPx u skupin léčených morinem v dávkách 5, 10 a 20 mg/kg ve srovnání s placebo skupinou 15. den experimentu, statisticky vysoce významný pokles v hodnotách GSHPx ($p < 0,01$) byl zjištěn u skupiny léčené morinem v dávce 5, 10 a 20 mg/kg ve srovnání s intaktní skupinou zvířat. Vzá-

jemným porovnáním hodnot GSHPx získaných od skupin zvířat léčených různými dávkami morinu nebyl zjištěn signifikantní rozdíl, porovnáním hodnot GSHPx získaných od placebo skupiny a intaktní skupiny zvířat byl zjištěn signifikantní pokles ($p \leq 0,01$) u placebo skupiny 15. den experimentu (tab. 1).

Byl zjištěn statisticky vysoce významný nárůst hodnot AOC ($p \leq 0,01$) u skupin léčených morinem v dávkách 5, 10 a 20 mg/kg ve srovnání s placebo skupinou 15. den experimentu a rovněž s intaktní skupinou zvířat. Vzájemným porovnáním hodnot AOC získaných od skupin zvířat léčených různými dávkami morinu nebyl zjištěn signifikantní rozdíl, porovnáním hodnot AOC získaných od placebo skupiny a intaktní skupiny zvířat nebyl zjištěn signifikantní rozdíl 15. den experimentu (tab. 1).

Byl zjištěn statisticky vysoce významný pokles hodnot MDA ($p \leq 0,01$) u skupin léčených morinem v dávkách 5, 10 a 20 mg/kg ve srovnání s placebo skupinou 15. den experimentu a dále vysoce významný rozdíl v hodnotách MDA ($p \leq 0,01$) u skupin léčených morinem v dávkách 5, 10 a 20 mg/kg ve srovnání s intaktní skupinou zvířat. Vzájemným porovnáním hodnot MDA získaných od skupin zvířat léčených dávkou morinu 5 a 20 mg/kg a dále dávkou 10 a 20 mg/kg byl zjištěn signifikantní rozdíl ($p \leq 0,01$) 15. den experimentu, porovnáním hodnot získaných od placebo a intaktní skupiny zvířat byl zjištěn signifikantní vzestup ($p \leq 0,01$) hodnoty MDA u placebo skupiny, což vyplývá z navození patologického stavu (tab. 1).

Byl zjištěn statisticky vysoce významný vzestup hodnot kreatininu ($p \leq 0,01$) u skupiny léčené morinem v dávce 10 mg/kg ve srovnání s placebo skupinou 15. den experimentu, statisticky vysoce významný rozdíl hodnot kreati-

Tab. 2. Hodnoty sledovaných laboratorních parametrů v krvi vyjádřené jako $X \pm SD$

Skupina zvířat (n=10)	kreatinin (μ mol/l)	urea (mmol/l)	kyselina močová (μ mol/l)
léčená (5 mg/kg morinu)	45,63 $\pm$ 3,46 ⁺	7,75 $\pm$ 1,26 ⁺	18,94 $\pm$ 6,75
léčená (10 mg/kg morinu)	49,98 $\pm$ 2,86 ^{***}	8,30 $\pm$ 0,67 ^{***}	16,03 $\pm$ 2,04
léčená (20 mg/kg morinu)	45,11 $\pm$ 2,46 ⁺	7,97 $\pm$ 1,12 ⁺⁺	32,67 $\pm$ 13,87 ⁺
placebo skupina	44,83 $\pm$ 1,78 ^{●●}	7,21 $\pm$ 0,56 ^{●●}	18,91 $\pm$ 5,64
intaktní skupina	42,00 $\pm$ 1,94	6,35 $\pm$ 0,25	18,68 $\pm$ 4,00

Vysvětlivky k tabulkám 1–3:

