Collegium Medicum
Uniwersytet Jagielloński

MIROSŁAW KROŚNIAK

ROLA WANADU W CUKRZYCY INDUKOWANEJ U SZCZURÓW

Bibl. Medyczna CM UJ
1816034112

Promotorzy:
Prof. dr hab. Zofia Zachwieja
Prof. dr Gèrard Cros

Kraków 2002

Podziękowania

Pani Profesor Zofii Zachwiejowej, Kierownikowi Zakładu Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, za wybranie tematu i zaszczepienie we mnie zainteresowanie wanadem.
Przekazuje Jej za to głęboką wdzięczność

Profesorowi Gerard'owi Cros'owi, profesorowi Farmakologii Wydziału Farmaceutycznego w Montpellier, za Jego serdeczne przyjęcie we Francji. Dzięki niemu była możliwa realizacja podwójnego doktoratu w Polsce i we Francji. Dziekuję mu bardzo za Jego entuzjazm i Jego wkład do tej pracy podczas 3 długich pobytów we Francji.
Przekazuję Mu za to głęboką wdzięczność.

Ponadto dziękuję bardzo:

Pani Profesor dr Janine Brès, Profesor Farmakokinetyki Wydziału Farmaceutycznego w Montpellier, za zainteresowanie i pomoc w badaniu kinetyki wanadu.

Pani Profesor dr hab. Joannie Szymura-Oleksiak oraz dr Wojciechowi Jawieniowi z Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie za pomoc w interpretacji wyników farmakokinetycznych.

Pani Profesor dr hab. Barbarze Filipek z Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie za pomoc w realizacji pierwszej fazy pracy doświadczalnej na zwierzętach.

Doktorowi Ryszardowi Grybosiowi z Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, który zsyntezował kompleksy wanadu, na bazie których było możliwe przeprowadzenie badań.

Moim wszystkim Kolegom i Przyjaciołom w Polsce z Zakładu Bromatologii a szczególnie: dr Małgorzacie Schlegel-Zawadzkiej, dr Jadwidze Piotrowicz, dr Pawłowi Zagrodzkiemu, mgr Katarzynie Babicz za pomoc i cenne uwagi do mojej pracy.

Moim wszystkim Kolegom i Przyjaciołom we Francji z Faculté de Pharmacie Université Montpellier I

- dr Jacqueline Milhau specjalnie dziekuję, za jej codzienną pomoc i wkład w różnych etapach fazach pracy
- dr Pierre-Louis Teissèdre za pomoc w części analitycznej, dotyczącej pomiarów wanadu w winie
- Eleni Païzanis za pomoc w badaniach morfometrycznych

Laboratorium SANOFI-SYNTHELABO, szczególnie Pani Danièle Briant, Panu Claude Roque, i Panu Dominique Cahard za pomoc przy przygotowywaniu i ocenianiu preparatów histologicznych.

Dziękuję również Rządowi Francuskiemu za stypendium, które dało mi możliwość zrealizowania pracy doktorskiej w ramach umowy rządowej pomiędzy Francją i Polską, Uniwersytetem Jagiellońskim w Krakowie i Uniwersytetem Montpellier I.

Dziękuję mojej Żonie za pomoc i wsparcie psychiczne oraz moim Córkom Alicji i Patrycji, moim Rodzicom i Teściom za wyrozumiałość okazaną mi w trakcie żmudnych prac badawczych.

Wszystkim tym w Polsce i we Francji, którzy nie zostali wymienieni, ale pomagali mi w realizacji mojej pracy również dziękuję serdecznie.

Spis Treści

Wykaz skrótów....1

1. Wstęp....2

2. Przegląd piśmiennictwa....3

2.1. Właściwości fizyczne i chemiczne wanadu....3

2.2. Zastosowanie wanadu....4

2.3. Źródła wanadu i występowanie w środowisku....4

2.3.1. Minerały zawierające wanad....5

2.3.2. Gleby....6

2.3.3. Wody....7

2.3.4. Atmosfera....8

2.4. Środowisko – drogi przedostawania się wanadu do środowiska....9

2.5. Wanad a przyroda ożywiona....10

2.5.1. Wanad a organizmy niższe....10

2.5.2. Wanad w organizmach zwierząt i ludzi....13

2.5.2.1. Zawartość wanadu w tkankach ludzkich i zwierzęcych....16

2.5.2.2. Źródła wanadu w diecie człowieka....16

2.5.2.3. Wchłanianie wanadu....19

2.5.2.4. Transport wanadu przez krew....19

2.5.2.5. Rozmieszczenie wanadu w organizmach ludzi i zwierząt....20

2.5.2.6. Wpływ wanadu na aktywność motoryczną szczurów....23

2.5.2.7. Wpływ wanadu na aktywność wybranych enzymów....24

2.5.2.8. Toksyczność....25

2.5.2.8.1. Nerka....26

2.5.2.8.2. Wątroba....26

2.5.2.8.3. Układ oddechowy....26

2.5.2.8.4. Efekty hematologiczne....27

2.5.2.8.5. Rozmnażanie i rozwój osobniczy....28

2.5.2.8.6. Wpływ na spożycie wody i paszy....29

2.5.2.8.7. Dawka śmiertelna....29

2.6. Cukrzyca....30

2.6.1. Insulina 31
2.6.1.2. Wpływ insuliny i wanadu na przemianę glukozy 32
2.6.1.3. Wpływ wanadu na syntezę wtórnych przekaźników informacji 40
2.7. Preparaty wanadu dostępne na rynku 42
3. Cel pracy 44
4. Badania własne 45
4.1. Wpływ nowych organicznych kompleksów wanadu na przebieg cukrzycy u szczurów 45
4.1.1. Badane związki 45
4.1.2. Aparatura 47
4.1.3. Zwierzęta doświadczalne 48
4.1.4. Wyznaczanie wartości LD_{60} toksyczności ostrej badanych związków 48
4.1.5. Wywoływanie cukrzycy 49
4.1.6. Wpływ badanych związków wanadu na parametry biochemiczne szczurów z indukowaną cukrzycą 49
4.1.6.1. Etap I- badanie wpływu związków wanadu (M, F, H, B) na parametry biochemiczne szczurów z wywołaną cukrzycą 50
4.1.6.2 Etap II - Badanie wpływu najsilniej hipoglikemizujących związków wanadu (B i V_3) na parametry biochemiczne szczurów z wywołaną cukrzycą 52
4.1.7. Wpływ najsilniej hipoglikemizujących związków wanadu (B i V_3) na wskaźniki morfologiczne tętnic krezki oraz kłębuszków nerkowych szczurów 63
4.2. Farmakokinetyka związków wanadu 79
4.2.1. Farmakokinetyka związków wanadu ($VOSO_4$, B, V_3) u szczurów zdrowych i z wywołaną cukrzycą 79
4.2.1.1. Etap pierwszy 80
4.2.1.2. Etap drugi 90
4.2.1.3. Etap trzeci 95
4.2.2. Farmakokinetyka $VOSO_4$ u szczurów zdrowych w zależności od medium, w którym był rozpuszczony ten związek 102

4.3. Wanad w wybranych produktach spożywczych.....113
4.3.1. Zawartość wanadu w wybranych winach z Francji (region Languedoc i Bordeaux) i Kalifornii. 113
4.3.2. Zawartość wanadu w próbkach oliwy z oliwek dostępnych w handlu na południu Francji.....117
4.3.3. Wanad w różnych napojach dostępnych na rynku polskim.....120
4.3.4. Zawartość wanadu w próbkach piwa oraz w poszczególnych etapach jego produkcji.....124
5. Podsumowanie i wnioski 127
6. Streszczenie.....129
7. Piśmiennictwo.....131

Wykaz skrótów

ADP – adenozynodifosforan

AlAT – aminotransferaza alaninowa

AspAT – aminotransferaza asparaginianowa

ATP – adenozynotrifosforan

ADP – adenozynodifosforan

cAMP – cykliczne AMP

DNA – kwas dezoksyrybonukleinowy

GDP – guanozynodifosforan

GLUT 1 - 4 – białka błonowe odpowiedzialne za transport glukozy

Hal –halogenki

HDL – lipoproteiny o dużej gęstości

kDa – kilodalton

LD_{50} – 50 % dawki śmiertelnej

MAPK – podstawowe kinazy białkowe

NADH – dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy

NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego

NDS – najwyższe dopuszczalne stężenie

NDSCh – najwyższe dopuszczalne stężenie chwilowe

Pi – pirofosforan

R – reszta organiczna

SD – odchylenie standardowe

SE – błąd standardowy

STZ – streptozotocyna

1. Wstęp

Podczas pierwszych prac badawczych, pod koniec XIX wieku, nad biologiczną rolą wanadu i jego związków u organizmów żywych wykazano niespodziewane jego działanie terapeutyczne. Jednak odkrycie to nie spotkało się z należytym oddźwiękiem ze strony świata nauki oraz lekarzy i na długi czas uległo zapomnieniu. Dopiero zapoczątkowane w latach 70 XX wieku szerokie badania związków wanadu rzucają światło na rolę tego pierwiastka w organizmach żywych. Wykazano niezbicie w badaniach *in vitro* jak i *in vivo* między innymi zdolność do naśladowania działania insuliny. To z kolei przyczyniło się do dalszych szczegółowych badań w wielu dziedzinach wiedzy, a zwłaszcza chemii, biologii i medycyny, ze względu na potencjalne zastosowanie związków wanadu do walki z cukrzycą. Prowadzono badania z tym pierwiastkiem na zwierzętach, u których wywoływano cukrzycę, jak również na ludziach chorych na cukrzycę insulinozależną i insulinoniezależną. W chwili obecnej trwają poszukiwania najbardziej aktywnej i zarazem najbezpieczniejszej formy tego pierwiastka. Spośród przebadanych dotychczasowo związków wanadu najskuteczniejszym okazał się kompleks bis(maltolano) - oksowanadu(IV). Dodatkowo bada się inne aspekty, zarówno korzystne jak i niekorzystne, aktywności biologicznej wanadu.

2. Przegląd piśmiennictwa

2.1 Właściwości fizyczne i chemiczne wanadu

Wanad jest metalem należącym do V grupy układu okresowego. Jego liczba atomowa wynosi 23, a masa atomowa 50,942. Pod względem występowania w skorupie ziemskiej zajmuje 21 miejsce [Thompson, 1999]. Znanych jest 11 izotopów wanadu, jednak tylko 2 występują w warunkach naturalnych: ^{50}V (0,25%) oraz ^{51}V (99,75%) [Heiserman, 1997]. Jest pierwiastkiem o właściwościach amfoterycznych. W związkach występuje na rożnych stopniach utlenienia od, –3 do +5, co pozwala mu na tworzenie wielu związków chemicznych zarówno nieorganicznych, jak i organicznych oraz kompleksów z różnymi ligandami. Związki wanadu na niższych stopniach utlenienia są nietrwale i łatwo ulegają utlenieniu.

Wanad jest stalowoszarym metalem, bardzo twardym, kowalnym i ciągliwym o temperaturze topnienia 1710°C i ciężarze właściwym 6,1 g/cm^3. Ze względu na pasywację jest odporny na czynniki atmosferyczne, czy też na zasady lub kwasy nieutleniające. Związki wanadu zostały odkryte w latach 1801-1803 [Hampel 1961, Sigel 1995] przez profesora mineralogii Manuela del Río w Colegio de Minera w Mexico City i otrzymał wówczas nazwę Erytronium, pochodzącą od czerwonego koloru, jaki pojawiał się po podgrzaniu soli wanadu w kwasach. Odkrycie to nie zostało jednak uznane, ponieważ francuski chemik Collet-Descostils twierdził, że nie jest to nowy pierwiastek, a jedynie zanieczyszczony chrom [Hampel, 1961]. Dziś przyjmuje się, że odkrycia wanadu jako pierwiastka dokonał Nils Sefstroem w roku 1830/1831 [Hampel, 1961, Sigel 1995] przy okazji badań rud żelaza [Heiserman 1997].

Berzelius opisywał związki wanadu w 1831 roku. Ich charakterystykę chemiczną związków wanadu opracował Roscoe w latach 60 XIX stulecia, umieszczając wanad w V grupie układu okresowego [Hampel 1961].

Feliks Radwański był pierwszym polskim autorem opisującym w polskim piśmiennictwie w 1839 roku wanad i jego właściwości.

Nazwa Vanadium pochodzi od Vanadis, skandynawskiej bogini młodości i piękna. Pierwiastek ten zawdzięcza ją Nilsowi Sefstroemowi, który nadał mu ją, zachwycony bogactwem kolorów kryształów i roztworów jego soli [Buliński i współ. 1986, Morinville i

współ. 1998]. Zazwyczaj związki wanadu na V stopniu utlenienia mają barwę od żółtej do pomarańczowej, IV zieloną, niebieską, III barwy ciemne, II niebieską w roztworze.

2.2 Zastosowanie wanadu

Średnioroczne zapotrzebowanie na wanad w świecie nie przekracza 50 000 ton. Jest on dodawany do różnych stopów metali, głównie do stali wytrzymałościowych i narzędziowych. Stosowany jest także w metalicznych implantach jednym spośród wielu typów używanych w ortopedii. Wykorzystywany jest także w przemyśle elektronicznym, szklarskim, ceramicznym, fotograficznym, lotniczym, technologii kosmicznej, energetyce jądrowej. Pierwiastek ten jest ważnym katalizatorem w reakcjach utleniania, np. przy produkcji kwasu siarkowego i azotowego. Jest ponadto składnikiem wielu barwników o szerokim zastosowaniu, a także wchodzi w skład wielu preparatów organicznych [Dobkowska i współ. 1986, Kabata-Pendias i współ. 1999, Urban i współ. 2001]. W chwili obecnej trwają badania nad zastosowaniem związków wanadu do produkcji nowego typu akumulatorów o dużej pojemności [Tyczkowski 1999], a także nad polimerami koordynacyjnymi, stosowanymi w procesie mikrolitografi przy produkcji układów scalonych o bardzo dużym stopniu upakowania[Archer i współ. 1987].

2.3 Źródła wanadu i występowanie w środowisku

Wanad rzadko tworzy własne formy mineralne. Jest natomiast składnikiem towarzyszącym wielu kopalinom kompleksowym lub jest domieszką w innych kopalinach tworzących złoża. Podstawowymi źródłami wanadu są: wanadonośne rudy tytanomagnetytowe, piaskowce rudy uranowo-wanadowej, niektóre fosforyty, boraksyty, piaski bitumiczne, ciężkie frakcje ropy naftowej, przetwórstwo odpadów, złom stali szlachetnych oraz zużyte katalizatory wanadowe. [Bolewski i współ. 1996]. W chwili obecnej prowadzone są w Japonii również próby z uzyskiwaniem wanadu i uranu z wody morskiej metodą radiacyjną [Chmielewski J. 2000]

2.3.1 Minerały zawierające wanad

Wanad występuje w około 70 minerałach, z których podstawowymi są: patronit - VS_4 (występujący głównie w Mina Ragra w Peru), sulwanit $3Cu_2S \cdot V_2S_5$ (występujący w Australii i USA - zawiera do 14% wanadu), roskoelit $2K_2O \cdot 2Al_2O_3 \cdot (Mg,Fe)O \cdot 3V_2O_5 \cdot 10SiO_2 \cdot 4H_2O$ (występuje w postaci żył minerału na terenach pustynnych USA, zawiera do 20% V_2O_5, czyli wagowo 11,2% wanadu). Do minerałów o mniejszym znaczeniu gospodarczym (mniejsza zawartość procentowa wanadu) należą: dawidyt, brawoit, motramit, tyuyamunit, alait, ferghanit, wadynit, który stanowi domieszkę wyżej wymienionych, bogatszych rud. Magnetyt zawiera do 1% pięciotlenku wanadu, stąd z technologicznego punktu widzenia, szlaka wielkopiecowa może stanowić źródło tego pierwiastka. Ilmenit i inne rudy tytanu zazwyczaj zawierają od 0,21 do 0,3 % V_2O_5 [Hampel 1961].

Wanad jest jednym z najważniejszych dodatków stopowych stali. Rozwój jego produkcji i zużycia przypada na XX wiek i stymulowany był rosnącą produkcją stalownictwa, zwłaszcza stali stopowych oraz specjalnych. [Bolewski i współ. 1996]

Złoża wanadu występują stosunkowo rzadko, co wynika z dużej mobilności rozpuszczalnych w wodzie związków wanadu. Dlatego też spotyka się je w wyschniętych, bezodpływowych zbiornikach, gdzie ulegają zagęszczeniu, po wypłukaniu z zasadowych skał magmowych.

