Farmacie 4-07 30.8.2007 14:35 Str. 200
proLékaře.cz | 5.4.2025

Testování antidiabetického a antioxidačního účinku flavonoidu osajinu v experimentu

FRÁŇOVÁ J.[1], PAVLÍK M.[2]
[1]Fakultní nemocnice Brno, Dětská nemocnice, II. dětská klinika
[2]Fakultní nemocnice U svaté Anny v Brně, anesteziologicko–resuscitační klinika

Došlo: 13. dubna 2007 / Přijato: 16. května 2007

SOUHRN

Testování antidiabetického a antioxidačního účinku flavonoidu osajinu v experimentu
Záměrem pilotní studie bylo sledovat antidiabetický a antioxidační efekt osajinu u alloxanového diabetu v experimentu in vivo. Zvířata byla metodou náhodného výběru rozdělena do 2 skupin (n=7). Skupině léčené byl podáván osajin v dávce 10 mg/kg v 0,5% roztoku Avicelu perorálně 1× denně, skupině placebo byl podáván pouze roztok Avicelu. Poslední skupina byla intaktní (bez zákroku a bez medikace). U zvířat 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 vzestup ($p \leq 0{,}05$) katalytické aktivity glutathionparoxidasy a celkové antioxidační kapacity ($p \leq 0{,}01$) u léčené skupiny ve srovnání se skupinou placebo. Dále byl zjištěn statisticky významný pokles hladiny malondialdehydu ($p \leq 0{,}01$) u léčené skupiny ve srovnání se skupinou placebo. Superoxiddismutasa nevykázala signifikantní změny. Byl zjištěn statisticky vysoce významný pokles ($p \leq 0{,}01$) diurézy, glykosurie a ztrát bílkovin močí u léčené skupiny ve srovnání se skupinou placebo. Hodnoty cholesterolu a urey vykázaly nesignifikantní změny. Výsledky biochemického vyšetření ukazují na antidiabetický a antioxidační efekt osajinu. Histopatologické nálezy s těmito výsledky korelují pouze částečně.
Klíčová slova: osajin – diabetes mellitus – antioxidanty

Čes. slov. Farm., 2007; 56, 200–204

SUMMARY

Testing of antidiabetic and antioxidative effect of the flavonoid osajin in an experiment
The antidiabetic and antioxidative effect of osajin was monitored under the conditions of alloxan-induced diabetes mellitus in an in vivo experiment. The animals were divided by random selection into 2 groups (n=7). The treated group was administered osajin in peroral doses of 10 mg/kg in Avicel, the placebo diabetic group was given only the 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 in all animals. Kidney tissue and pancreas samples were taken for histopathological analysis. The findings included a statistically significant increase ($p \leq 0.05$) in the glutathione peroxidase catalytic activity, total antioxidative capacity ($p \leq 0.01$) and a statistically significant decrease ($p \leq 0.01$) on malondialdehyde level in the treated group compared to the placebo group. A statistically highly significant decrease ($p \leq 0.01$) in diuresis, glucose 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 antidiabetic and antioxidative effect of osajin. The results of histopathological examination correlate with them only partially.
Key words: osajin – diabetes mellitus – antioxidants

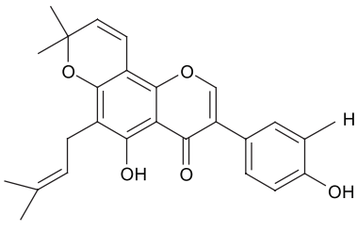
Čes. slov. Farm., 2007; 56, 200–204 *Má*

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Jana Fráňová
II. dětská klinika FN
Úprkova 4, 621 00 Brno
e-mail: dzurka@email.cz

Farmacie 4-07 30.8.2007 14:35 Str. 201
proLékaře.cz | 5.4.2025

Úvod

Diabetes mellitus představuje v současné době závažný medicínský problém, a to především v rozvinutých společnostech. Jeho incidence vzrostla za posledních 20 let dvojnásobně a v České republice postihuje 6,5 % populace [1]. Dle současných názorů hraje významnou roli v etiopatogenezi diabetu 1. i 2. typu oxidační stres, který má klíčový význam rovněž pro vznik a rozvoj diabetických komplikací. Velmi často se u experimentálních zvířat navozuje modelový patologický stav pomocí alloxanu [2–4], který selektivně toxicky poškozuje ß 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 ß buněk, při které dojde k uvolnění intracelulárních zásob insulinu a vznikne krátkodobá hypoglykémie. Po několika dnech se pak u zvířat objeví insulinopenie s klasickými příznaky diabetu: hyperglykémie, glykosurie, polydipsie a polyurie. Toxicita alloxanu *in vitro* a *in vivo* může být inhibována cheláty, zhášeči hydroxylových radikálů a antioxidanty rozpustnými v tucích [2, 5].