* $p \leq 0,05$ léčená vs placebo skupina+ $p \leq 0,05$ léčená vs intaktní skupina● $p \leq 0,05$ placebo vs intaktní skupina** $p \leq 0,01$ léčená vs placebo skupina++ $p \leq 0,01$ léčená vs intaktní skupina●● $p \leq 0,01$ placebo vs intaktní skupina

ninu ($p \leq 0,01$) u skupiny léčené morinem v dávce 10 mg/kg ve srovnání s intaktní skupinou zvířat a dále statisticky významný rozdíl hodnot kreatininu ($p \leq 0,05$) u skupiny léčené morinem v dávce 5 a 10 mg/kg ve srovnání s čistou skupinou zvířat. Vzájemným porovnáním hodnot kreatininu, získaných 15. den experimentu, od skupin zvířat léčených dávkami morinu 5 a 10 mg/kg, byl zjištěn signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) a dále dávkami 10 a 20 mg/kg byl zjištěn signifikantní rozdíl ($p \leq 0,01$). Vzájemným porovnáním hodnot kreatininu získaných od placebo skupiny a intaktní skupiny zvířat byl zjištěn signifikantní vzestup u placebo skupiny ($p \leq 0,01$) 15. den experimentu (tab. 2).

Vzájemným statistickým porovnáním hodnot urey u skupiny léčené morinem v dávce 10 mg/kg ve srovnání s placebo skupinou byl zjištěn signifikantní vzestup hodnoty u léčené skupiny ($p \leq 0,01$) 15. den experimentu a vysoce významný rozdíl hodnoty urey ($p \leq 0,01$) u skupiny léčené morinem v dávce 10 mg/kg a signifikantní rozdíl v dávce 5 mg/kg ($p \leq 0,05$) ve srovnání s intaktní skupinou zvířat. Vzájemným porovnáním hodnot urey získaných od skupin zvířat léčených různými dávkami morinu signifikantní rozdíl zjištěn nebyl. Vzájemným porovnáním hodnot urey získaných od placebo skupiny a intaktní skupiny zvířat byl zjištěn signifikantní vzestup u placebo skupiny ($p \leq 0,01$) 15. den experimentu (tab. 2).

Statisticky významný vzestup hodnoty kyseliny močové ($p \leq 0,05$) byl zjištěn u skupiny léčené morinem v dávce 20 mg/kg ve srovnání s placebo skupinou 15. den experimentu a významný vzestup hodnot kyseliny močové ($p \leq 0,05$) u skupiny léčené morinem v dávce 20 mg/kg ve srovnání s intaktní skupinou zvířat. Vzájemným porovnáním hodnot kyseliny močové získaných od skupin zvířat léčených dávkami morinu 5 a 20 mg/kg byl zjištěn signifikantní rozdíl ($p \leq 0,05$) a dále léčených dávkami 10 a 20 mg/kg byl zjištěn signifikantní rozdíl ($p \leq 0,01$) 15. den experimentu. Porovnáním hodnot kyseliny močové získaných od placebo skupiny a intaktní skupiny signifikantní rozdíl zvířat zjištěn nebyl (tab. 2).

Moč

Byl zjištěn výrazný pokles odpadů kreatininu za 24 hodin u všech skupin léčených morinem v dávkách 5, 10 a 20 mg/kg ve srovnání s placebo skupinou 15. den experimentu. U placebo skupiny byl zaznamenán nárůst odpadů sledovaného parametru ve srovnání s intaktní skupinou zvířat 15. den experimentu (tab. 3).

Rovněž odpady urey vykázaly výrazný pokles za 24 hodin u všech skupin léčených morinem v dávkách 5, 10 a 20 mg/kg ve srovnání s placebo skupinou 15. den experimentu. U placebo skupiny byl zaznamenán nárůst odpadů sledovaného parametru ve srovnání s intaktní skupinou zvířat 15. den experimentu (tab. 3).

U odpadů celkové bílkoviny za 24 hodin byl zaznamenán pokles u skupin léčených morinem v dávkách 5 a 20 mg/kg 15. den experimentu. U placebo skupiny byl zaznamenán nárůst odpadů sledovaného parametru ve srovnání s intaktní skupinou zvířat 15. den experimentu (tab. 3).