W Polsce występują znaczne, potencjalne zasoby wanadu. Największe są w złożach w postaci domieszek wanadu w rudach żelazowo-tytanowych w okolicach Suwałk (około 4,1 ml ton). Duże ilości zawarte są również w złożach rud miedzi w Monoklinie Przedsudeckiej (około 250 tys. ton wanadu). Znaczne ilości silnie rozproszonego wanadu znajdują się w węglu kamiennym na Górnym Śląsku i w łupkach ordowickich w północno-wschodniej Polsce. Jednak w Polsce nie uzyskuje się wanadu z tych źródeł i jest on sprowadzany do kraju [Bolewski i współ. 1996].

Poważnym źródłem związków wanadu są również biolity: ropa naftowa i węgle kopalne [Gruszczyk i współ. 1982, Kabata-Pendias i współ. 1999]. Popioły powstałe po spaleniu trudno lotnych frakcji ropy naftowej (mazut, asfalty) mogą służyć jako źródło tego pierwiastka dla przemysłu. Stanowią one również źródło emisji wanadu do atmosfery. Tym należy tłumaczyć obserwowaną, zwiększoną zawartość wanadu w okolicach, w których spala się duże ilości kopalin i cięższych frakcji ropy naftowej. Na podstawie tych obserwacji można przypuszczać, że występujące we wcześniejszych epokach

geologicznych rośliny gromadziły związki wanadu lub następowała migracja tego pierwiastka z otaczającego środowiska do kopalin. Przypuszcza się, że wanad obok niklu gra również kluczową rolę przy powstawaniu gazu ziemnego z cięższych węglowodanów [Pieńkowski 1998].

2.3.2. Gleby

Gleby [Kabata-Pendias i współ. 1979, Kabata-Pendias i współ. 1999] zawierają zmienne ilości wanadu. Ilości te wahają się od kilku, aż nawet do ponad 500 μg/kg, (Tab. 1). W warunkach naturalnych zawartość na ogół nie przekracza 100 μg/kg, przy czym najbogatsze w ten pierwiastek są rędziny i czarnoziemy, a najuboższe są gleby pochodzenia organicznego. W okolicach przemysłowych, zwłaszcza hut metali, zakładów cementowych, elektrowni węglowych oraz rafinerii ropy naftowej, wartości te znacząco wzrastają, przy czym przyjmuje się wartość do ok. 150 μg/kg jako najwyższą dopuszczalną. Najczęściej w glebach pojawiają się ruchliwe jony VO^{2+}, VO_4^{3-} i VO_3^-, które są łatwo wymywane z warstw powierzchniowych, a koncentrują się w poziomach ilastych i żelazistych. Wraz ze wzrostem wydatków na ochronę środowiska i świadomości o środowisku obserwuje się w Hiszpanii; [Meneses i współ. 1999] nieznaczne obniżenie zawartości wanadu w glebie.

Tab. 1. Zawartość wanadu w różnych rodzajach gleb w niektórych państwach (μg/kg) [Kabata-Pendias i współ. 1999]

Rodzaj gleb	Kraj	Zakres μg/kg	Średnia μg/kg
Gleby piaszczyste (bielice)	W. Brytania	58-91	
	N. Zelandia	160-220	
	Polska	10-37	13
	Rosja i Białoruś	10-260	105
	Madagaskar		75
Gleby pyłowe (lessy)	Białoruś		57
	N. Zelandia		185
	Polska	27-110	
Gliniaste	Czad	15-50	
	Madagaskar		95
	N. Zelandia	150-330	
	Polska	15-85	40
	Rosja i Azerbejdżan	34-210	
	USA	20-150	85

Tab. 1 c.d.

Rodzaj gleb	Kraj	Zakres µg/kg	Średnia µg/kg
Powstałe na skalach zasadowych	W. Brytania	340-460	
Aluwialne	Białoruś		18
	Madagaskar	48-180	103
Rędziny	Chiny	20-500	220
	Irlandia	38-85	
	USA	10-150	70
Solonce i solonczaki	Czad	55-260	
	Ukraina	80-100	90
Gleby bielicowe		46-62	
Gleby brunatne	Azerbejdżan		55
	Irlandia	25-55	
	Madagaskar		125
Czerwonoziemy		42-360	
Czarnoziemy		37-118	
Gleby różne	Czechy i Słowacja		120
	Włochy	25-170	75
Organiczne	Dania	6,3-10	8
	Szwecja	19-22	
	USA		38
Leśne	Chiny		90
	Rosja		145
	USA		85
Gleby wietrzeniowe z różnych skał		15-150	

2.3.3 Wody

Wody słodkie [Kabata-Pendias i współ. 1979, Kabata-Pendias i współ. 1999] wykazują większe i bardziej zróżnicowane zawartości wanadu, niż wody morskie, w których przeciętne stężenie wynosi około 2,5 µg/l. Średnie stężenie, podawane dla wód jezior i rzek, wynosi 4-5 µg/l, przy czym w rejonach zanieczyszczonych przez działalność człowieka wzrasta ono znacząco, nawet do 300 µg/l np. w jeziorze Erie w USA.

Wody zawierają rozpuszczalne oksokationy oraz oksoaniony wanadu VO^{2+}, VO_3, a także połączenia kompleksowe organiczne i nieorganiczne wanadu trójwartościowego.

W Polsce badania zanieczyszczonych wód Białej i Czarnej Przemszy wykazały średnie stężenie wanadu 4,8 µg/l, przy zakresie od 4 do 19 µg/l. W wodach podziemnych z terenów składowania odpadów paleniskowych z elektrowni, stężenie wanadu może nawet przekraczać poziom 400 µg/l [Barałkiewicz, Krośniak i współ].

Związki wanadu wiązane są szybko przez osady denne (iły, jony żelaza, a także substancję organiczną). Mogą one, zatem być czułym wskaźnikiem zanieczyszczenia wód.

Akumulacja wanadu następuje także w planktonie, zarówno roślinnym, jak i zwierzęcym, przy czym jego zawartość może tu sięgać 80 mg/kg, jak w przypadku niektórych roślin słodkowodnych.

2.3.4 Atmosfera

W atmosferze [Kabata-Pendias i współ. 1979, Kabata-Pendias i współ. 1999, Urban i współ. 2001], w zależności od stopnia uprzemysłowienia badanego obszaru, stężenia wanadu w powietrzu wahają się w szerokim zakresie od 0,0006 ng/m^3 na biegunie południowym do znacznie ponad 300 ng/m^3 w niektórych miastach (Tab.2). Obserwuje się sezonową zwyżkę stężenia wanadu w okresie zimowym. Przyjmuje się, że spalanie paliw płynnych na świecie jest źródłem około 90% związków wanadu zawartych w atmosferze [Gruszczyk i współ. 1982]. W pobliżu zakładów produkujących pięciotlenek wanadu czy zakładów metalurgicznych obserwowano stężenia wanadu w powietrzu sięgające 1000 ng / m^3. Dodatkowo w okresie wojny w Zatoce Perskiej w wyniku podpalenia szybów naftowych przez armię iracką uwolniło się sporo wanadu do atmosfery, który został rozprowadzony po olbrzymim obszarze. Zawartość wanadu w ropie naftowej z tego regionu wynosi około 28 mg/kg [208, 209] Jeśli się pomnoży tę wartość przez ilość spalonych baryłek ropy (5-6 milionów baryłek dziennie na początku operacji gaszenia szybów naftowych), ilość wanadu uwolniona do atmosfery będzie sięgała setek ton i będzie miała wpływ na zawartość wanadu w atmosferze w skali całego globu.

Tab. 2. Zawartość wanadu w atmosferze w wybranych regionach świata [ng/m^3] [Kabata-Pendias i współ. 1979, Kabata-Pendias i współ. 1999]

Kraj, miasto, region	Stężenie wanadu w atmosferze (ng/m^3)
Biegun południowy	0.0006 - 0.0024
Hawaje	0.1 - 1
Kanada, obszary niezamieszkałe	0.21 - 1.9
USA, Nowy Jork	68 - 169
USA, miasta ogrzewane ropą naftową	160 - 1320
USA, miasta ogrzewane innymi źródłami ciepła	3.4 - 22
Anglia, miasta	6 - 60
USA, okręgi przemysłowe	3 - 126

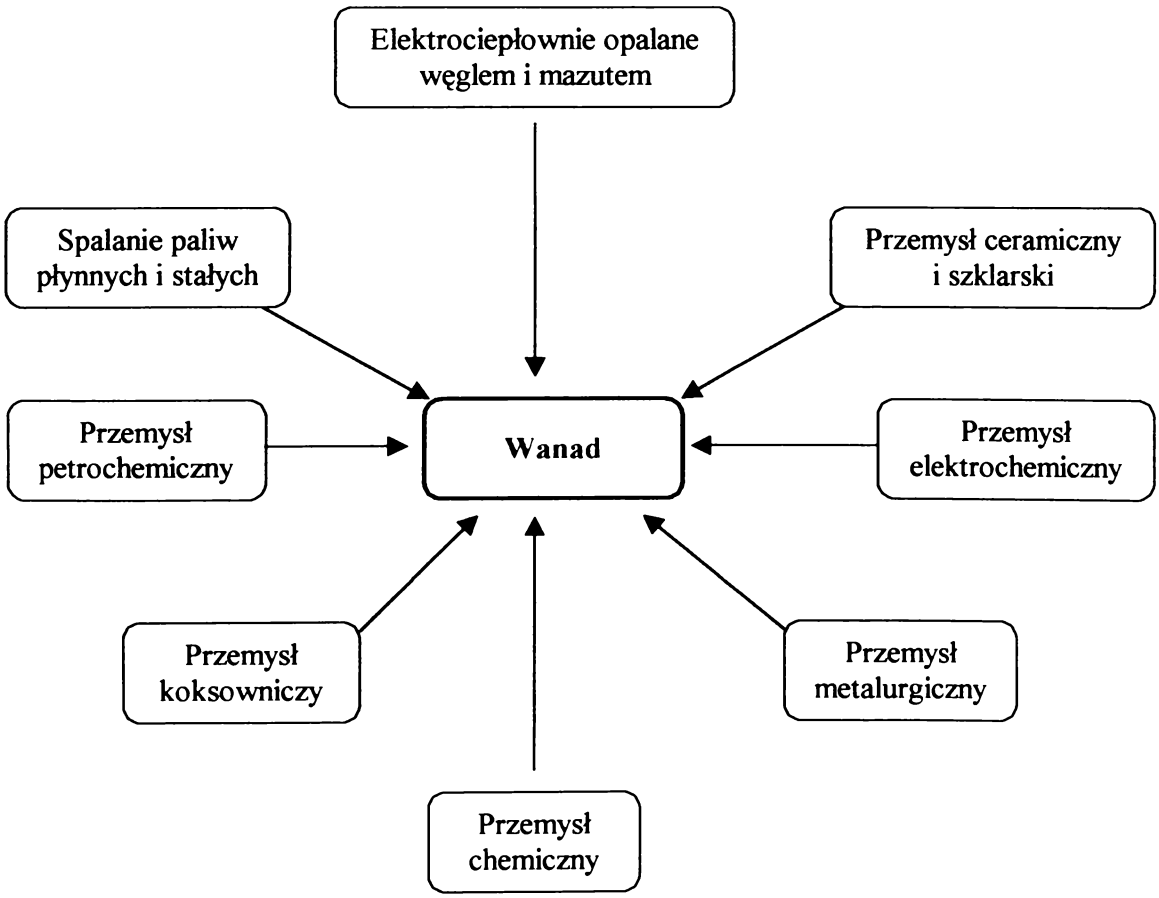
2.4 Środowisko – drogi przedostawania się wanadu do środowiska

Zawartość wanadu w środowisku jest zależna od bardzo wielu czynników. Można je podzielić na dwie podstawowe grupy:

- naturalna
- wywołana działalnością człowieka

Pierwszy czynnik jest zależny od naturalnych procesów zachodzących w przyrodzie, jak np.: wybuchy wulkanów, wietrzenie skał, wymywanie wanadu przez deszcz i wodę z podłoża, upadki meteorytów, procesy sedymentacji i akumulacji biologicznej, itd.

Drugi czynnik jest spowodowany wielkoprzemysłową i nie zawsze w pełni przemyślaną działalnością człowieka (Rys. 1).



Rys. 1. Antropologiczne źródła emisji wanadu do środowiska (rysunek uzupełniony)

[Zaporowska, 1995]

2.5. Wanad a przyroda ożywiona

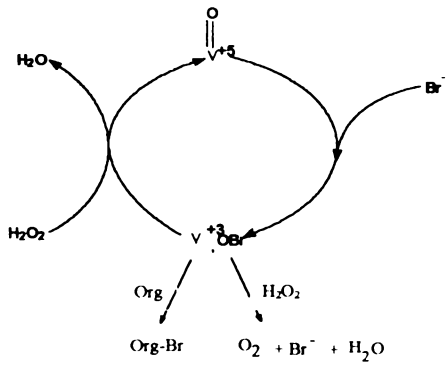
2.5.1 Wanad a organizmy niższe

W chwili obecnej posiadamy niepełny obraz roli związków wanadu w świecie przyrody ożywionej. Do tej pory udokumentowano niezbędność tego pierwiastka w rozwoju prostych, morskich organizmów roślinnych, takich jak glony [Hara i współ 1998, Verdel i współ. 2000, Almeida i współ. 2000, Isupov i współ. 2000]. Naukowcy są zdania, że bierze on udział w procesie fotosyntezy zachodzącym w tych organizmach, a także w neutralizacji nadtlenku wodoru. Wykryty w 1984 roku w ścianach komórkowych glonów morskich obejmujących brunatnice *Acophyllum nodosum, Laminaria sacharina, Fucus distichus, Macrocystis pyrifera* oraz czerwienice *Ceramnium rubrum,* wanadoenzym wanado-bromoperoksydaza (V-BrPO) uczestniczy w reakcji neutralizacji H_2O_2. Bierze ona także udział w tworzeniu chlorowcopochodnych węglowodorów, takich jak np.$CHBr_3$ [De Boer i współ. 1988, Neumann i współ. 1989, Butler i współ. 1991]. Są one emitowane w niebagatelnej w skali planety ilości rzędu 10000 ton rocznie. Reakcja tworzenia tej grupy związków z pewnością wywiera negatywny wpływ na warstwę ozonową.

$$Hal^- + H_2O_2 + H^+ + RH \longrightarrow RHal + 2H_2O \qquad \text{[Rehder 1992]}$$

W przypadku braku substratu organicznego reakcja prowadzi do redukcji nadtlenku wodoru do wody, cząsteczkowego tlenu i dużych ilości energii (Rys 2).

$$Hal^- + 2H_2O_2 \longrightarrow Hal^- + O_2 + 2H_2O \qquad \text{[Rehder 1992]}$$



Rys. 2. Przypuszczalny mechanizm działania wanado-bromoperoksydazy
[De Boer i współ. 1988, Neumann i współ. 1989, Butler i współ. 1991]

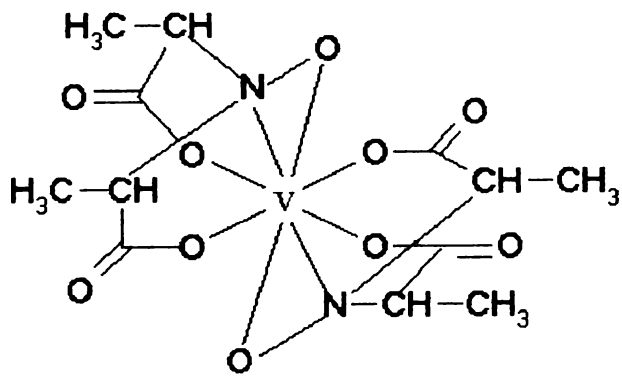
W roku 1986 u bakterii *Azotobacter, Klebsiella* i *Anabella* [Butler i współ. 1991, Cameron i współ. 1996] wykryto dwie żelazowanadoproteiny. Są to V-nitrogenazy, które katalizują przejście azotu cząsteczkowego do jonu amonowego z produktem ubocznym, jakim jest hydrazyna (do 1% substratu).

Masa cząsteczkowa V-nitrogenazy wynosi 210 kDa. Zawiera ona 27 atomów żelaza, 24 labilne jony siarkowe oraz 2 atomy wanadu. Właśnie obecnością tych bakterii w korzeniach roślin motylkowych tłumaczy się występującą tam zwiększoną zawartość wanadu. Do funkcji tej żelazowanadoproteiny należy katalizowanie produkcji jonu amonowego z azotu przy użyciu MgATP. Reakcja ta zachodzi według równania.

$$N_2 + 12\ e + 14\ H^+ + 24\ MgATP \longrightarrow 2NH_4^+ + 3H_2 + 24\ MgADP + 24\ HPO_4^{2-}$$

[Rehder, 2000]

Duże ilości związków wanadu znajdujemy w grzybach. Np. w muchomorach rodzaju *Amanita muskaria* [Butler i współ. 1991] zawartość wanadu sięga 325 mg/kg suchej masy - dwa, trzy rzędy wielkości więcej niż w roślinach wyższych. Znajdowany w tych organizmach niskocząsteczkowy związek zwany amawadyną Rys. 3, zawiera centralny atom wanadu na 4 stopniu utlenienia. Działanie amawadyny nie jest w pełni poznane. Przypuszcza się, że bierze ona udział w transporcie elektronów. Grzyby te przez swój cykl życiowy stanowią ważne ogniwo w krążeniu wanadu w przyrodzie [Asri-Nawi i współ. 1987, Lepp i współ. 1987].