$C_{25}H_{24}O5$, Mr = 404

Obr. 1. Struktura osajinu

V organizmu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku a dusíku (ROS). Jejich patologický nárůst se výrazně podílí na vzniku a rozvoji řady onemocnění. Na regulaci fyziologického množství volných radikálů má organizmus vyvinuté antioxidační mechanizmy tvořené přirozenými antioxidanty a enzymy (např. superoxiddismutasa, katalasa, redoxní systém glutathionu, látky s chelátově vázanými ionty železa a mědi aj.). Náprava oxidativního poškození organizmu je však obtížná. Mnohem efektivnější je cesta preventivní, spočívající v minimalizování zdrojů tvorby volných radikálů a posílení přirozeného antioxidačního mechanizmu podáváním látek, které působí jako antioxidanty, nebo tzv. zhášeče volných radikálů. Proto při experimentálním 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 [6–11].

Osajin, izolovaný z plodenství rostlin *Maclura pomifera* (RAFINESQUE) Moraceae, patří do skupiny prenylovaných flavonoidů (obr. 1). Antioxidační působení osajinu 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 [12].

Cílem práce bylo sledovat antidiabetický a antioxidační efekt osajinu 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.

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 (310±12 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±4 mmol/l. Metodou náhodného výběru byla zvířata rozdělena do 2 skupin (n=7). Skupině léčené byl podáván osajin v dávce 10 mg/kg perorálně gastrickou sondou v 0,5% roztoku Avicelu 1× denně. Placebo skupině byl podáván pouze 0,5% roztok Avicelu v množství 2 ml, rovněž perorálně gastrickou sondou 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, antioxidační enzymy (superoxiddismutasa, glutathionperoxidasa) a celková antioxidačí kapacita na automatickém analyzátoru Cobas Mira S, pomocí testovacích setů firmy Randox, Dublin. Rovněž byla jednorázově na konci experimentu stanovena hladina malondialdehydu v séru spekrofotometricky metodou Tvare [13]. Dále byla stanovena diuréza a celkové ztráty glukosy (glykosurie) a bílkovin močí spektrofotometricky za pomoci laboratorních testovacích souprav Diagnostika Lachema.

Po ukončení medikace 20. den byla zvířata utracena exsanquinací a byly odebrány vzorky ledvinné 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.

proLékaře.cz | 5.4.2025

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

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	9,12±0,93**	20,35±0,45	4,92±0,72

** p≤0,01 léčená vs. placebo

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).

Skupina intaktní nevykázala v průběhu experimentu statisticky významné změny.

Hodnoty superoxiddismutasy vykázaly nesignifikantní změny při porovnání hodnot skupiny léčené a placebo na konci terapie (v průběhu terapie nedošlo ke změně hodnoty naměřených hladin) (tab. 2).

Byl zjištěn statisticky významný rozdíl (p≤0,05) hladiny glutathionperoxidasy u skupiny léčené, na konci terapie, ve srovnání se skupinou placebo (tab. 2).

Byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl (p≤0,01) hodnot celkové antioxidační kapacity u skupiny léčené, na konci terapie, ve srovnání se skupinou kontrolní (tab. 2).

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

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

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	202,10±5,64	1193,20±78,40 *	0,94±0,05 **	1,28±0,49 **
placebo skupina	198,05±3,59	1061,20±94,06	0,77±0,03	3,68±0,33
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

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	16,50±0,25	2,17±0,45	0,93±0,37
placebo skupina	29,65±2,40 **	4,19±0,53 **	1,66±0,35 **
intaktní skupina	12,45±0,45	1,13±0,54	0,43±0,16

** 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	1,85±0,34	7,57±1,51
placebo skupina	1,89±0,36	7,61±1,04
intaktní skupina	1,95±0,32	5,95±1,01

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

Mírné edematózní prosáknutí parenchymu a mírné překrvení jako projev dřeňových změn ve 30 % případů. Změny glomerulů ve smyslu jejich zvýšené buněčnosti způsobené přítomností erytrocytů a zmnožením mesangia byly pozorovány zhruba ve 20 % případů. Cévní změny v obou sledovaných skupinách, spočívající v mírném ztluštění stěny cév středního a malého kalibru, se daly najít ve 30 % případů.