Vzájemným statistickým porovnáním hodnot diurézy u skupin léčených morinem v různých dávkách ve srovnání s placebo skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl 15. den experimentu. Dále byly zjištěny statisticky významně nižší hodnoty diurézy ($p \leq 0,01$) u skupin léčených různými dávkami morinu ve srovnání s intaktní skupinou zvířat. Vzájemným porovnáním hodnot diurézy získaných od skupin zvířat léčených různými dávkami morinu signifikantní rozdíl zjištěn nebyl. Vzájemným porovnáním hodnot diurézy získaných od placebo skupiny a intaktní skupiny zvířat byl zjištěn signifikantní pokles u placebo skupiny ($p \leq 0,01$) 15. den experimentu.

Výsledky histopatologického vyšetření

Při tomto způsobu medikace morinem jednoznačně převládaly zánětlivé změny nad regresí a destrukcí parenchymu. Ve dřeni nebylo prakticky zachyceno těžké destruktivní krvácení (+++ – hemoragická zóna) a v kanálcích nekroza epitelů a hyalinní válce v lumen.

Zánětlivý infiltrát byl vždy smíšeného charakteru a vyskytoval se i v kanálcích (zde byly nalezeny rovněž polynukleáry).

Konkrétní výsledky podávané medikace – skupiny léčené:

Nejmenší alterace parenchymu byla při medikaci morinem v dávce 20 mg/kg. Pouze v topice kanálků dosáhla lepšího průměrného skupinového skóre koncentrace 10 mg/kg.

Placebo skupina

V placebové skupině se vyskytly změny charakteristické pro ischemii se skóre v rozmezí od 2 do 5,5 s průměrem 4,25. Poměrně častá byla i přítomnost zánětlivého infiltrátu s příměsí polynukleárů (v 67 %).

Tab. 3. Odpady sledovaných laboratorních parametrů v moči za 24 hodin vyjádřené jako $\bar{X} \pm SD$

Skupina zvířat (n=10)	kreatinin (μmol)	urea (mmol)	celková bílkovina (g)	diuréza/24 hodin (ml)
léčená (5 mg/kg morinu)	45,80±10,19	6,74±1,87	0,020±0,014	30,98±11,47 ⁺⁺
léčená (10 mg/kg morinu)	47,78±9,03	6,5±1,83	0,023±0,009	28,60±8,94 ⁺⁺
léčená (20 mg/kg morinu)	39,96±14,16	5,85±1,32	0,017±0,005	24,24±13,20 ⁺⁺
placebo skupina	57,91±25,83	7,28±3,72	0,022±0,009	19,63±10,75 ^{●●}
intaktní skupina	49,59±15,64	5,98±1,74	0,014±0,003	50,16±10,44

Vysvětlivky k tabulkám 1–3:

* $p \leq 0,05$ léčená vs placebo skupina

+ $p \leq 0,05$ léčená vs intaktní skupina

● $p \leq 0,05$ placebo vs intaktní skupina

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

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

●● $p \leq 0,01$ placebo vs intaktní skupina

Čistá kontrola

Hemoragie jen nahodile nejspíše způsobené zhmožděním.

Shrnutí výsledků biochemického a histopatologického vyšetření

Biochemickým vyšetřením vzorků krve nebyla jednoznačně prokázána závislost účinku morinu na aplikované dávce v 15. dnu experimentu. Zřetelný efekt po podání morinu byl prokázán ve vzestupu hodnot SOD a AOC v krvi a poklesu GSHPx a MDA v krvi.

Odpady kreatininu, kyseliny močové a urey v moči za 24 hodin nebyly při vzájemném porovnání signifikantní, téměř u všech sledovaných parametrů však došlo k jejich výraznému poklesu u léčených skupin ve srovnání s placebo skupinou.

Výsledky biochemického vyšetření krve i moče korelují s histopatologickými obrazy ledvinové tkáně a podporují domněnku o terapeutickém efektu morinu za podmínek umělé navozeného patologického stavu – ischemie – reperfuze ledvinové tkáně.

DISKUZE

Akutní ischemické poškození ledvin je poměrně častým klinickým syndromem s vysokou morbiditou a mortalitou¹⁵⁾. Reperfuze, která bezprostředně následuje, vyvolává komplex buněčných změn, které vyústí v poškození nebo vedou ke smrti renálních buněk¹⁶⁾. Molekulární mechanismy tohoto poškození nejsou přesně objasněné, je však známo několik faktorů (deplece ATP, působení reaktivních forem kyslíku, aktivace fosfolipázy A₂, infiltrace neutrofilů, účast vasoaktivních peptidů aj.), které se spolupodílí na patogenezi renálního poškození¹⁷⁾.