Rys. 3. Budowa amawanadyny [Butler i współ. 1991]

Wanad pełni najprawdopodobniej tutaj rolę przenośnika elektronów. Świadczy o tym łatwość zmiany stopnia utlenienia z IV na V.

W odniesieniu do roślin wyższych, w dotychczas przeprowadzonych doświadczeniach, nie wykazano niezbędności tego pierwiastka w ich procesach życiowych. Niektórzy autorzy sugerują jednak, że wanad bierze udział w produkcji chlorofilu. Ma to swoje uzasadnienie w fakcie, że stosunkowo wysokie stężenia wanadu znajdowano w liściach (280 - 2700 μg/kg). Wanad wpływa także stymulująco na gospodarkę potasową. Ponadto bardzo wysokie stężenia wanadu zaobserwowano w tłuszczach roślinnych, które przeciętnie zawierają średnio między 14 a 140 μg/kg, ale mogą zawierać nawet do 40 mg/kg [Kabata-Pendias i współ. 1999]. Jednak zawartość wanadu w roślinach jest bardzo zróżnicowana (Tab.3).

Rośliny, u których stwierdzono stosunkowo najwięcej wanadu należą, do mszaków z rodzaju *Allium, Astragallus, Chrysothamnus*. Dużo wanadu stwierdzono również w koprze, nasionach kminku i czarnego pieprzu [Zaporowska 1995].

Tab. 3. Zawartość wanadu w niektórych roślinach [Kabata-Pendias i współ. 1979]

Roślina	Średnia zawartość wanadu sucha masa (mg/kg)
Pszenica:	
stadium strzelania w źdźbło	5.8
słoma	1.2
ziarno	0.1
Owies:	
słoma	0.12
ziarno	0.06
Rośliny motylkowe	0.42
Groch, ziarno	0.05
Kupkówka	0.2
Trawy różne	1.4
Porosty	8.6
Mchy	108
Muchomory	112

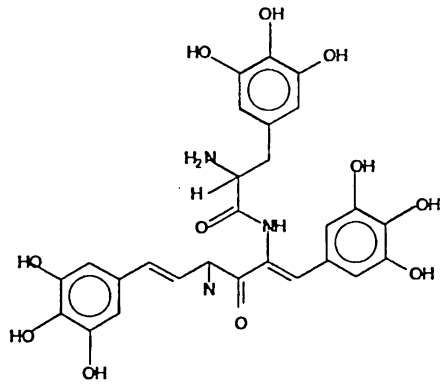
W ostatnich latach w Hiszpanii po zmianach technologicznych w produkcji przemysłowej zauważono zmniejszenie zawartości wanadu w roślinach [Meneses i współ. 1999]

2.5.2. Wanad w organizmach zwierząt i ludzi

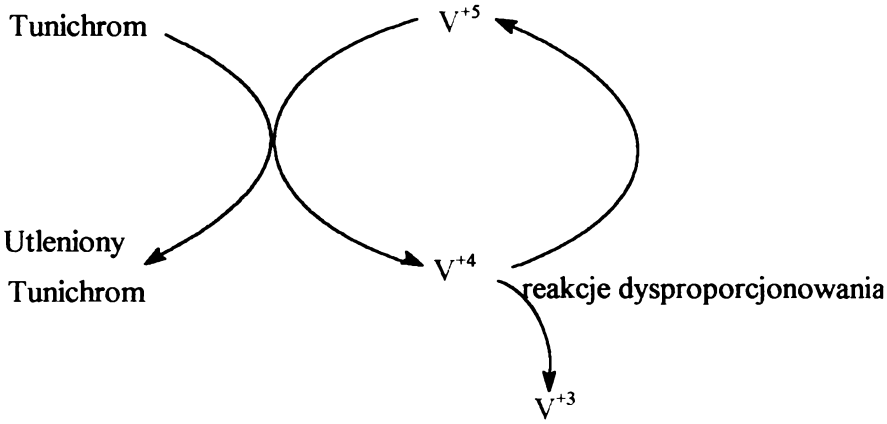
W królestwie zwierząt, rola związków wanadu, pomimo badań w wielu ośrodkach, pozostaje jeszcze mało poznana. Jednak, co roku odkrywa się nowe, interesujące aspekty roli wanadu w procesach biochemicznych.

Badania nad zooplanktonem wykazały zróżnicowany stopień akumulacji wanadu w tej grupie organizmów, wahający się od 30 do 5000 μg/kg. W odniesieniu do bardziej zaawansowanych form życia, jakimi są strunowce, w podtypie osłonic, u żachw z rodzaju *Ascidiae ceratoides* [Butler i współ. 1991, Frank i współ. 1995, Uyama i współ. 1998, Nette i współ. 1999, Ueki i współ. 2000, Guerrieri i współ. 2000, Nette i współ. 2000], badano rolę wanadu w zielonych ciałkach krwi - wanadocytach, gdzie obserwowano stężenie wanadu sięgające 0,15 mol/l. Znajduje się w nich hemowanadyna, związek o budowie zbliżonej do hemu. Przeprowadzone jednak następne badania podważyły rolę tego związku jako transportera tlenu. W trakcie najnowszych badań nad wanadocytami wykryto białko o aktywności bromoperoksydazy, o nieustalonej jednak w pełni roli. Prawdopodobnie bierze ono udział w procesach detoksykacji halogenków.

U osłonic *Ascidia ceratodes* wykazano równy stosunek molowy wanadu i tunichromu co wskazuje na ścisłą zależność między nimi. Przypuszczalnie tunichrom (Rys. 4), stanowi integralną część przyłączania i magazynowania wanadu, natomiast nie wiadomo jak wanad jest tam przyłączony. Tunichrom redukuje wanad (V) do wanadu (IV) w środowisku kwaśnym a następnie w reakcji dysproporcjonowania do wanadu (III) i (V) (Rys.5). Przypuszcza się, że utleniony tunichrom tworzy kompleks z wanadem (III) i w tej postaci pełni funkcje fizjologiczne u osłonic. [Bonadies i współ. 1987].



Rys. 4. Budowa tunichromu [Butler i współ. 1991]



Rys. 5. Przypuszczalny mechanizm działania tunichromu [Bonadies i współ. 1987]

Powyższe dane przemawiają za poglądem o niezbędności wanadu dla tych zwierząt.

W badaniach zawartości wanadu w różnych produktach spożywczych pochodzących od zwierząt wykazano, że wysoką zawartością wanadu charakteryzują się ryby, kraby, ostrygi i małże. Zawartość wanadu w tych produktach jest rzędu 0,1-0,3 mg/kg masy [Buliński i współ. 1986].

Aby poznać rolę wanadu w procesach biochemicznych organizmów żywych wykonuje się również badania na liniach komórkowych. W tego typu badaniach wykazano stymulujący wpływ wanadu na produkcję tlenku azotu, w izolowanych osteoblastach [Cortizo i współ. 2000]

Pierwsze badania na zwierzętach opierały się o diety ubogowanadowe. Procedura taka umożliwiałaby wykazanie ewentualnych zaburzeń wywołanych niedoborem tego pierwiastka. Z doświadczeń przeprowadzonych na kurczętach, z zastosowaniem diety o zawartości wanadu poniżej 10 μg/kg paszy, wykazano gorszy wzrost zwierząt, słabsze wykształcenie upierzenia, głównie skrzydeł i ogona, obniżenie poziomu cholesterolu we krwi u kurcząt 28 dniowych i wzrost cholesterolu w wieku 49 dni [Hopkins i Mohr 1971, Hopkins i Mohr 1974]. Inne badania wykazały przy diecie ubogowanadowej wzrost poziomu cholesterolu i osłabienie rozwoju kośćca [Nielsen i Ollerich 1973, Nielsen 1974].

Analogiczny wniosek wyciągnięto w odniesieniu do szczurów, po wykonaniu podobnych eksperymentów. Do objawów niedoboru wanadu u tych zwierząt należało

obniżone tempo wzrostu, zmiany w składzie kości i obrazie histologicznym komórek. Nie występowały one przy podawaniu już 100 ng V/g pożywienia.

Najbardziej kompleksowe badania z zastosowaniem diety ubogowanadowej przez okres kilku lat przeprowadzono u kóz [Arnhold i współ.1993]. Karma tych zwierząt zawierała wanad w ilości nie większej niż 9 μg/kg paszy. Natomiast w grupie kontrolnej zawierała do 500 μg/kg paszy. Nie zaobserwowano różnic w ilości przyjmowanego pokarmu czy masy urodzeniowej, natomiast różnice występowały w parametrach związanych z reprodukcją. Dla grupy ubogowanadowej obserwowano znamienne zmniejszenie częstości pierwszego zapłodnienia, znacznie wzrosła liczba poronień i martwych urodzeń. Znacząco wzrosła w stosunku do normy liczba urodzeń osobników żeńskich, wzrastała śmiertelność matek i koźląt pomiędzy 7 a 91 dniem życia (o 32%, często poprzedzona drgawkami). Zmniejszeniu uległa produkcja mleka w pierwszych 52 dniach laktacji (o około 9 %), z równoczesnym wzrostem zawartości białka w mleku. U koźląt obserwowano deformacje przednich kończyn z pogrubieniem stawów skokowych oraz opóźnienie wzrostu [Anke i współ. 1986, 1989, 1990, 1991]. Inni autorzy obserwowali przy dawce 2 μg V/kg paszy zwiększoną masę tarczycy i zwiększony stosunek masa tarczycy do masy ciała oraz tendencję do zmniejszenia masy ciała [Uthus i Nielsen 1990].

Fakty te wskazują na niezbędność tego pierwiastka w rozwoju i reprodukcji kóz i szczurów, a najprawdopodobniej także innych ssaków. Podłoże metaboliczne tych zmian zostało częściowo wyjaśnione. Opierając się na analogii, że peroksydazy halogenków u zwierząt wyższych mogą pełnić podobne funkcje jak u zwierząt niższych, rozpoczęto badania nad najważniejszą w metabolizmie tarczycy, haloperoksydazą jodkową. Na przykład u szczurów karmionych dietą ubogowanadową nie obserwowano fizjologicznego zmniejszenia aktywności peroksydazy jodkowej w tarczycy, jaka zachodzi przy zwiększonej podaży pokarmowej jodków (takie zmniejszenie obserwowano natomiast w grupie kontrolnej) [Kadota i współ. 1987]. Badania *in vitro* wykazały, że sole wanadu posiadają działanie mitogenne, podobne do ostatnio wykrytych czynników wzrostu, jak np. czynnika wzrostu nabłonków, czynnika wzrostu fibroblastów, czy też działanie insulinopodobne. Dodanie soli wanadu powoduje proliferację komórek kostnych i syntezę kolagenu [Canalis 1985, Lau i współ. 1988]. Zaobserwowano także zwiększenie ekspresji genów dla GluT 1 z następowym wzrostem wykorzystania glukozy. Jednak podkreślenia wymaga fakt, że związki wanadu nie posiadają pełnych własności insulinomimetycznych. Nie wykazują bowiem wpływu anabolicznego na gospodarkę białkową. Działanie soli

wanadu w tych wypadkach może być spowodowane wpływem tego pierwiastka na pompę sodowo - potasową, wapniowo - magnezową, fosfotransferazy, cyklazę adenylową i kinazy białkowe. Ma on jednak wpływ na metabolizm hormonów, cukrów i tłuszczy. Wykazano także jego rolę w stymulacji mineralizacji kości i zębów (omówiono szerzej wraz piśmiennictwem w kolejnych rozdziałach.

2.5.2.1. Zawartość wanadu w tkankach ludzkich i zwierzęcych

Wanad dostaje się do organizmów zwierzęcych i człowieka poprzez łańcuch pokarmowy. Zawartość wanadu w ciele zwierząt lądowych jest określona najczęściej na 2-100 μg, choć spotkać się można ze stężeniami dochodzącymi do 450 μg. Około 100-200 μg wanadu znajduje się w ciele dorosłego człowieka [Byrne i współ. 1993, Harland i współ. 1994].

Podaż wanadu do organizmu człowieka odbywa się poprzez łańcuch pokarmowy. Szacuje się, że są to ilości rzędu 10-60 μg [Barceloux 1999], choć mogą to być większe ilości w zależności od rodzaju pokarmu. W jelicie cienkim z tej ilości jedynie 1-2% zostaje wchłonięte [Zaporowska 2000]. Proces wchłaniania jest zależny także od innych składników pokarmowych, takich jak: kwas fitynowy, kwas szczawiowy, kwas cytrynowy czy jabłkowy [Harland i współ. 1994, Badmaev i współ. 1999]. Do tej pory nie ustalono jeszcze dobowego zapotrzebowania na ten pierwiastek, ale szacuje się je na rząd około 10 μg [Badmaev i współ. 1999].

2.5.2.2. Źródła wanadu w diecie człowieka

Jedne z najbardziej kompleksowych badań dotyczących zawartości wanadu w pożywieniu człowieka prowadzone były w Niemczech przez Anke i współ. [1998a, 1998b, 1998c, 2000]. Przebadali oni większość produktów spożywczych dostępnych na rynku niemieckim (Tab. 4 i Tab. 5).

Poniżej zestawiono wyniki badań tych autorów obejmujące analizę zawartości wanadu w podstawowych grupach produktów spożywczych.

Tab. 4. Średnia zawartość wanadu w wybranych produktach spożywczych [Anke i współ. 1998a, 1998b, 1998c,]

Grupa produktów	Produkt spożywczy	Zawartość wanadu µg/100g produktu świeżego
Przetwory zbożowe	Kasza perłowa	0,34-0,70
	Budyń waniliowy	0,43
	Mąka	0,59-0,80
	Pieczywo	0,73
	Ryż	0,98
	Makarony	0,96-2,70
	Mąka kukurydziana	0,96
	Płatki kukurydziane	1,35
	Budyń czekoladowy	4,9
Cukier, miód i wyroby cukiernicze	Ciasto z kruszonką	0,51
	Cukier	0,79
	Cwibak	0,91
	Miód	0,92
	Konfitury	0,94-1,72
	Cukierki	1,35
	Keks	1,94
Warzywa	Ogórek	0,17
	Kapusta biała	0,18
	Fasolka szparagowa	0,23
	Cebula	0,27
	Szparagi	0,45
	Pory	1,30
	Szpinak	2,30
	Sałata	2,50
	Rzodkiewka	2,70
	Pietruszka natka	7,24
Owoce	Pomidor	0,08
	Cytryna	0,11
	Wiśnia	0,14
	Czereśnia	0,17
	Pomarańcza	0,20
	Banan	0,22
	Jabłko	0,23
	Gruszka	0,28
	Poziomka	0,40
	Kiwi	0,65
	Ananas	0,74

Tab. 4. c.d.

Mięso i przetwory mięsne	Wieprzowina	0,47
	Kurczak	0,59
	Wołowina	0,63
	Salami	0,67
	Kiszka wątrobiana	1,25
Ryby i przetwory rybne	Śledź filet	0,48
	Czerwony okoń filet	0,58
	Śledź w pomidorach	0,70
	Makrela filet	0,86-2,24
	Śledź solony	0,97
	Pstrąg	1,08-1,22
	Sardynka	3,97
Jaja	Jaja	0,05-1,94
Mleko i przetwory mleczne	Mleko	0,11
	Ser Camembert	0,12-0,62
	Masło	0,14-0,54
	Jogurt	0,16
	Twaróg	0,17
	Ser Edamer	0,37
	Ser Gouda	0,50
	Ser Tylżycki	0,56
	Mleko kondensowane	0,62
	Ser Ementaler	0,65
	Ser topiony	0,67
Przyprawy	Gorczyca ziarno	1,46
	Pieprz	4,70-59,34
	Papryka	37,67-45,51
	Majeranek	205,44

Tab. 5. Średnia zawartość wanadu w wybranych napojach [Anke i współ. 1998a, 1998b, 1998c,]

Grupa produktów	Produkt spożywczy	Zawartość wanadu µg/l
Napoje	Wódka żytniówka	0,18
	Woda pitna	0,43
	Lemoniada	0,66
	Koniak	0,77
	Coca cola	1,0
	Likier jajeczny	3,1
	Vermouth	12,0-47,0
	Czerwone wino	14,0-51,0
	Piwo Pilsener	26,0
	Piwo pełne	36,0
	Białe wino	41,0
	Wino musujące	41,0

Anke i współ. (2000) określili dzienne pobranie wanadu przez populację niemiecką w roku 1996. Mężczyźni spożywali średnio 33 μg V/dzień zaś kobiety 3 razy mniej tzn. 11 μg V/dzień. Różnice tę autorzy tłumaczyli wyższą konsumpcją piwa przez mężczyzn. Równocześnie autorzy ci podkreślili, iż na ilość wanadu pobranego z pożywieniem istotny wpływ miał region Niemiec, z którego pochodziła żywność.