Histologické změny jsou hodnoceny jako minimální a nesignifikantní.

Skupina placebo

Ve dřeni byly patrny pouze fokálně vakuolární dege-

proLékaře.cz | 5.4.2025

nerace epitelií proximálních tubulů s jejich mírným překrvením téměř v 80 % případů. V koře byly sledovatelné jednak změny glomerulů a jednak změny cévní. 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 jak ve složce zevně i vnitřně sekretorické bez fibrózy a infiltrace.

Skupina placebo

Mírná variace co do velikosti i počtu ostrůvků, ojediněle 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 vs. tělo pankreatu).

Skupina intaktní

Normální stavba.

DISKUZE

Diabetes mellitus je charakterizován zvýšenou glykémií 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 metabolizmu sacharidů, často se projeví i jako porucha v metabolizmu proteinů, jindy jako porucha metabolizmu lipidů, jejíž patogeneze je však složitější [14, 15].

Zvýšení hladiny glukosy v séru, stanovené na začátku experimentu, a její monitorování 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 vykázaly při statistickém vyhodnocování signifikantní změny při vzájemném porovnání hodnot léčené a placebo skupiny.

V rámci experimentu bylo zjištěno zlepšení hodnot ukazatelů antioxidačního systému, zejména 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 navazuje [12]. Je možno předpokládat, že jejich aktivita se může měnit dle stavu organizmu, nebo v souvislosti s probíhajícími patologickými procesy. Výsledky testování ukazují, že vzájemné kompenzační mechanizmy tvořené souhrou působení více enzymů mohou být potencovány přítomností podávaných antioxidantů.

Statisticky významně vyšší hodnota celkové antioxidační kapacity u léčené skupiny, která se uplatňuje extracelulárně, je zřejmě důsledkem suplementace látkou s prokázaným antioxidačním účinkem *in vitro*. Celková antioxidační kapacita není zcela specifickým ukazatelem. Vzhledem k tomu, že jde vlastně o sumu efektu několika antioxidačních mechanizmů, měli bychom vždy pátrat po hlavní antioxidační složce vzorku [16]. Určitou hypotézou zvýšené AOC je možnost vyplavování antioxidantů z jater a tukových dep jako odpověď na vysokou hladinu ROS v oběhu. K tomuto efektu ale dochází spíše u dlouhodobé produkce volných radikálů. Je také možné, že v různých situacích není organizmus schopen likvidovat určitý typ volného radikálu stávajícím spektrem antioxidantů, a proto zvyšuje produkci ostatních ve snaze likvidovat ho. AOC stoupá, ale nemusí nutně docházet k poklesu ROS [16].

Výsledky statistického porovnání hodnot MDA obou skupin (léčené a placebo) ukazují signifikantní změny, u skupiny léčené byla nalezena statisticky významně nižší průměrná hodnota ve srovnání se skupinou placebo na konci terapie. MDA je vedlejší toxický produkt lipoperoxidace, a proto jeho hladina celkem jasně koreluje s intenzitou působení ROS na lipidové molekuly, a tím i mírou oxidačního poškození organizmu. Metodou TBARs za spektrofotometrického stanovení nelze dosáhnout zcela specifického výsledku. S kyselinou thiobarbiturovou reagují sacharidy, glukosa, pyrimidiny, hemoglobin, bilirubin, biliverdin, aminokyseliny, močovina, kreatinin, kyselina močová, kyselina sialová a další látky; produkty této reakce absorbují při 530–535 nm, což snižuje specificitu TBA reakce. Část těchto interferujících látek odstraníme okyselením a dalšími úpravami. Interferující produkty však nejlépe odstraní HPLC [17]. Přesto se dá konstatovat, že pro naše účely dostačuje spektrofotometrické měření, protože významný je především rozdíl nalezených hladin MDA u léčené a placebo skupiny.