Mezi různými kyslíkovými radikály, generovanými v patologických procesech, které způsobují nebo doprovází ischemicko-reperfuze poškození ledvin hraje klíčovou roli O²·, který sice nemá sám o sobě největší toxicitu, ale jako iniciátor tvorby dalších aktivních radikálů se výrazně podílí na následně probíhajících patologických změnách. Dalším z faktorů, které se významně podílí na ischemicko-reperfuze poškození ledvinové tkáně, je kumulace Ca²⁺ iontů intracelulárně. Ačkoliv fyziologické a patofyziologické mechanismy jeho vlivu nejsou zcela jasné, je evidentní, že vzestup cytosolického Ca²⁺ vede k nekróze buněk, která doprovází akutní ischemické poškození ledvin¹⁵⁾. Zvýšená koncentrace Ca²⁺ iontů intracelulárně hraje důležitou úlohu v ischemicko-reperfuze poškození dalších orgánů – např. srdce¹⁸⁾, mozku¹⁹⁾ aj.

Dalším faktorem, který se spolupodílí na výsledném obrazu ischemicko-reperfuze poškození ledvinové tkáně, je pokles cirkulujících neutrofilů, který vede k dysfunkci mikrovaskulárních a parenchymálních buněk.

Aktivované polymorfonukleáry mohou způsobit poškození ledvin 3 způsoby: produkcí volných radikálů během respiračního vzplanutí, uvolněním enzymů anebo přímo

obstrukcí kapilár. Morfologické studie ukazují, že zvýšení kapilární permeability, edém tkáně a přesun tekutin je uskutečňován v čase reperfuze spíše než v ischemické periodě. Reperfuze perioda je spojena se vznikem celé řady změn, které zahrnují aktivaci leukocytů a tvorbu reaktivních zánětlivých komponent²⁰⁾.

Morin je originální látkou, která byla zatím zcela ojediněle použita pro testování *in vivo* na patologických bio-modelech. V naší studii byl sledován antioxidační efekt morinu v rámci terapeutického podávání v podmínkách ischemie-reperfuze ledvin u laboratorního potkana.

Byl zaznamenán signifikantní nárůst hodnot SOD u skupin léčených morinem v příslušných dávkách, ve srovnání s placebo skupinou a rovněž ve srovnání s intaktní skupinou zvířat. U GSHPx byl zjištěn pokles hodnot u skupin léčených ve srovnání s placebo i s intaktní skupinou zvířat. Statisticky významně vyšší hladiny SOD, zjištěné u skupin léčených, svědčí pro připravenost k likvidaci superoxidů, odstraňování peroxidu vodíku a jiných volných radikálů působících poškození ledvinové tkáně po reperfuzi. Předpokládáme, že jde o výsledek předchozí preventivní suplementace zvířat této skupiny látkou s prokázaným antioxidačním účinkem *in vitro*. Vyšetřované enzymy působí intracelulárně a jejich aktivita na sebe většinou navazuje. Je možno předpokládat, že jejich aktivita se může měnit dle stavu organismu, nebo v souvislosti s probíhajícími patologickými procesy. Výsledky testování ukazují, že vzájemné kompenzační mechanismy tvořené souhrou působení více enzymů mohou být potencovány přítomností podávaných antioxidantů.

Názory jednotlivých autorů na změnu aktivity SOD a GSHPx vlivem klesající funkce ledvin se velmi odlišují. Literární odkazy hovoří jak o vzestupu aktivity SOD i GSHPx²¹⁾ v závislosti na klesající funkci ledvin, tak i o nálezů aktivity SOD a GSHPx snížené²²⁾ a rovněž normální²³⁾. Pro lepší posouzení dané problematiky by bylo vhodné stanovit u pokusných zvířat aktivitu katalasy v erytrocytech, která bývá snížena u pacientů s klesající funkcí ledvin²³⁾, a hladinu selenu, jež má antioxidační účinky, je součástí GSHPx a jehož deficit bývá u pacientů s klesající funkcí ledvin pravidelným nálezem²⁴⁾.