Inni autorzy [za Sigel, 1995] podają średnie wartości dziennego pobrania wanadu przez mieszkańców różnych krajów. W USA wynosiło ono zależnie od regionu od 15,5 do 22,8 μg, (w tym dla mężczyzn 18,3 μg, zaś kobiet 8,1 μg), w Wielkiej Brytanii 13-30 μg, we Włoszech 17,7 μg, w Hiszpanii 11,8 μg, zaś w Japonii tylko 2,5 μg.

2.5.2.3. Wchłanianie wanadu

Wanad przedostaje się ze środowiska zewnętrznego (powietrza, wody, gleby, pożywienia) do wnętrza organizmu, przez układ oddechowy, pokarmowy lub przez skórę [Nechay i współ. 1986]. Jednak droga podawania wanadu doustnie jest najlepiej przebadana. Wanad w pożywieniu znajduje się w postaci jonu V^{+4} bądź V^{+5}. Pod wpływem soku żołądkowego powstaje jedna forma V^{+4}, która z tym stopniem utlenienia jest transportowana przez dalsze odcinki przewodu pokarmowego [Chasteen i współ. 1986]. Wchłonięty w przewodzie pokarmowym wanad (głównie w początkowym odcinku jelita cienkiego) przedostaje się do krwi a z nią jest rozprowadzany po całym organizmie.

2.5.2.4. Transport wanadu przez krew

U ssaków 90-95% transportowanego wanadu z przewodu pokarmowego przez krew po całym organizmie jest związana z osoczem. Jedynie pozostałe 5-10% znajduje się w komórkach krwi [Patterson i współ. 1986]. W osoczu znaczna część wanadu jest związana z transferyną jako jon VO^{2+}, reszta występuje jako wanad pięciowartościowy. Przypuszcza się, że wanad na +5 stopniu utlenienia jest enzymatycznie redukowany przy wbudowywaniu się do transferyny, podobnie do redukcji Fe^{3+} do Fe^{2+} przez ceruloplazminę [Osaki i współ. 1966]. W ten sposób wbudowany w transferynę wanad jest transportowany po całym organizmie [Aisen i współ.1980].

Wanad może także stymulująco wpływać na przenoszenie receptorów transferyny ze środowiska wewnątrzkomórkowego w kierunku błony komórkowej [Tanner i współ.

1987]. Stymuluje również wychwyt Fe w szczurzych adypocytach oraz wbudowywanie I-transferyny [Tang i współ. 1998]

2.5.2.5. Rozmieszczenie wanadu w organizmach ludzi i zwierząt

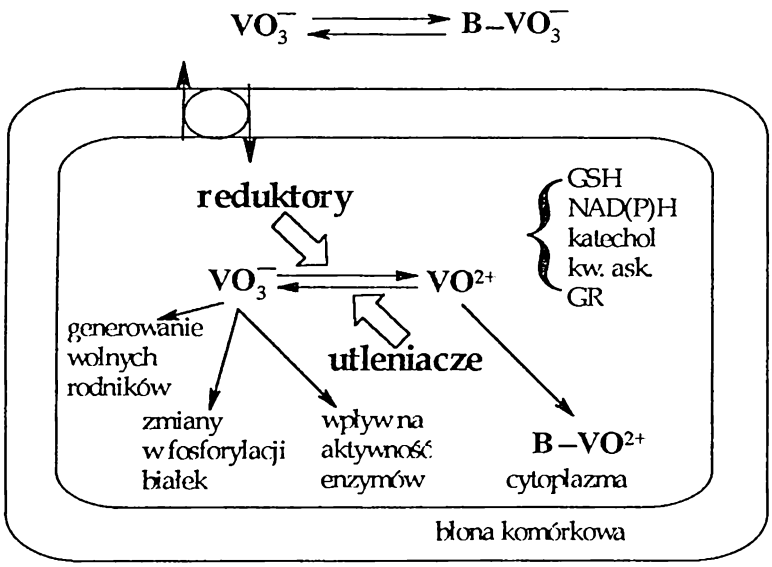
Badano głównie krew i osocze, narządy miąższowe, mózg, mięśnie, kości zwierząt oraz ludzkie włosy. Z badań przeprowadzonych przy użyciu ^{48}V wynika, że około połowy zgromadzonego w organizmie szczurów wanadu znajduje się w kościach [Setyawati i współ. 1998], podobnie jest u ludzi [French i współ. 1993]. Reszta lokuje się głównie w wątrobie, nerkach i śledzionie [French i współ. 1993, Harland i współ. 1994], zaś najmniejsze ilości obserwowano w mózgu [Zaporowska 1984]. To wskazuje na rolę bariery krew mózg dla transportu tego pierwiastka do mózgu. W obrębie komórki, wanad znajduje się w większych ilościach w jądrze, mitochondriach i cytozolu [Bracken i współ. 1985, Edel i współ. 1988, Edel i współ. 1989]. Wanad w hepatocytach i komórkach nerki jest gromadzony głównie w jądrze, mitochondriach i cytozolu [Edel i współ. 1988, Edel i współ. 1989].

We krwi fizjologiczne stężenie wanadu waha się w granicach 0,2-2,0 μg/l [Edel i współ. 1988, Barceloux 1999], gdzie w 80% występuje w surowicy w powiązaniu z transferyną i albuminami [Edel i współ. 1988] Przejście wanadu do wątroby odbywa się na drodze wymiany między osoczową transferyną a wątrobową ferrytyną [Zaporowska 1995].

Stany chorobowe mogą wpływać na stężenie wanadu we krwi. Obserwowano jego obniżenie m.in. przy marskości wątroby, miażdżycy i wrzodzie żołądka, podwyższenie zaś w psychozach maniakalno-depresyjnych, niektórych nowotworach i w chronicznej niewydolności nerek [Bello-Reus i współ. 1979, Conri i współ. 1986, Naylor i współ. 1987, El-Yazigi i współ. 1992, Zaporowska 1995]. Nie stwierdzono jednak przekonywująco by nadmiar lub niedobór wanadu był bezpośrednio związany z etiologia określonej choroby.

Powolne tempo metabolizmu a przez to powolne uwalanie z kości związanego wanadu może być odpowiedzialne za fakt długotrwałego wyrównania cukrzycy u zwierząt "nasycanych" solami wanadu. Pośrednie ilości gromadzą się w wątrobie i nerkach. Stężenie wanadu w nerkach wykazuje najlepszą korelację z ilością wanadu spożytego przez zwierzę w pokarmach. Natomiast niewielkie stężenia obserwowano w mięśniach, tkance tłuszczowej i osoczu.

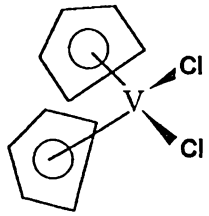
Wanad występuje w płynach ustrojowych i płynie zewnątrzkomórkowym przede wszystkim w postaci V^{5+}, pod postacią jonów: $H_2VO_4^-$, HVO_4^{2-}, VO_3^-. Transportowany jest głównie przez osocze w ilości 90 do 95 % krążącego w organizmie człowieka wanadu. Główna część transportowanego wanadu związana jest z transferyną jako VO^{2+}. Pozostała część występuje jako V^{5+}. Zmiana stopnia utlenienia z V na IV zachodzi pod wpływem ceruloplazminy w sposób podobny do przejścia Fe^{3+} do Fe^{2+}. Do wnętrza komórki przenika przez kanał przepuszczalny dla anionów. We wnętrzu komórki przy współudziale glutationu, katecholu, cysteiny, NADH, NADPH, kwasu L-askorbinowego ulega redukcji do wanadu (IV) (Rys. 6). W wyniku tej redukcji powstaje jon wanadylowy VO^{2+}, który przejawia aktywność biologiczną.



Rys. 6. Transport wanadu do komórki i jego wpływ na procesy wewnątrzkomórkowe: B-białko, GSH zredukowany glutation, kw. Ask. – kwas L-askorbinowy, GR- reduktaza glutationowa [Zaporowska i Ścibior. 1998]

Wanad jest także inhibitorem syntetazy skwalenu oraz stymuluje aktywność deacetylazy acetyloCoA w wątrobie. Inne badania również potwierdzają rolę związków wanadu w aktywacji enzymów stymulujących metabolizm lipidów, o czym zdaje się świadczyć zależność poziomu cholesterolu od podaży wanadu. Wpływ wanadu na poziom cholesterolu jest bardzo skomplikowany. U zwierząt młodych obniża go, a u zwierząt starszych podnosi.

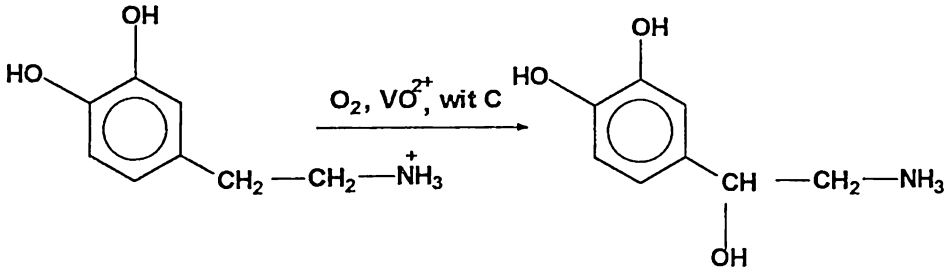
Wanad w postaci kompleksu Cp_2VCl_2 (Cp - cyklopentadienyl) (Rys. 7) może wchodzić w interakcje z kwasem deoksyrybonukleinowym - DNA [Toney i współ. 1986, Butler i współ. 1991]



Rys. 7. Kompleks Cp_2VCl_2 [Toney i współ. 1986]

Kompleks Cp_2VCl_2 oddziaływuje z DNA w miejscach, gdzie znajdują się reszty fosforanowe oraz zasady purynowe i pirymidynowe (w większości są to oddziaływania wanad-reszty fosforanowe). Kompleks ten stabilizuje strukturę DNA [Zaporowska 1995], jednak nie powoduje jego zmian strukturalnych. Stwarza to możliwość zastosowania tego związku jako leku antynowotworowego. W chwili obecnej bada się wiele związków wanadu jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. Cp_2VCl_2 stosowano w badaniach *in vitro* na komórkach nowotworowych wywołujących różnego typu białaczki.

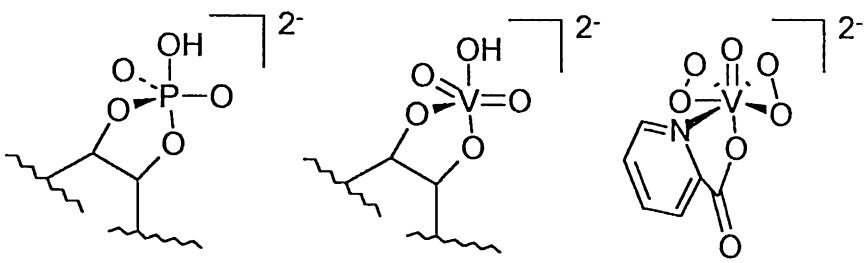
W komórkach nerwowych i nadnerczy występuje β-monooksygenaza dopaminowa katalizująca reakcję hydroksylacji dopaminy do noradrenaliny. Normalnie aktywność tego enzymu wymaga obecności Cu^{2+} i witaminy C. Zastąpienie miedzi jonami wanadylowymi wywołuje ten sam efekt (Rys. 8). Ponadto VO^{2+} może katalizować samoutlenianie niektórych amin katecholowych (z wyjątkiem dopaminy).



Rys. 8. Hydroksylacja dopaminy do noradrenaliny

Aktywność biologiczna wanadu może się wiązać z podobieństwem jonu VO_3^- do struktury jonu fosforanowego (Rys. 9). W wyniku tego podobieństwa może go zastępować w niektórych metabolitach [Shavera i współ. 1995]. Dodatkowo inny jon wanadu, VO^{2+},

ma zbliżoną średnicę do jonu Mg^{2+}. To pozwala mu na możliwość wpływania na reakcje enzymatyczne zależne od jonu magnezowego [Brichard i współ. 1991].



Fosforan Wanadan Nadtlenek wanadu

Rys. 9. Podobieństwa struktur chemicznych pomiędzy fosforanem, wanadanem i nadtlenkiem wanadu

Wanadan jest jonem, który może oddziaływać z licznymi związkami chemicznymi znajdującymi się w organizmie. Należą do nich między innymi cząsteczki odpowiedzialne za przenoszenie energii takie jak: ADP, ATP, GDP czy NAD^+ [Geraldes i współ. 1989, Crans i współ. 1995]. Wanad wiąże się także z białkami, kwasami nukleinowymi, aminokwasami, fosfolipidami, glutationem czy tez innymi metabolitami [Nechay i współ. 1986, Zaporowska 1995].

2.5.2.6. Wpływ wanadu na aktywność motoryczną szczurów

Zaobserwowano u szczurów, którym podawano 4,1 mg/kg/dzień metawanadanu sodowego, wzrost aktywności motorycznej w stosunku do zwierząt, którym nie podawano wanadu. U zwierząt, które dostały większe ilości wanadu, nie obserwowano wzrostu aktywności, a wręcz przeciwnie jej spadek [Sanchez i współ. 1998].

2.5.2.7. Wpływ wanadu na aktywność wybranych enzymów

Związki wanadu działają hamująco na Na^+/K^+ ATP-azę, co zostało odkryte w latach siedemdziesiątych i spowodowało pojawienie się licznych prac na temat ich wpływu na inne enzymy fosforylujące i transportujące reszty fosforanowe. Jednak nie jest to jedyna ATP-aza, na którą działa wanad. W chwili obecnej udokumentowano hamujący wpływ wanadu na następujące ATP-azy: ATP-aza Na^+/K^+ [Adams 1980, Cantley i współ. 1997], ATP-aza Ca^{2+}/Mg^{2+} [Shechter 1990], ATP-aza Ca^{2+} [Hasselbach i współ. 1983, Ronzani i współ. 1991], ATP-aza H^+ [Dufour i współ. 1980], ATP-aza H^+/K^+ [Dafnis i współ. 1992], ATP-aza K^+ [Furst i współ.1989]. Spośród fosfataz wykazano hamujące działanie wanadu na: fosfatazę alkaliczną [Crans i współ. 1989], fosfatazę kwaśną [Vescina i współ. 1996], fosfatazę tyrozynową [Macara i współ. 1980]. Wanad dodatkowo hamuje aktywność jeszcze innych enzymów, takich jak: dehydrogenazy glutaminowej [Kiersztan i współ. 1998] i kinazy adenylowej [Chasteen 1983].

Z drugiej strony zaobserwowano również stymulowanie aktywności niektórych enzymów przez wanad. Do tych enzymów zalicza się: kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa [Chen i współ. 1990], cyklaza adenylanowa [Hackbarth i współ.100], kinaza C [Wenzel i współ. 1995], fosfolipaza C [Wenzel i współ. 1995], podstawowe kinazy białkowe (MAPK) [Hei i współ. 1998] i rybosomalna S6 kinaza białkowa [Hei i współ. 1998]. Stosunkowo dobrze zostały zbadane dwa enzymy: fosfoglukomutaza i rybonukleaza, dla których określono przypuszczalny mechanizm działania związków wanadu. Polegać on ma na stabilizacji jednego ze stanów przejściowych, przez wytworzenie trwałych kompleksów ze strukturami enzymu, co prowadzi do jego aktywowania. Istnienie takich struktur jest na razie jedynie postulowane, brak, bowiem doświadczalnego potwierdzenia ich istnienia. Możliwe więc, że rolą wanadu jest niespecyficzny antagonizm względem fosforanów, co jednak wydaje się stać w sprzeczności z niektórymi innymi danymi. Liczni autorzy wiążą bowiem aktywność insulinomimetyczną związków wanadu z aktywacją kinazy tyrozynowej. Obserwowano też wzrost aktywności innych kinaz proteinowych *in vitro* i *in vivo*. Pamiętać jednak należy, że w badaniach *in vitro* używano stężenia wyższe niż fizjologiczne, a w badaniach *in vivo* często pojawiały się efekty toksyczne, co świadczy o raczej niefizjologicznym charakterze powyższych działań.