Hladina cholesterolu byla v rámci experimentu monitorována jako doprovodný biochemický parametr a zároveň jako jeden z ukazatelů stavu tukového metabolizmu za daného uměle navozeného patologického stavu u laboratorního potkana. Hodnoty cholesterolu vykázaly v průběhu experimentu nesignifikantní změny.

Farmacie 4-07 30.8.2007 14:35 Str. 204
proLékaře.cz | 5.4.2025

U pacientů s déletrvajícím diabetem a zvláště u tzv. dekompenzovaných diabetiků se setkáváme s výskytem chronických komplikací specifických a nespecifických [18]. 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 popsána v roce 1936 Kimmelstielem a Wilsonem jako interkapilární nodulární glomerulosklerózа. V užším smyslu slova diabetickou nefropatií rozumíme mikroangiopatické postižení 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 trvajícího neléčeného onemocnění je za určitých okolností možno prokázat postižení charakteru diabetické nefrosy, která se mikroskopicky projevuje kalným zduřením, vakuolární degenerací, steatózou buněk proximálních tubulů, ztluštěním bazálních membrán a přítomností glykogenu v buňkách Armaniho 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.

Osajin je přírodní látkou, která byla zatím ojediněle použita pro testování *in vivo* na patologických biomodelech [19, 20]. 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 osajinu na modelu alloxanového diabetu v preklinickém pokusu s výsledky jiných autorů.

ZÁVĚR

Flavonoidy patří mezi látky, jejichž antioxidační aktivitě a schopnosti zhášet nebo vychytávat volné radikály je věnována zvýšená pozornost. Dle některých autorů je antioxidační účinek této skupiny pravděpodobně podstatou tzv. vitaminového působení těchto látek. Literární prameny uvádějí, že obvyklým způsobem stravující se člověk přijme denně s potravou okolo 1 g těchto látek. Flavonoidy se v posledních letech rovněž staly součástí vitaminových směsí a potravních doplňků, proto organizmem přijímané množství může obvyklé hodnoty značně převyšovat.

LITERATURA

1. **Švíglerová, J., Kuncová, J., Tonar, Z.:** Čs. Fyziol., 2006; 55, 96-102.
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., Junior A. C. et al.:** J. Ethnopharmacol., 2007; 109, 151-155.
5. **Malaisse, W. J.:** Biochem. Pharmacol., 1982; 22, 3527-3534.
6. **Nečas, J., Bartošíková, L., Drápelová, L. et al.:** Vnitř. Lék.,1997; 43, 707-711.
7. **Bartošíková, L., Nečas, J., Pavlíček, V. et al.:** Čes. slov. Farm., 1998; 47, 151-154.
8. **Šalplachta, J., Bartošíková, L., Nečas, J.:** Gen. Physiol. Biophys., 2002; 21, 189-195.
9. **Nečas, J., Bartošíková, L., Beneš, L. et al.:** Biomed. Papers, 2005; 149, 385-388.
10. **Bartošíková, L., Nečas, J., Beneš, L. et al.:** Biomed. Papers, 2005; 149, 377-380.
11. **Janoštíková, E., Bartošíková, L., Nečas, J. et al.:** Acta Vet. Brno, 2005; 74, 557-564
12. **Bartošíková, L., Nečas, J., Suchý, V. et al.:** Pharmazie, 2006; 61, 552-555.
13. **Kosugy, H., Kikugava, K.:** Free Rad. Biol. Med., 1989; 7, 205-207.
14. **Klener, P. et al.:** Vnitřní lékařství. 1. vyd. Praha, Galén, 1999, s. 725.
15. **Roy, S., Seghal, R., Padhy, B. M., Kumar, V. L.:** J. Ethnopharmacol., 2005; 102, 470-473.
16. **Racek, J:** Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění. 1. vyd. Praha, Galén, 2003, s. 12-75.
17. **Zima, T.:** Klin. Biochem. Metab., 1995; 3, 98-102.
18. **Anděl, M. et al.:** Diabetes mellitus. 1. vyd. Praha, Galén, 2001, s. 78.
19. **Florian, T., Nečas, J., Bartošíková, L. et al.:** Biomed. Papers, 2006; 150, 93-100.
20. **Nečas, J., Bartošíková, L., Florian, T. et al.:** Čes. slov. Farm., 2006; 55, 168-174.