Statisticky vysoce významné zvýšení hodnot AOC u skupin zvířat léčených bylo zaznamenáno v porovnání s hodnotami placebo a intaktní skupinou zvířat. Jde o signifikantní rozdíl a lze předpokládat, že jde opět o logický výsledek předchozí suplementace látkou s antioxidačním efektem, který byl vyvolán již nejnižší dávkou testované látky. Názory autorů na změny AOC vlivem případné klesající funkce ledvin se odlišují^{25–27)}.

Výsledky statistického porovnání hodnot MDA vykazují signifikantní změny na hladině statistické významnosti ($p \leq 0,01$), u skupin léčených zvířat byla ve srovnání s placebo skupinou nalezena signifikantně nižší průměrná hodnota tohoto vedlejšího toxického produktu lipoperoxidace. Při srovnání výsledků prováděných studií se řada autorů v literatuře shoduje na zvýšené koncentraci MDA v plazmě či v erytrocytech²²⁾ u pacientů s klesající funkcí ledvin; příčinou však může být nejen jeho zvýšená tvorba z lipidových peroxidů, ale i jeho snížená renální eliminace²⁵⁾. MDA může dále modifikovat bílkoviny a vést k podobným změnám, jaké pozorujeme při jejich glykaci^{25, 28)}.

Hodnoty funkčních ukazatelů ledvinné funkce byly sledovány v krvi a v moči. Vzestup hladiny kreatininu, urey a změny hodnot kyseliny močové byly zjištěny u zvířat placebo skupiny v porovnání s hodnotami skupiny intaktní. Zřetelně tak dokumentují stav akutního renálního poškození a jsou výsledkem homeostatické dysbalance. U skupin zvířat léčených došlo po 15denní medikaci látkou s prokázaným antioxidačním účinkem k signifikantním změnám vybraných biochemických ukazatelů sledovaných v krvi v porovnání se skupinou placebo. V podobné preklinické studii²⁹⁾ trvala reperfuze perioda pouze 24 hodin a byly zjištěny vysoké hodnoty sledovaných parametrů ledvinné funkce i u skupin léčených zvířat v porovnání s placebo skupinou na konci experimentu.

Odpady biochemických ukazatelů sledovaných v moči (kreatinin, urea, celková bílkovina) ukazují výrazné rozdíly ve srovnání s placebo skupinou. Pozitivní vliv morinu byl zaznamenán ve vzestupu denní diurézy u skupin zvířat léčených ve srovnání s placebo skupinou.

Výsledky histopatologického vyšetření ukazují na výrazný protektivní efekt testované látky, což je dokumentováno u zvířat skupin léčených v porovnání s placebo skupinou. U zvířat placebo skupiny byla ve všech vzorcích pozorována masivní hemoragie v intersticiu, zejména na hranici kory a dřene, hemoragie v oblasti glomerulů (Bowmannovo pouzdro i kapilární klička) i ve dřeni. Kanálky měly regresivně změněné epitelie od prostého edému až k nekroze epitelii se všemi výše popsanými znaky. V luminu se vyskytoval většinou bílkovinný obsah s tvorbou hyalinních válců. Doprovodný edém a obecně zvýšená celularita glomerulu – zánětlivě reaktivní. Vlastní výraznější zánětlivý infiltrát byl poměrně častým nálezem u této skupiny.

O pozitivním efektu podávání antioxidantů za stavů spojených s ischemií a následnou reperfuzí ledvinné tkáně, ve vztahu ke zlepšení hodnot ukazatelů antioxidačního systému, se hovoří i v dalších publikacích²⁹⁻³²⁾.

Studie ukazuje na potenciální protektivní efekt morinu v podmínkách terapie ischemicko-reperfuze poškození ledviny u laboratorního potkana. Domněnku podporují i výsledky hodnocení histopatologických nálezů vyšetřovaných ledvinných preparátů.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR – NL/7455-3.

LITERATURA

1. Calomme, M., Pieters, L., Vlietinck, A., Vanden Berghe, D.: *Planta Med.*, 1996; 62, 222-226.
2. Read, M. A.: *Am. J. Pathol.*, 1995; 147, 235-237.
3. Perez, R. M., Zaval, M. A., Perez, S., Perez, C.: *Phyto-med.*, 1998; 5, 55-57.