Weryfikacji wymaga też teza wiążąca kierunek działania ze stopniem utlenienia podawanego związku wanadu. Za działanie antagonistyczne w odniesieniu do fosforanów miałyby odpowiadać jony wanadylowe VO^{2+}, znajdujące się wewnątrz komórki, a

powstające w wyniku redukcji glutationem wanadanów VO_3^-, które występują w osoczu. Stymulację kinaz, w tym kinazy tyrozynowej, powodować mają wanadany lub peroksowanadany. Te ostatnie powstają w reakcji *in vivo* z nadtlenkiem wodoru. Zmienne stopnie utlenienia tego pierwiastka powodują, że bierze on udział w procesach oksydacyjno-redukcyjnych *in vivo* i *in vitro*. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że wanad wpływa na trzy podstawowe etapy procesów wolnorodnikowych: inicjację, propagację (tworzenie wolnych rodników) oraz terminację (usuwanie wolnych rodników). Nadal bada się, w jakim stopniu wanad wpływa na ogólny poziom statusu oksydacyjno-redukcyjnego organizmu.

Wzrost aktywności kinaz białkowych tłumaczy się także jako hamowanie aktywności fosfataz, w szczególności fosfatazy tyrozynowej, co powodować może efekty insulinopodobne.

Przypisuje się również wanadowi rolę w naśladowaniu aktywności hormonów wzrostu. W badaniach *in vitro* obserwowano w obecności związków wanadu zwiększoną proliferację komórek kości, syntezę kolagenu i proteoglikanów oraz zmiany metabolizmu fibroblastów. W wyższych nieco stężeniach występowała aktywność insulinomimetyczna, co dokładniej zostanie omówione dalej.

Zaobserwowano także wpływ związków wanadu na przyrost tkanki mięśniowej. Właściwość tą próbują wykorzystywać kulturyści w celach anabolicznych [Gerrard i współ. 1993].

W chwili obecnej uwaga części naukowców koncentruje się przede wszystkim na insulinomimetycznych efektach wanadu oraz na właściwościach blokowania pomp błonowych, w tym Na/K zależnej ATP-azy. Badany jest także wpływ wanadu na aktywność kinaz i fosforylaz .

2.5.2.8. Toksyczność

Generalnie nie zaobserwowano endemicznych zatruć wanadem w warunkach naturalnych [Thompson i współ. 1998]. W badaniach na zwierzętach obserwowano ujemny wpływ chronicznie podawanego wanadu na absorpcję wapnia z przewodu pokarmowego [Witkowska i współ. 1986], oraz także ujemny na wchłaniane i metabolizm miedzi [Witkowska i współ. 1988]. Toksyczne efekty wanadu stwierdzono natomiast u ludzi

zawodowo narażonych na ten pierwiastek występujący w postaci różnych jego związków. Wiele badań eksperymentalnych dotyczących toksyczności było wykonanych dla jego związków nieorganicznych, a ostatnio aby zmniejszyć toksyczność syntetyzuje się i bada coraz więcej kompleksowych związków wanadu.

2.5.2.8.1. Nerka

Sposób podawania wanadu wpływa na jego działanie w nerce [Thompson i współ. 1998]. Chroniczne podawanie wanadu drogą pokarmową powoduje odkładanie się go w tym narządzie. Spora cześć tego pierwiastka jest związana z niskocząsteczkowymi peptydami lub makromolekułami, w formie wanadylu i nie jest dostępna w formie wanadanu. Ten ostatni jest potężnym inhibitorem ATP-azy. Wanadan działając na nerkę wpływa na funkcje tego narządu i na wzrost poziomu mocznika [de la Torre i współ. 1999] bilirubiny i kreatyniny we krwi, które są wskaźnikami pracy nerek. Dożylne podanie ortowanadanu sodowego wpływa na kłębuszkową reasorbcję sodu i kwasicę hypokalemiczną w dystalnej części kanalików nerkowych z obniżeniem pH moczu.

2.5.2.8.2. Wątroba

Wątroba jest jednym z narządów, w którym odkłada się najwięcej wanadu podczas eksperymentów chronicznych.

Wanad obniża podwyższony przez streptozotocynę (STZ) poziom enzymów wątrobowych ALAT i ASPAT w kierunku wartości prawidłowych. W 6 miesięcznych doświadczeniach nad toksycznością wanadu u szczurów cukrzycowych z wywołaną chorobą przez STZ, bis(maltolano)oksowanad(IV) znormalizował te wartości (Dai i współ. 1994a)

Czas i droga ekspozycji oraz dawka i forma, w jakiej wanad dostał się do organizmu może być przyczyna ostrego lub przewlekłego zatrucia tym pierwiastkiem oraz stopnia nasilenia tych objawów.

2.5.2.8.3. Układ oddechowy

W niskim stopniu narażenia na związki wanadu (V_2O_5) występują objawy: podrażnienie spojówek, błon śluzowych nosa i gardła, katar z często obfitą i czasem krwawą wydzieliną, kichanie, świąd, uczucie pieczenia w gardle, suchy kaszel z odksztuszaniem małej ilości śluzowej wydzieliny, ogólne osłabienie, wyczerpanie, stany podgorączkowe.

W umiarkowanym stopniu narażenia dominują także: ostry kaszel, zapalenie oskrzeli z dusznością wydechową i skurczem oskrzeli, ostry alergiczny atak dychawicy oskrzelowej.

W ciężkim stopniu narażenia mogą wystąpić: ciężkie zapalenie oskrzeli i płuc, krwotok z płuc oraz charakterystyczny zielony język [Urban i współ. 2001]

2.5.2.8.4. Efekty hematologiczne.

Dane z przeprowadzonych badań dostarczają sprzecznych wyników. W jednych badaniach 12 tygodniowe podawanie w wodzie do picia 0,14 mg/ml metawanadanu amonowego, 0,26 mg/ml siarczanu wanadylowego, 0,38 mg/ml bis(maltolano)oxowanadu szczurom rasy Wistar nie powodowało różnic pomiędzy grupami kontrolnymi i z badanymi związkami w odniesieniu do hematokrytu, poziomu hemoglobiny, liczby erytrocytów, odsetka retikulocytów, liczby leukocytów oraz ilości płytek krwi [Dai i współ. 1995]. Natomiast w innych badaniach z pięciotlenkiem wanadu (3 mg/kg) w paszy i metawanadzianem amonowym (0,15-0,3 mg/ml) w wodzie do picia nastąpiło obniżenie liczby erytrocytów i poziomu hemoglobiny lecz bez zmiany hematokrytu [Chakraborty i współ. 1977, Zaporowska i współ. 1989, 1992]. Zaobserwowano również podniesienie procentowej zawartości retikulocytów we krwi obwodowej [Zaporowska i współ. 1991]. Te wyniki badań dotyczyły szczurów i myszy. Przeciwstawne wyniki uzyskano w badaniach broilerów. Obserwowano u nich wzrost stężenia hemoglobiny i hematokrytu po podaniu 0,8 mmol wanadu [Blalock i współ. 1987]. Z kolei u ludzi spożywających 100 mg/dzień siarczanu wanadylowego przez okres 3 tygodni zaobserwowano statystyczny spadek hemoglobiny i hematokrytu [Cohen i współ. 1995]. W badaniach *in vitro* wykazano, ze siarczan wanadylu (4mM) i wanadzian sodowy (10mM) ma działanie hemolityczne [Hansen i współ. 1985].

2.5.2.8.5. Rozmnażanie i rozwój osobniczy

U szczurów narażonych doświadczalnie na inhalacje wanadem zaobserwowano gonadotoksyczne skutki charakteryzujące się zaburzeniem spermatogenezy i ruchliwości plemników a dodatkowo będące jego konsekwencją obniżenie płodności [Roshchin i współ. 1980]. Metawanadan sodowy 60-80 mg/kg/dzień w wodzie pitnej obniża liczbę plemników oraz płodność u myszy [Llobet i współ. 1993]. Obserwowano akumulacje wanadu w jądrach bez zmian morfologicznych po podaniu siarczanu wanadu 40-100 mg V/kg masy ciała na dzień [Dai i współ. 1994b].

Wanad przechodzi przez łożysko i może się akumulować w płodzie, co może wywoływać niekorzystne efekty. Dootrzewnowe podawanie metawanadanu amonowego 0,47; 1,88 oraz 3,75 mg/kg/dzień ciężarnej samicy syryjskiego złotego chomika przejawiło się w podniesieniu częstości występowania małożuchwia, nadliczbowych żeber, zmian kostnienia segmentów mostka płodowego, przepukliny u płodów. Obserwowano znaczące, lecz nie zależne od dawki obumarcia lub zanik płodów [Carlton i współ. 1982]. Jednak brak jest pełnych podstaw by wyciągnąć wnioski o teratogennym działaniu wanadzianu amonowego. U myszy iniekcja 1mM pięciotlenku wanadu w ilości 0,15 ml w 8 dniu ciąży wywoływała kostnienie u płodu, lecz nie działała teratogennie [Wide 1984]. Siarczan wanadylu podawany w ilości 0,15-0,6 mmol/kg/dzień sondą dożołądkową od 6 do 15 dnia ciąży spowodował obniżenie długości i masy ciała płodu, wzrost częstości rozszczepienia podniebienia, małożuchwia, wodogłowia, zmniejszenie kostnienia kości nadpotylicznej oraz niezależne od dawki zaburzenie kształtowania się tarczki powiekowej [Paternain i współ. 1993]. W przeciwieństwie do tego ortowanadan sodowy w ilości 0,04-0,32 mmol/kg/dzień, podawany dożołądkowo od 6 do 15 dnia ciąży nie wykazywał tych działań [Sanchez i współ. 1991]. Jednak injekcje 16-64 μmol/kg/dzień u myszy podnosiły prawdopodobieństwo rozszczepu podniebienia, toksycznego wpływu na matki i płody, lecz nie wpływały na wzrost płodu [Gomez i współ. 1992]. Podawanie ortowanadanu sodowego w ilości 0,25-0,50 mg/ml w wodzie do picia chorym na cukrzyce szczurzycom w ciąży dawało toksyczne efekty mimo, ze ta sama dawka podawana samcom diabetykom powodowała niewielkie lub brak efektów toksycznych [Ganguli i współ. 1994a, 1994b]. To sugeruje o większej wrażliwości szczurzyc w ciąży na toksyczne działanie związków wanadu. Jednak trudno jest wyciągać końcowe wnioski, ponieważ w pracy tej nie podano, jaką dzienną dawkę wanadu otrzymały badane szczury w obu grupach.

2.5.2.8.6. Wpływ na spożycie wody i paszy

Jedno z badań przeprowadzonych na szczurach diabetycznych, którym podawano związki wanadu wykazało przyhamowanie spożycia paszy i wody lub brak takiego wpływu. Zaobserwowano jednak zmniejszenie spożycia wody i paszy wraz ze zmniejszeniem się glikemii u szczurów cukrzycowych [Thompson i współ. 1988]. U pacjentów z cukrzycą insulinoniezależną dawka 100 mg/dzień siarczanu wanadylu nie hamowała spożycia pokarmu, lecz powodowała zmniejszenie masy ciała o 1% w ciągu 3 tygodni podawania związku [Cohen i współ. 1995].

2.5.2.8.7. Dawka śmiertelna

Toksyczność wanadu jest ściśle związana z gatunkiem zwierząt [Thompson i współ. 1988]. U myszy LD_{50} dla siarczanu wanadylu wynosi 0,48 mmol/kg a dla ortowanadanu sodowego 0,2-0,3 mmol/kg [Venugopal i współ. 1978], lecz u królików i świnek morskich nie ma takiego zróżnicowania. U szczurów LD_{50} dla metawanadanu sodowego przy podaniu dootrzewnowym wynosi 0,15 mmol/kg a przy podawaniu sondą dożołądkową wartość ta jest wyższa i wynosi 0,8 mmol/kg. Dla siarczanu wanadylu LD_{50}, przy podaniu dootrzewnowym wynosi 0,3 mmol/kg a przy podaniu dożołądkowym 1,8 mmol/kg [Llobet i współ. 1984]. U kurcząt dodatek 200 µg/g paszy powodował wyższą śmiertelność a poziom 30 µg/g paszy hamował wzrost [Nielsen 1987].

Generalnie toksyczność wanadu jest zależna od drogi podania, współtowarzyszących składników pokarmowych oraz rodzaju związku, z którym wanad został podany. Dodatkowo stan fizjologiczny i niektóre patologie mają wpływ na wchłanianie wanadu w przypadku podania drogą pokarmową.

Dopuszczalne stężenia wanadu w powietrzu [Urban i współ. 2001]

NDS chwilowe dla:

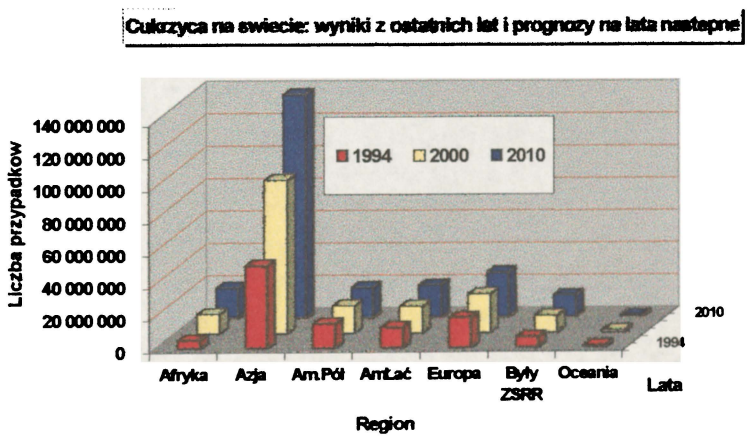
- Wanadu pięciowartościowego (pył wdychany) - 0,5 mg/m^3
- Wanadu pięciowartościowego (dym) - 0,1 mg/m^3
- narażenie ośmiogodzinne - wanad pięciowartościowy (pył) - 0,05 mg/m^3
- narażenie ośmiogodzinne - wanad pięciowartościowy (dym) - 0,05 mg/m^3

Wytyczna jakości powietrza w narażeniu 24-godzinnym - 1 $\mu g/m^3$

W dzienniku Ustaw Rzeczpospolitej Polskiej (nr 79) z dnia 27.06.1998 r. podane są wartości NDS i NDSCh dla pyłów żelazo-wanadu, które wynoszą odpowiednio 1 mg/m^3 i 3 mg/m^3

2.6. Cukrzyca

Z ocen WHO [Czech i współ. 2000] wynika, że w 2000 roku z pośród 6 miliardów ludzi na świecie około 175 milionów choruje na cukrzycę. Prognozy na następne 25 lat mówią już o ilości około 250 milionów ludzi a więc można mówić nawet o epidemii cukrzycy (Rys. 10). Według szacunków lekarzy, w Polsce dotkniętych tą chorobą jest około 1,5 miliona osób, a 2-krotnie więcej jest ludzi z upośledzeniem tolerancji glukozy. Jest to choroba przewlekła a jej udział w kosztach leczenia np.: w USA wynosi 6-8%. Z tych powodów na całym świecie dąży się do zwiększenia profilaktyki oraz skuteczności leczenia cukrzycy i jej powikłań.



Rys. 10. Prognozowana liczba przypadków cukrzycy w wybranych terenach [De Boer i współ. 1988]

Cukrzyca jest chorobą, która dotyczy wszystkich ras ludzkich na wszystkich kontynentach, może ujawnić się w każdym wieku, występuje także w świecie zwierząt

[Czech i współ. 2000]. Określenie „cukrzyca" można przypisać każdemu przewlekłemu zaburzeniu metabolizmu, objawiającemu się w sposób powtarzalny, a charakteryzujący się:

1) hiperglikemią na czczo i glukozurią,
2) hiperglikemią po posiłkach w ciągu dnia i glukozurią
3) przy prawidłowej glikemii na czczo, jeżeli wartość stężenia glukozy we krwi po doustnym podaniu testowej dawki 75,0 g glukozy jest wyższa od tej, którą uznaje się za charakterystyczną dla osób zdrowych lub osób z upośledzeniem tolerancji glukozy.

Na rozwój cukrzycy mają wpływ mechanizmy etiologiczne, wynikające z różnego rodzaju zaburzeń genetycznych (nieprawidłowe genotypy) oraz diabetogennych wpływów środowiska zewnętrznego, powodujących niedobór insuliny lub insulinooporność.

2.6.1. Insulina

Insulina jest hormonem, który odgrywa kluczowa rolę w homeostazie ustrojowej zwierząt i ludzi. Jest odpowiedzialna za regulacje prawidłowego stężenia glukozy we krwi. Ma także wpływ na gospodarkę tłuszczową i białkową. Stężenie glukozy we krwi jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za sekrecję insuliny z wysepek β trzustki.

Istnieją dwie rożne hipotezy tłumaczące regulacje sekrecji insuliny przez glukozę.