4. Yamamura, S., Ozawa, K., Ohtani, K. et al.: *Phytochem.*, 1998; 48, 131-136.
5. Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1994; 116, 4846-4851.
6. RiceEvans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G. et al.: *Free Rad. Res.*, 1995; 22, 375-383.
7. Kubínová, R., Suchý, V.: *Čes. slov. Farm.*, 1999; 48, 9-14.
8. Catapano, A. L.: *Angiology*, 1997; 48, 39-44.
9. Urquiaga, I., Leighton, F.: *Biol. Res.*, 2000; 33, 55-64.
10. Zhong, Z., Connor, H. D., Froh, M. et al.: *Free Radic. Biol. Med.*, 2004; 36, 1248-1258.
11. Aherne, S. A., O'Brien, N. M.: *Nutrition*, 2002; 18, 75-81.
12. Bartošíková, L., Nečas, J., Suchý, V. et al.: *Acta Vet.*, 2003a; 72, 191-200.
13. Bartošíková, L., Nečas, J., Suchý, V. et al.: *Acta Vet.*, 2003b; 72, 87-94.
14. Uchiyama, M., Mihara, M.: *Anal. Biochem.*, 1978; 3, 271-278.
15. Ogata, M., Iwamoto, T., Tazawa, N. et al.: *Eur. J. Pharmacol.*, 2003; 478, 187-198.
16. Lieberthal, W., Levine, J. S.: *Am. J. Physiol.*, 1996; 271, F 477-488.
17. Edelstein, C. L., Ling, H., Schrier, R. W.: *Kidney Int.*, 1997; 51, 1341-1351.
18. Tani, M., Neely, J. R.: *Circ. Res.*, 1989; 65, 1045-1056.
19. Kuro, T., Kobayashi, Y., Takaoka, M., Matsumura, Y.: *Jpn. J. Pharmacol.*, 1999; 81, 247-251.
20. Carattino, M. D., Cueva, F., Zuccollo, A. et al.: *Immunopharmacol.*, 1999; 43, 241-248.
21. MimicOka, J., Simic, T., Ekmescic, V., Dragicevic, P.: *Clin. Nephrol.*, 1995; 44, 44-48.
22. Racek, J., Veselá, E., Holeček, V., Treska, V.: The significance of free radicals in patients with renal failure and during kidney transplantation. *Klin. Biochem. Metab.*, 1995; 24suppl, 4-6.
23. Durak, I., Akyol, O., Baseme, E. et al.: *Nephron*, 1994; 66, 76-80.
24. Bonomini, M., Albertazzi, A.: *Artif Organs*, 1995; 19, 443-448.
25. Racek, J., Eiselt, J., Holeček, V. et al.: *Klin. Biochem. Metab.*, 1997; 26, 92-97.
26. Toborek, M., Wasik, L., Drozd, M. et al.: *Metabolism Clin. Exp.*, 1992; 41, 1299-1232.
27. Jackson, P., Loughrey, C. M., Lightbody, J. H. et al.: *Clin. Chem.*, 1995; 41, 1135-1138.
28. Roselaar, S. E., Naznat, N. B., Winyard, P. G. et al.: *Kidney Int.*, 1995; 48, 199-206.
29. Singh, D., Chopra, K.: *Pharmacol. Res.*, 2004; 50, 187-193.
30. Lee, P. H., Chung, Y. C., Hu, R. H. et al.: *Transpl. Proc.*, 1992; 24, 1353-1354.
31. Zurovsky, Y., Eligal, Z., Grossman, S.: *Exp. Toxic. Path.*, 1995; 47, 471-478.
32. Kollár, P., Kotolová, H.: Biologické účinky resveratrolu a dalších obsahových látek vína. *Čes. slov. Farm.*, 2003; 52, 272-281.

Došlo 25. 11. 2005.

Přijato ke zveřejnění 2. 1. 2006.

MUDr. PharmDr. Lenka Bartošíková, Ph.D.
Palackého 1-3, 612 42 Brno
e-mail: bartosikoval@vfu.cz