1. Glukoza wiąże się z receptorem umiejscowionym prawdopodobnie w błonie plazmatycznej komórek β, aktywując w ten sposób mechanizm uwalniania insuliny.
2. Czynnikiem regulującym sekrecję insuliny są śródkomórkowe metabolity lub tempo ich przepływu przez określony szlak metaboliczny, np. przez pentozofosforanowy cykl kwasów trikarboksylowych lub przez szlak glikolityczny.

Jednak najprawdopodobniej działają oba mechanizmy.

Biosynteza i wydzielanie insuliny do krwi podlega regulacji metabolicznej, hormonalnej i nerwowej. Najważniejszym czynnikiem fizjologicznym regulującym sekrecję tego hormonu jest stężenie glukozy we krwi dopływającej do wysp trzustkowych. Glukoza wpływa na proces wydzielania (pierwsza faza) i biosyntezy (druga faza) insuliny zarówno przez reakcje z glukoreceptorem błony komórek β doprowadzając w ten sposób

do zwiększenia zawartości cAMP w tych komórkach jak i przez wewnątrzkomórkowy metabolizm. Wydzielanie insuliny jest także stymulowane przez aminokwasy, w mniejszym stopniu związki ketonowe, kwasy tłuszczowe a być może prostaglandyny. Z pośród hormonów wyraźny wpływ na sekrecję insuliny posiadają:

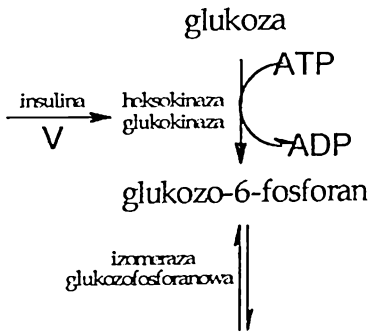
- hormony trzustkowe:
    - o glukagon
    - o somatostatyna
- niektóre hormony jelitowe
- katecholoaminy.

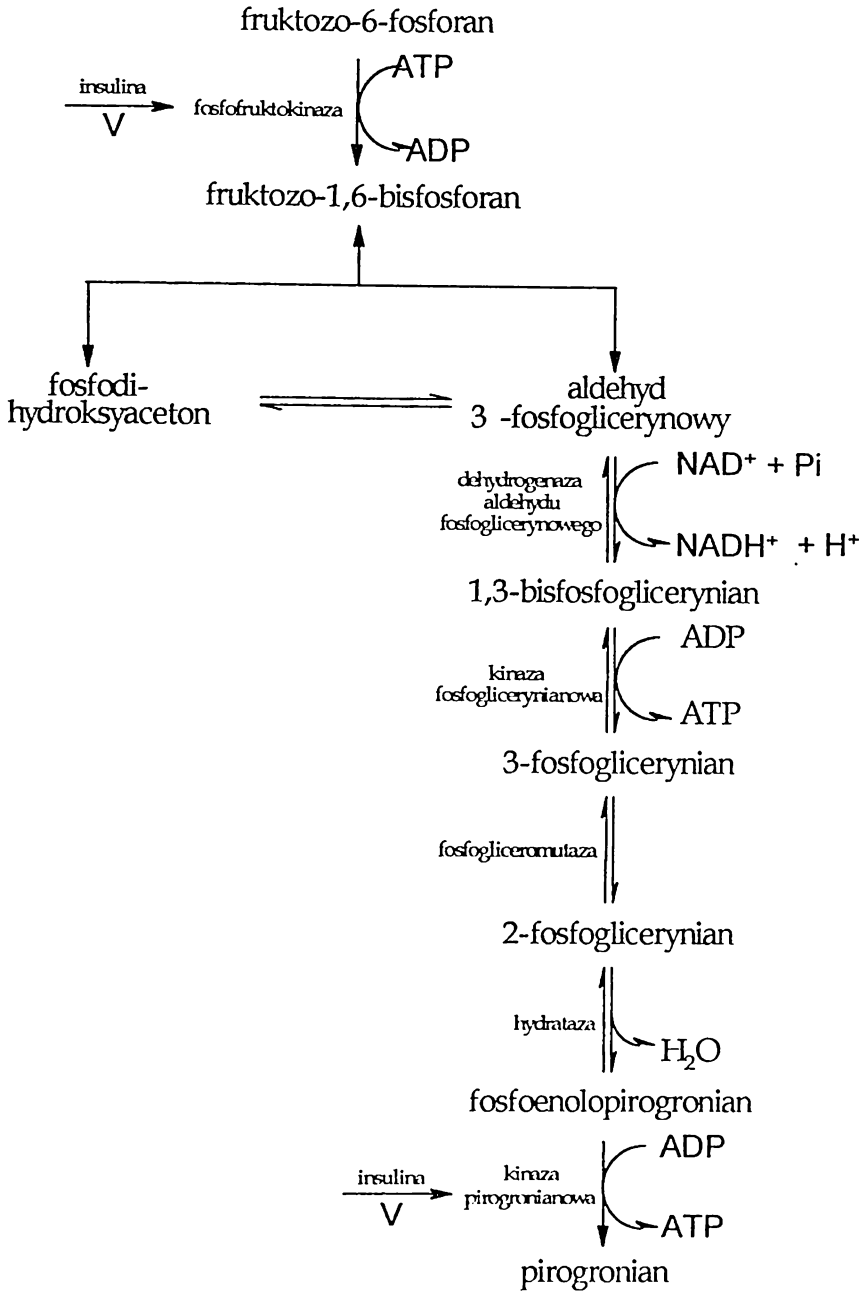
Wydzielanie insuliny jak i innych hormonów trzustkowych jest pobudzane przez niektóre peptydy wytwarzane przez ścianę jelita już w okresie kontaktu papki pokarmowej z błoną śluzową przewodu pokarmowego. Należą tu: żołądkowy peptyd hamujący (GIP), cholecystokinina (CCK), wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) i glukagonopodobne peptydy jelitowe. Adrenalina działa hamująco na sekrecje insuliny ułatwiając glikogenolizę, lipolizę oraz zapobiega lipogenezie. To działanie ma zapewnić zwiększony dopływ glukozy i wolnych kwasów tłuszczowych w chwili stresu (zwiększonego zapotrzebowania, w momencie niebezpiecznym dla organizmu).

Komórki β są unerwione przez zwoje i włókna nerwowe adrenergiczne, cholinergiczne i peptydergiczne

2.6.2.1. Wpływ insuliny i wanadu na przemianę glukozy

Hormon ten jest odpowiedzialny za proces glikolizy. Pod jego wpływem wzrasta stężenie enzymów odpowiedzialnych za przemianę glukozy do pirogronianu: heksokinazy, glukokinazy, fosfofruktokinazy, kinazy pirogronianowej [Murray i współ. 1995]. Miejsca działania insuliny wraz z wanadem w szlaku glikolizy przedstawia (rys. 11).



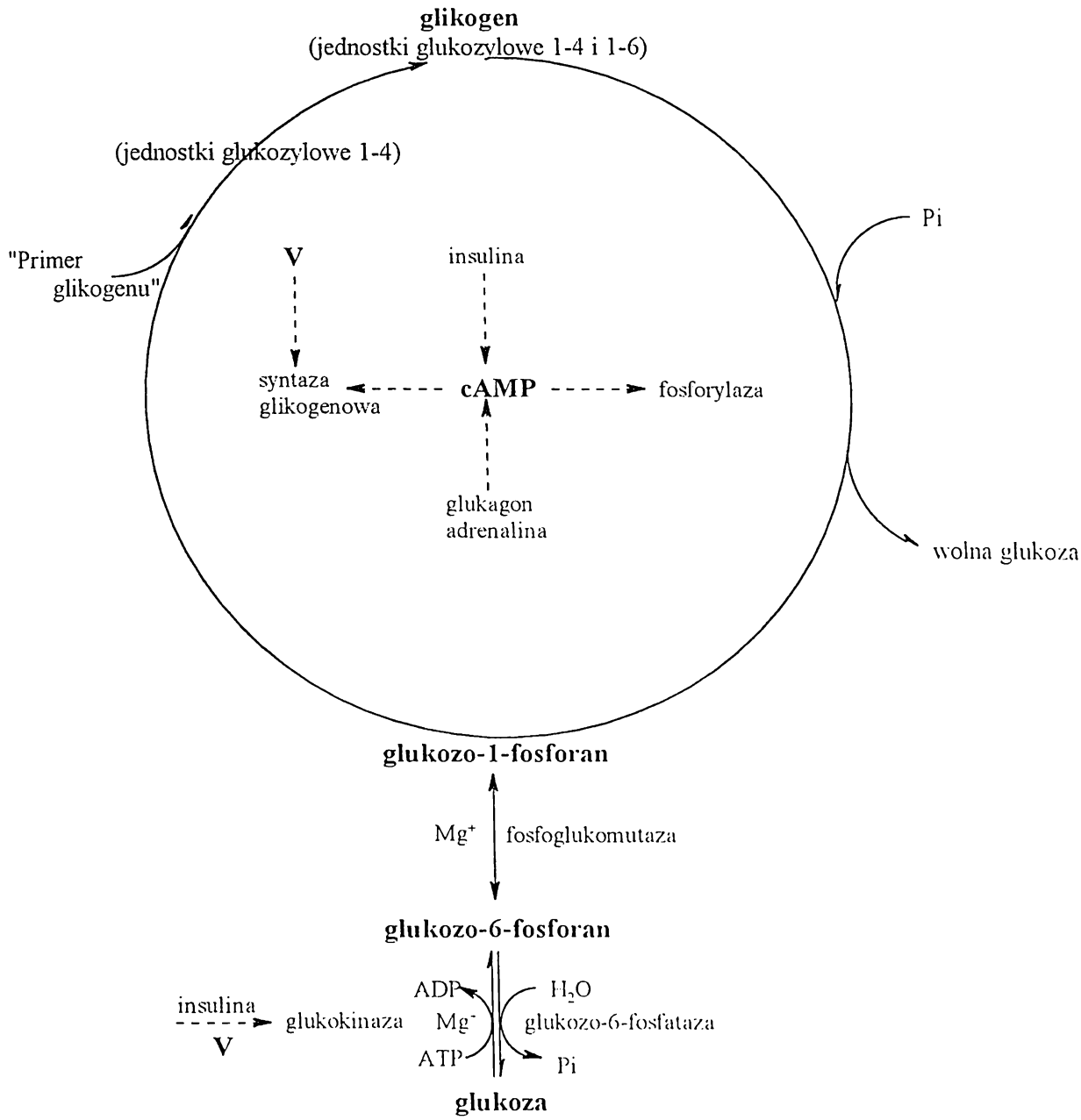


Rys. 11. szlak glikolizy(rysunek uzupełniony) (Kusior 1996)

Mechanizm działania insuliny w wątrobie jest nieco inny (Rys. 12). Z jednej strony insulina pobudza wbudowanie glukozy do glikogenu (glikogenezę) i w ten sposób zmagazynowanie jej w wątrobie. Z drugiej przez hamowanie fosforylazy spowalnia uwalnianie glukozy z glikogenu wątrobowego. Wpływ insuliny na metabolizm wątroby przedstawia.

Insulina wpływa poprzez kaskadę reakcji enzymatycznych na wzrost szybkości translokacji nośników glukozy z wnętrza komórki do błony cytoplazmatycznej w

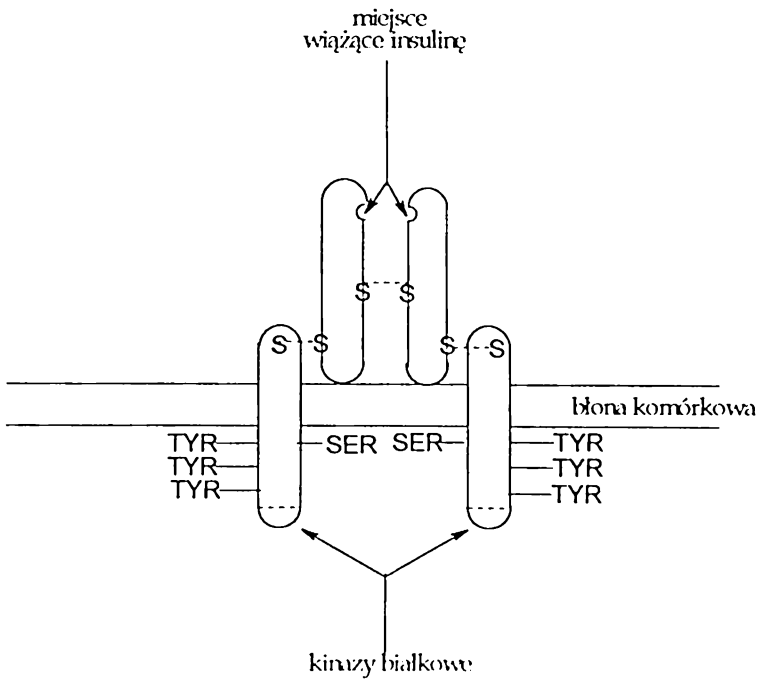
komórkach mięśni i tkanki tłuszczowej [Goldfine i współ. 1995, Rothenberg i współ. 1991]



Rys. 12. Przemiany glukozy w wątrobie (Kusior 1996)

Wszystkie szczegóły działania insuliny nie są jeszcze poznane. Jednak pobudzenie przez nią procesów metabolicznych rozpoczyna się w momencie powiązania jej ze swoistym receptorem, na powierzchni komórek docelowych. To połączenie uwalnia szereg kaskad reakcji enzymatycznych (fosforylacji i defosforylacji odpowiednich białek) prowadzących do uruchomienia określonych reakcji szlaku metabolicznego.

Receptor insulinowy jest heterotetramerem (Rys. 13). Dwie podjednostki α wystają ponad błonę komórkową, pozostałe 2 podjednostki β przechodzą przez błonę komórkową z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do wewnątrzkomórkowej. Rys przedstawia schemat receptora dla insuliny.

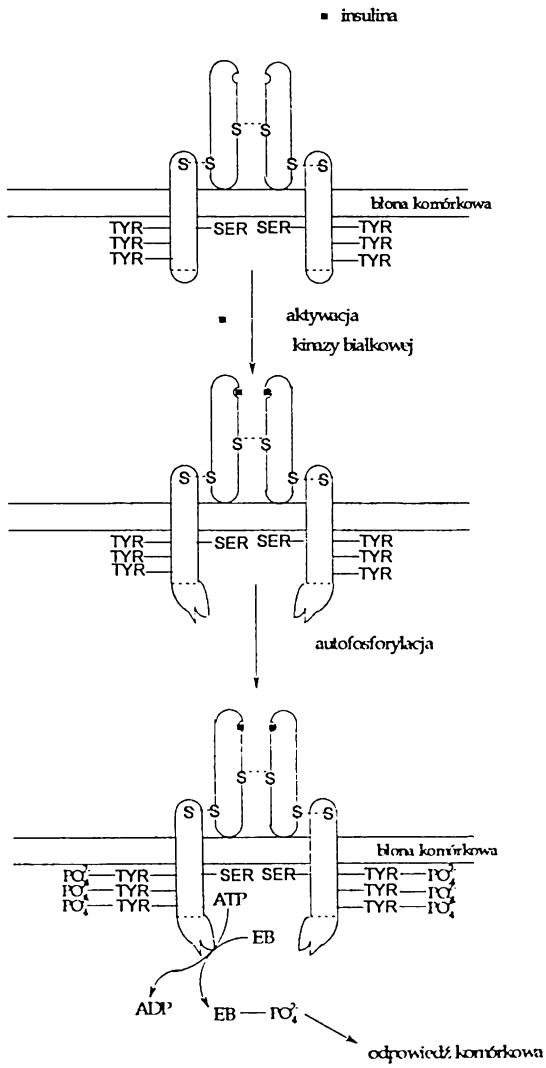


Rys. 13. Receptor dla insuliny [Kusior 1996]

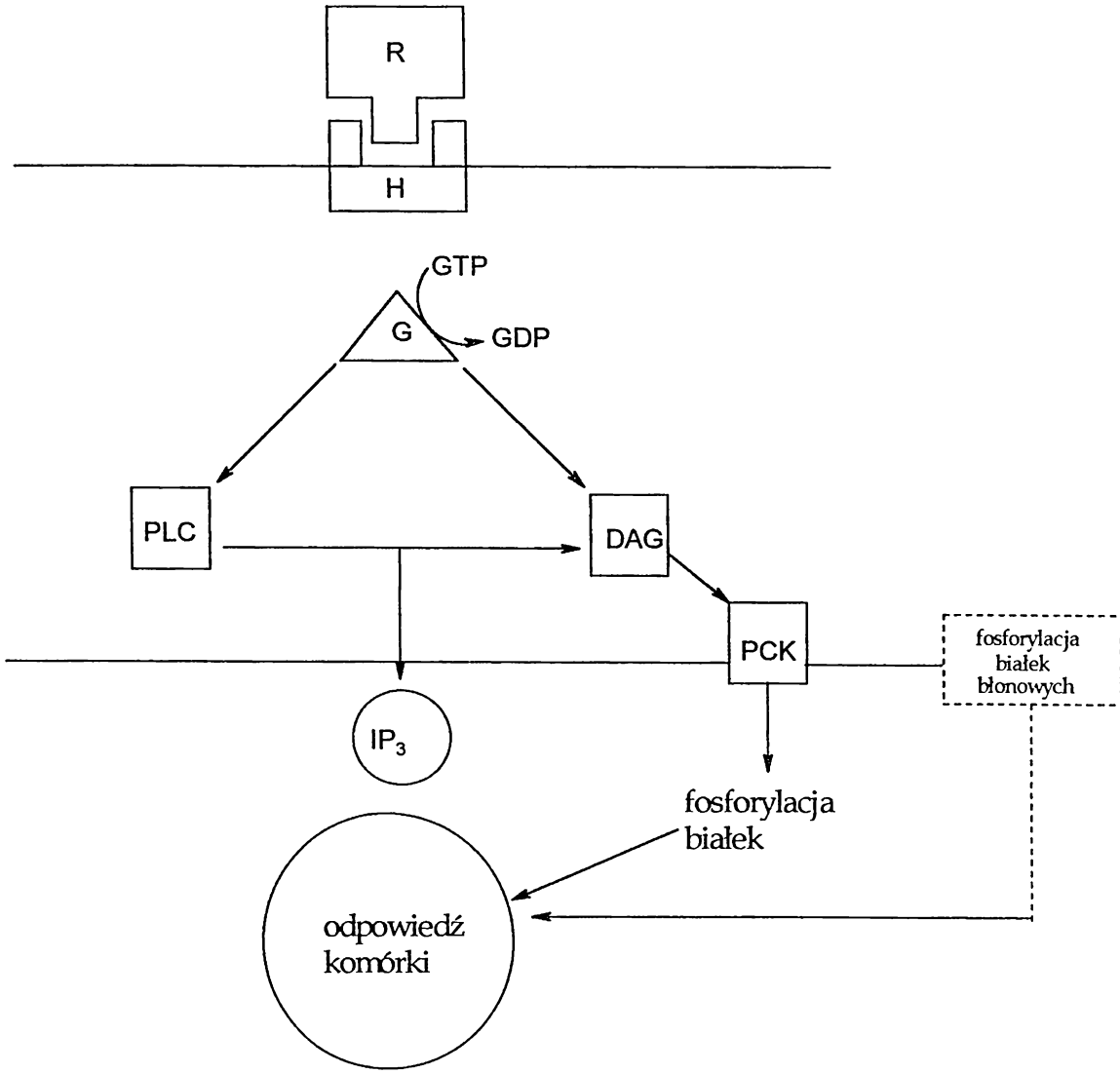
Insulina przyłącza się do podjednostek α i po połączeniu z nimi następuje przekazanie sygnału. Istnieje kilka hipotez wyjaśniających mechanizm działanie insuliny przez uruchamianie kaskady reakcji enzymatycznych (Rys. 14 i 15)

1) Podjednostka β pełni rolę kinazy tyrozynowej. Po przyłączeniu insuliny do podjednostki α następuje aktywacja tej kinazy i autofosforylacja receptora. W ten sposób zaktywowana kinaza fosforyluje białko pp.185, co powoduje uruchomienie kaskady reakcji enzymatycznych.

2) Połączenie receptora (R) z insuliną (H) powoduje aktywację białka G. Białko G stymuluje działanie innego enzymu – fosfolipazy C (PLC). PLC katalizuje reakcje w wyniku których z fosfatydyloinozytoli (fosfolipidów błony komórkowej) powstają diacyloglikole (DAG) oraz trifosforan inozytolu (IP_3). DAG aktywuje kinazę białkową C (PKC), która fosforyluje kolejne białka enzymatyczne.
3) Kinaza białkowa C fosforylując reszty seryny i treoniny hamuje działanie kinazy tyrozynowej.
4) Hipotetyczna kinaza tyrozynowa 53 kDa, nie będąca receptorem dla insuliny, aktywuje kaskadę reakcji enzymatycznych

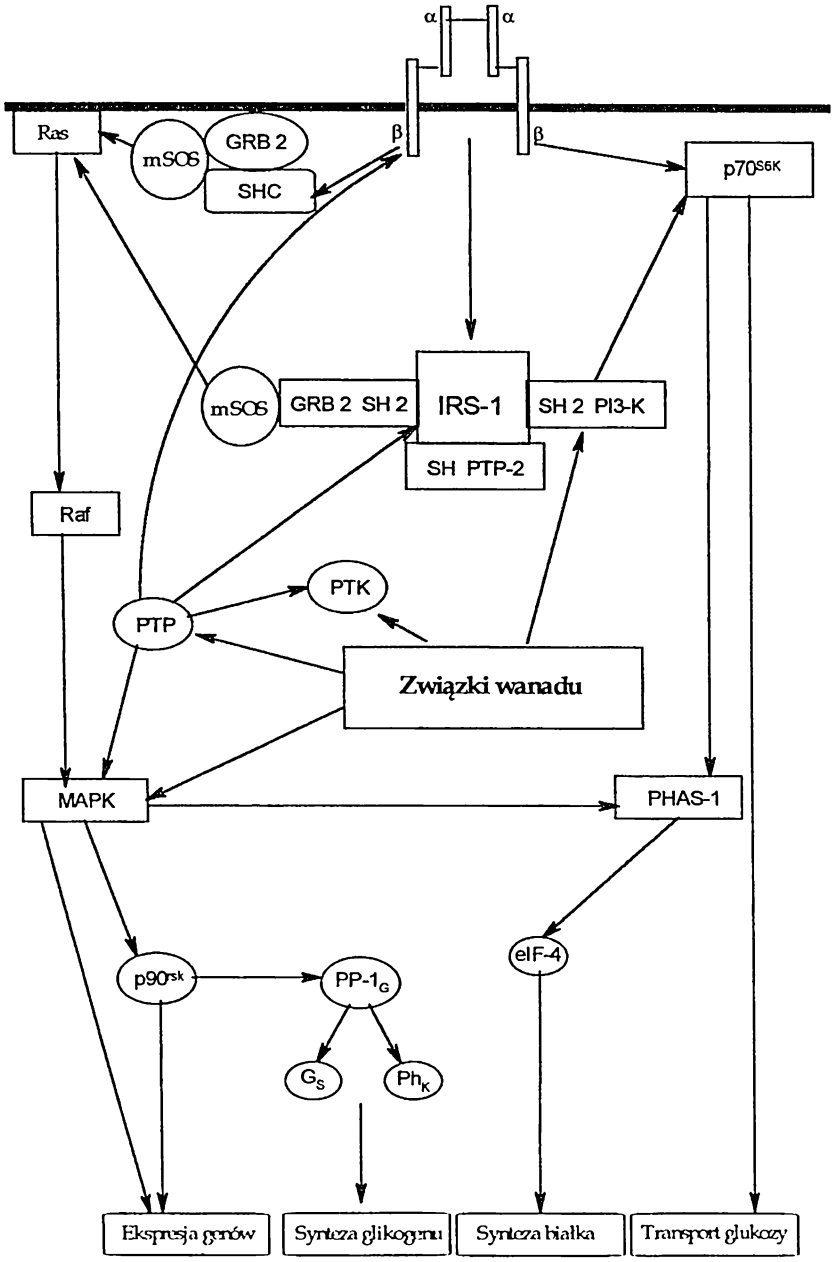


Rys. 14. Mechanizm działania receptora insulinowego [Kusior 1996]



Rys. 15. Szereg reakcji zachodzących w receptorze insulinowym [Kusior 1996]

Na rysunku 16 przedstawiono hipotetyczne miejsce działania wanadu. Związki wanadu mają działanie zbliżone do działania insuliny. Normalizują one poziom glukozy poprzez stymulację transportu glukozy do miocytów i adypocytów [Schechter 1990, Paquet i współ. 1992], wpływają podobnie na proces glikoneogenezy i glikolizy oraz na jej utlenianie. Zwiększona prędkość glikolizy wywołana przez związki wanadu jest wynikiem ich wpływu na aktywność enzymów odpowiedzialnych za ten proces Miralpeix 1992, Clark i współ. 1985, Paquet i współ. 1992].



Rys. 16. Mechanizm działania insuliny i przypuszczalne miejsca działania wanadu. **IRS-1** - białko fosforylowane przez kinazę tyrozynową receptora insulinowego (ostatnio uważa się, że nie jest to jedno białko, stąd czasami zapis IRS-1/2), **GRB-2** – białko wiążące czynniki wzrostowe, **PI3-K** – kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa, **PTP** – białkowa fosfataza tyrozynowa, **mSOS** – czynnik biorący udział w wymianie nukleotydów guaninowych, **SHC** – białko zawierające region 2 harmonii src, **Ras** – białko o aktywności GTP-azy, **Raf** – Ser/Thr kinaza białkowa, **MAPK** – kinaza MAP (kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny), **$p90^{rsk}$** – rybosomalna kinaza białkowa S-6 o masie 90 kDa, **$p70^{S6K}$** – rybosomalna kinaza S-6 o masie 70 kDa, **$PP\text{-}1_G$** – fosfataza syntazy glikogenowej, **G_S** – syntaza glikogenowa, **Ph_K** – kinaza fosforylazy glikogenowej, **PHAS-1** – białko szoku cieplnego, **eiF-4** – eukariotyczny czynnik transkrypcyjny, **PTK** – cytozolowa kinaza tyrozynowa [Kiersztan 1998a].

Odbywa się to przez wpływ na aktywność i ekspresję genów kodujących enzymy kluczowych etapów metabolizmu wątroby. U zwierząt z cukrzycą poziom mRNA glukokinazy i kinazy pirogronianowej w wątrobie spada odpowiednio o 90 i 70%, a po 18 dniach podawania związków wanadu zostaje przywrócony w co najmniej do poziomu 40% wartości prawidłowych [Brichard i współ. 1993]. Wanad jest także inhibitorem fruktozobisfosfatazy 2, a to prowadzi do zwiększenia szybkości glikolizy w wyniku aktywacji fosfofruktozokinazy 1 przez zsyntezowany w tych warunkach fruktozo-2,6-bisfosforan [Rider i współ. 1990].

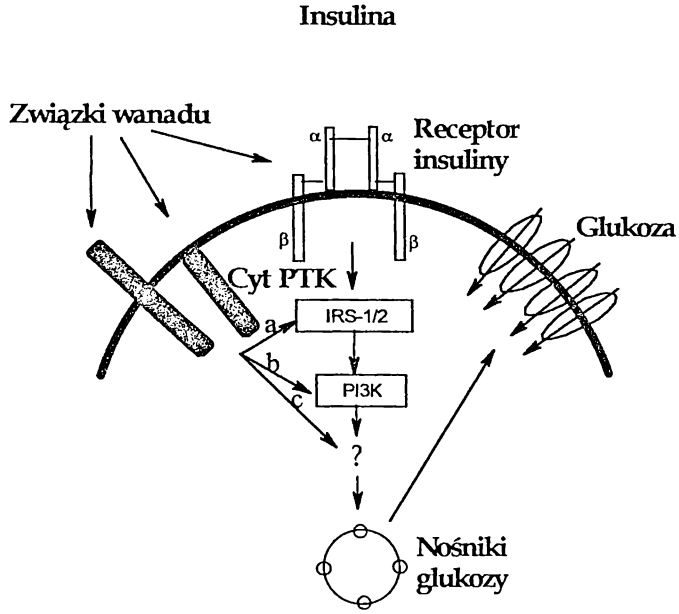
Wanad jest również odpowiedzialny za hamowanie lipolizy [Schechter 1990]

Wanad wpływa także na białka błonowe GLUT, które są odpowiedzialne za transport glukozy do komórek. Wpływ ten odbywa się przez ekspresję genów kodujących te białka [Mountjoy i współ. 1990, Brichard i współ. 1993, Tsiani i współ. 1998]. W przypadku białek GLUT 1 i GLUT 4 u zwierząt z cukrzycą typu I związki wanadu stymulują ekspresję do wartości obserwowanych u szczurów kontrolnych [Mountjoy i współ. 1990, Strout i współ. 1990, Kopp i współ. 1997]. Z badań wynika, że u zwierząt z cukrzycą typu II związki wanadu nie wpływają na ekspresję genów odpowiedzialnych za syntezę GLUT 2 [Ferber i współ. 1994] i GLUT 4 [Brichard i współ. 1992]. Zwiększenie wrażliwości komórek na insulinę jest wynikiem raczej usprawnienia funkcjonowania tych nośników, niż wzrostu ich liczby [Brichard i współ. 1992]. Wanadzian w stężeniu 1mM stymuluje podobnie jak 0,160 mM insuliny wychwyt glukozy, i przemieszczenie GLUT-4 w kierunku błony komórkowej w izolowanych adypocytach szczurzych [Molero i współ. 1998].

Mechanizm molekularnego zwiększenia transportu glukozy przez związki wanadu jest nadal niejasny i różni się od działania insuliny (Rys. 17) [Kiersztan 1998a].

1) stymulacja transportu heksoz przez wanadan nie jest blokowana przez kwercytynę. Kwertycyna hamuje aktywność kinazy tyrozynowej receptora insulinowego oraz stymulowany przez insulinę transport heksoz [Shisheva i współ 1992, Kiersztan 1998a].
2) wanadan i nadtlenek wanadu zwiększają szybkość transportu glukozy w obecności wortaminy, inhibitora kinazy 3-fosfatydyloinozytolowej, której aktywność warunkuje zależne od insuliny wbudowywanie w błony transporterów glukozy

3) dodawanie do mieszaniny inkubacyjnej zarówno wortaminy jak i inhibitora kinazy tyrozynowej blokuje działanie nadtlenku wanadu na transport glukozy
4) stymulacja transportu cukrów przez insulinę i związki wanadu jest hamowana przez cytochalazynę D, wskazując na podobieństwo ich działania.



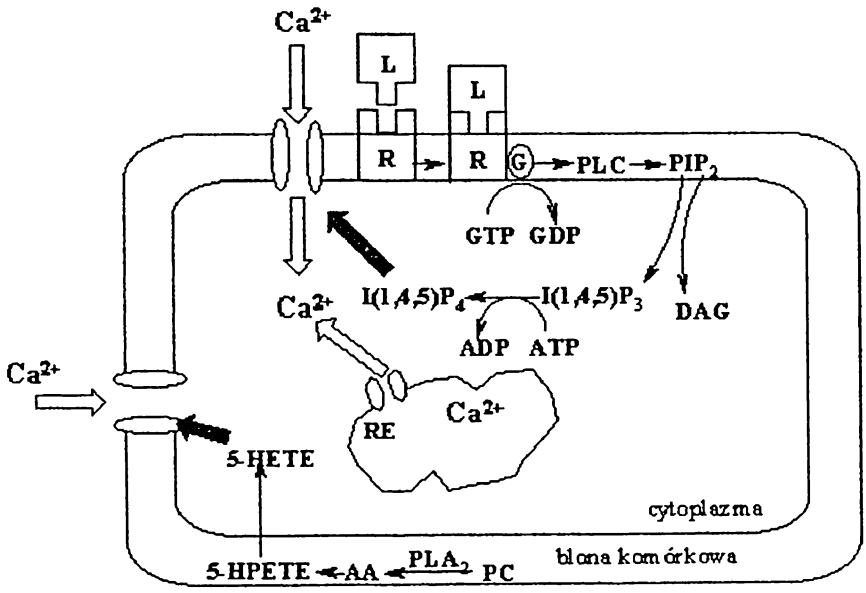
Rys. 17. Wpływ związków wanadu na transport glukozy. Możliwe miejsca działania wskazują strzałki a, b i c. IRS-1/2 – substraty kinazy tyrozynowej receptora insulinowego, PI3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa, PTK – kinaza tyrozynowa. [Kiersztan 1998a]

Wanad i jego związki wpływają głównie na szlaki przemian węglowodanów, ale również zaznacza się ich wpływ na przemianę lipidów, białek i aminokwasów.

2.6.3. Wpływ wanadu na syntezę wtórnych przekaźników informacji

Wanad dziala stymulujaco na aktywność cyklazy adenylowej (CA), fosfolipazy C (PLC), oraz fosfolipazy A_2(PLA2) [Zaporowska 1995]. Wskutek tego wzrasta w komórce stężenie wtórnych przekaźników informacyjnych jak cAMP, trójfosforan inozytolu (IP_3),

diacyloglicerol (DAG) i kwas arachidowy. Wzrost stężenia IP_3 oraz kwasu arachidowego prowadzi do zwiększenia stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie. Mechanizm ten przedstawia sie następująco: aktywowana przez wanad fosfolipaza C katalizuje reakcje hydrolizy fosfatydyloinozytolo (4,5)bisfosforanu (PIP_2) do IP_3 i DAG. Jednak wzrost stężenia IP_3 w obecnosci wanadu nie wynika jedynie z aktywacji PLC. Wanad reguluje ponadto cykl fosforanów inozytolu, hamujac defosforylację tych zwiazków. Powstaly IP_3 działa na specyficzne kanały w reticulum endoplazmatycznym, wrażliwe na ten zwiazek. Powoduje to uwalnianie Ca^{2+} z retikulum do cytoplazmy. Ponadto IP_3 może być przekształcony do inozytolotetrafosforanu IP_4, który aktywuje kanały błonowe i wnikanie Ca^{2+} do komórki. Dodatkowo, do wzrostu stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie prowadzi również aktywacja fosfolipazy A_2. Powstaly wówczas kwas arachidowy, przy udziale lipooksygenazy jest przeksztalcany do kwasu 5-hydroperoksy-6,8,11,14-eikozatetraenowego (5-HPETE) i dalej do kwasu 5-hydroksy-6,8,11,14-eikozatetraenowego (5-HEPE). Ten ostatni działa stymulująco na kanały wapniowe w plazmolemie, powodując napływ Ca^{2+} do cytoplazmy ze środowiska zewnętrznego. W tym wypadku poprzez wzrost stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie, wanad może działać pośrednio na wiele reakcji zależnych od wapnia (Rys. 18) [Zaporowska 2000].



Rys. 18. Wpływ wanadu na przekazywanie sygnału w komórce [Zaporowska 2000].

Poza wanadem do piewiastków, które mają wpływ na stężenie glukozy lub złagodzenie skutków cukrzycy zalicza się: selen [Battell i współ. 1998], wolfram [Barbera i współ. 1994, Barbera i współ. 2001, Munoz i współ. 2001,], chrom [Anderson 1999, Anderson 2000, Stearns 2000, Anderson i współ. 2001], cynk [Anderson i współ. 2001, Yoshikawa i współ. 2001] i lit [Srivastava i współ. 1993]

2.7. Preparaty wanadu dostępne na rynku

Wraz z odkryciem niezbędności wanadu w niektórych procesach biochemicznych u zwierząt, spotyka się sugestie aby stosować suplementację tego pierwiastka u ludzi mimo, że do tej pory nie obserwowano ewidentnych skutków jego niedoboru.

Różne firmy wypuściły na rynek preparaty zawierające związki wanadu. W ulotkach zaleca się je jako „panaceum" na wiele chorób lub też dla wybranych grup ludzi np. kulturystów.

Preparaty te zawierają wanad w ilościach spotykanych w spożywanych pokarmach. Preparaty te są dostępne na rynku i w sklepach internetowych (Tab. 6).

Poniżej przedstawiono kilka przykładów preparatów wanadu. Wybrano tylko te, które mają zdefiniowaną zawartość tego pierwiastka.

Tab. 6. Preparaty zawierające związki wanadu

Preparat	Zawartość wanadu [μg]	Zalecana dzienna dawka	Adresowana grupa odbiorców
Sport Power [210]	10 μg	1-2	sportowcy
Vital O, A, AB, B [211]	10 μg	1 po posiłku	Ludzie z grupą krwi O, A, AB, B
Vita-Saurus [212]	10 μg	1-2 tabletki 2 dziennie po posiłku	Dzieci w wieku powyżej 10 lat
SportPharma Vanadyl pH [213]	7,5 μg	1 dziennie po treningu	sportowcy
Ultimate nutrition Vanadyl sulphate [213]	10 μg	1 dziennie po posiłku	Suplement pokarmowy

Tab. 6. c.d.

Preparat	Zawartość wanadu [μg]	Zalecana dzienna dawka	Adresowana grupa odbiorców
Super Multi Plus [214]	5 μg	3 dziennie	
Men's Superior [215]	20 μg		Mężczyzni w sile wieku
Senior's Superior [215]	20 μg		Ludzie powyżej 50 lat
Women's Superior [215]	20 μg		Kobiety w sile wieku
Vita-Complete[29] [216]	10 μg	1 dziennie	dzieci
Vita-Complete[40] [216]	10 μg	1 dziennie	dorośli
Vita-Complete[50] Gold [216]	5 μg	1 dziennie	dorośli
Centrum	10 μg	1 dziennie	dorośli

Jak wynika z zamieszczonej tabeli proponowane dzienne dawki wanadu są różne. Nie napotkano jednak informacji jaki to jest procent zalecanej dziennej dawki pokarmowej i ile ona wynosi.

Znaleziono także sporo innych preparatów zawierających wanad, jednak nie zostały one tutaj przytoczone, ponieważ nie informowały jaką ilość tego pierwiastka zawierają. Przypuszczalnie są to ilości wanadu, które towarzyszą innym składnikom zawartym w danym preparacie (naturalne tło).

Cel pracy

Z dotychczas przeprowadzonych badań w wielu ośrodkach naukowych na świecie wynika, że związki wanadu mają wpływ na gospodarkę węglowodanową a więc można by je wykorzystywać w leczeniu cukrzycy. Jednak do chwili obecnej nie znaleziono takich połączeń wanadu, które wykazywałyby korzystne właściwości farmakologiczne a równocześnie nie powodowały ujemnych efektów ubocznych.

Ze względu na to, że nieorganiczne związki wanadu wykazują szereg niekorzystnych właściwości, zainteresowano się ostatnio organicznymi, kompleksowymi połączeniami tego pierwiastka. W chwili obecnej najbardziej obiecującym, aczkolwiek wciąż niedoskonałym związkiem jest bis(maltolano) – oksowanad (IV). Nadal poszukuje się więc nowych związków o jeszcze lepszych właściwościach terapeutycznych i o słabszym działaniu niepożądanym. Takim poszukiwaniom poświęcona jest niniejsza praca.

Celem niniejszej pracy było:

1) Przebadanie czterech nowych, organicznych, kompleksowych związków wanadu, (zsyntetyzowanych przez dr R. Grybosia na Wydziale Chemii UJ w Krakowie) pod kątem ich hipoglikemizującego działania oraz toksyczności ostrej.
2) Wyselekcjonowanie związków najaktywniejszych i poddanie ich szczegółowej analizie. Badania te, wykonane na szczurach, powinny dotyczyć pomiarów:
   a) parametrów biochemicznych krwi szczurów
   b) parametrów morfometrycznych naczyń krwionośnych krezki i nerki
   c) farmakokinetyki u szczurów po podaniu tych związków
3) Dodatkowo postanowiono poszukać naturalnych źródeł wanadu dla ludzi. W tym celu należałoby przeanalizować zawartość tego pierwiastka w wybranych produktach spożywczych.
4) Aby możliwe było przeprowadzenie powyższych badań postanowiono zoptymalizować procedurę analizy wanadu we krwi szczurów oraz w żywności.

4. Badania własne

Badania własne składają się z czterech części. Trzy pierwsze dotyczą wpływu nowych kompleksów wanadu na przebieg cukrzycy u szczurów (parametry biochemiczne i farmakokinetyczne) oraz analizy zmian morfometrycznych w wybranych narządach tych zwierząt.

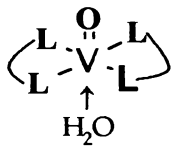
Ponieważ wanad uznany jest za niezbędny dla ludzi pierwiastek ultraśladowy, dodatkowo dołączono również część czwartą poświęconą poszukiwaniom naturalnych źródeł wanadu w pożywieniu ludzi.

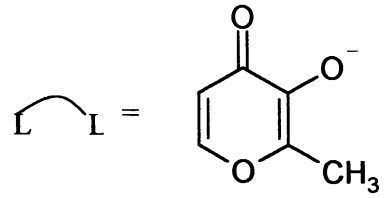
4.1 Wpływ nowych organicznych kompleksów wanadu na przebieg cukrzycy u szczurów

4.1.1 Badane związki

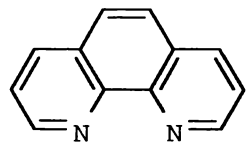
Tab. 7. Wzory sumaryczne i strukturalne badanych związków

Skrót zastosowany w pracy	Nazewnictwo IUPAC
M	bis(maltolano)oksowanad(IV), $[VO(mal)_2]$
F	trihydrat bis(1,10-fenantrolina)oksosiarczno(VI)-O-wanadu(IV), $[VO(SO_4)(phen)_2] \bullet 3H_2O$
B	dihydrat bis(2,2'-bipirydyna)oksososiarczno(VI)-O-wanadu(IV), $[VO(bpy)_2]SO_4 \bullet 2H_2O$
H	akwadichlorobis(2-hydroksy-1-metylo-1-cyklopenten-3-on)oksowanad(IV), $[VOCl_2(Hmcp)_2H_2O]$
V_3	2,2'-bipirydynooxodiperoxowanadan(V) sodu pentahydrat, $Na[VO(O_2)_2(bpy)] \bullet 5H_2O$

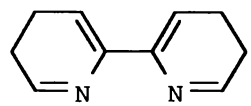


gdzie  dla związku M

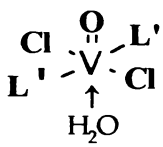
Rys.19.

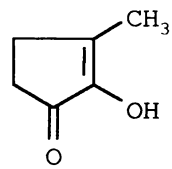


dla związku F
Rys. 20.

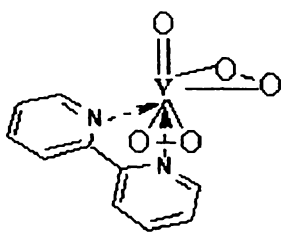


dla związku B
Rys. 21.



gdzie L' = 

dla związku H
Rys. 22.



związek V_3
Rys. 23.

W badaniach wykorzystano 5 organicznych, kompleksowych połączeń wanadu (Tab. 7).

Pierwszy związek M (Rys. 19) jest znanym połączeniem kompleksowym wanadu, przyjętym w tej pracy jako związek odniesienia. Cztery pozostałe zostały zsyntetyzowane przez dr Grybosia na Wydziale Chemii UJ. Związki F (Rys. 20), B (Rys. 21), H (Rys. 22) zawierają wanad (IV) zaś związek V_3 – wanad (V) (Rys.23).

4. 1. 2. Aparatura

Spektrometria Absorpcji Atomowej

W badaniach posługiwano się dwoma spektrometrami absorpcji atomowej. W badaniach prowadzonych w Krakowie pomiarów zawartości wanadu w materiale badawczym dokonano przy pomocy spektrometru absorpcji atomowej firmy Perkin Elmer 5100 ZL a w pracach wykonywanych w Montpellier przy pomocy spektrometru absorpcji atomowej firmy Varian; Varian 1275.

Pomiary wybranych wskaźników

Pomiarów biochemicznych dokonano metodami enzymatycznymi przy użyciu automatycznego analizatora SYNCHRON CX 4 (Beckman) w Krakowie oraz Hitachi 704 w Montpellier.

Stężenie insuliny oznaczono metodą radioimmunologiczną przy pomocy zestawu z ^{125}J.

Pomiarów morfometrycznych dokonano przy pomocy mikroskopu optycznego sprzężonego z kamerą cyfrową podłączoną do komputera z oprogramowaniem umożliwiającym automatyczne ocenianie powierzchni i odległości (axioHOME system firmy Carl Zeiss, Niemcy).

Ze względu na układ pracy szczegółową metodykę dotyczącą wybranych fragmentów omówiono w odpowiednich rozdziałach. W tej części umieszczono jedynie ogólne informacje.

Obliczenia statystyczne

Wszystkie obliczenia statystyczne przy porównywaniu różnych parametrów w grupach szczurów wykonywano przy pomocy modułu ANOVA, testem Tukeya dla różnych liczebności w grupach w Statistica for Windows 6,0.

4.1.3 Zwierzęta doświadczalne:

Na prowadzenie doświadczeń na zwierzętach uzyskano zgodę Komisji Etycznej Collegium Medicum UJ w Krakowie oraz we Francji zgodę Ministra Rolnictwa i Leśnictwa nr 02463.

Do wszystkich doświadczeń używano samców szczurów rasy Wistar, w wieku 6-8 tygodni, o wadze 160 do 220 g. z hodowli polskiej lub francuskiej. Przed badaniami wszystkie szczury były poddawane aklimatyzacji przez okres 3 dni. Następnie w trakcie doświadczenia przetrzymywano je w temperaturze pokojowej 21°C, z 12 godzinnym cyklem dzień-noc.

Szczury były karmione przez cały okres doświadczeń standardową paszą. W tym okresie miały one nieograniczony dostęp do karmy. Codziennie rano mierzono spożycie paszy gdy wymagało tego doświadczenie.

Szczury dostawały do picia wodę wodociągową. Dostęp do wody był dla zwierząt nieograniczony. Codziennie rano podczas zmiany wody na świeżą, mierzono spożycie wody gdy wymagało tego doświadczenie.

Generalnie liczebność w każdej z badanych grup zwierząt wynosiła co najmniej 6 sztuk. W przypadkach gdzie była inna zaznaczono to w tekście odpowiedniego rozdziału. Do wszystkich doświadczeń zużyto około 250 szczurów.

4.1.4 Wyznaczanie wartości LD_{50} toksyczności ostrej badanych związków

Aby wyznaczyć wartość LD_{50} posłużono się testem Litchfield'a i Wilcoxon'a (Litchfield T. i Wilcoxon F.: 1949). Zdrowe zwierzęta podzielono na trzy grupy po 6 sztuk. Po okresie aklimatyzacji, głodzono je przez 24 godziny a następnie podawano im sondą dożołądkową wzrastającą dawkę 5 badanych związków w ilościach 150 mg, 300 mg, 600 mg, zawieszonych w metylocelulozie.

Przez okres 24 godzin obserwowano ile zwierząt padło. Stosując wyżej wymieniony test wyliczono wartości LD_{50}.

Tab. 8. Wartości LD_{50} dla poszczególnych kompleksów wanadu

	M	F	B	H	V_3
LD_{50} (mg/kg)	220	260	>400	>400	>400

Jak wynika z tabeli 8 nowe związki (F, B, H, V_3) charakteryzują się znacznie niższą toksycznością ostrą niż związek M przyjęty za związek odniesienia.

4.1.5 Wywoływanie cukrzycy

Do wywoływania cukrzycy u zwierząt laboratoryjnych (myszy, szczury) stosuje się streptozotocynę (STZ) lub alloksan. Po podaniu dożylnym tych związków następuje uszkodzenie komórek β-trzustki i gwałtowny spadek produkcji insuliny. Już w trzeciej dobie po wstrzyknięciu tych związków poziom glukozy wzrasta kilkakrotnie w stosunku do poziomu prawidłowego. W kolejnych dniach i tygodniach następują dalsze uszkodzenia innych tkanek i narządów charakterystyczne dla pełnoobrazowej, nie leczonej cukrzycy.

W doświadczeniach przedstawionych w niniejszej pracy zastosowano STZ w ilości 55 mg/kg masy szczura. Rozpuszczano ją w roztworze soli fizjologicznej (0,9 % NaCl) i wstrzykiwano do żyły ogonowej w ilości 1 ml/kg masy szczura. W trzecim dniu po wstrzyknięciu związku badano poziom glukozy w krwi z ogona, za pomocą glukometru paskowego firmy Exac Tech (Medisense) w Polsce i Glukometer 4 (Bayer) we Francji. Zwierzęta, u których poziom glukozy we krwi był niższy od 7,78 mmol/l odrzucano.

4.1.6 Wpływ badanych związków wanadu na parametry biochemiczne szczurów z indukowaną cukrzycą

Badania te podzielono na dwa etapy:

a) pierwszy polegający na sprawdzeniu, czy nowe związki wanadu (IV) (M, F, B, H) posiadają właściwości hipoglikemizujące (ten etap badań był wykonany w Krakowie)

b) drugi służący do szerszej oceny biochemicznej i morfometrycznej wpływu dwóch (B i V_3) najsilniej hipoglikemizujących związków wanadu (te badania wykonano w Montpellier)

4.1.6.1 Etap I- badanie wpływu związków wanadu (M, F, B, H) na parametry biochemiczne szczurów z wywołaną cukrzycą

Metodyka badań

W eksperymentach podawano zwierzętom sondą dożołądkową badane związki przez okres 4 tygodni..

W doświadczeniach w I etapie zawieszone w metylocelulozie związki wanadu w ilości $^1/_{20}$ LD_{50} podawano szczurom rano, zaś w II etapie eksperymentach związki wanadu rozpuszczano w wodzie i podawano zwierzętom w ilości $^1/_{10}$ LD_{50} w dawce podzielonej na dwie części (w odstępach 12-to godzinnych). Zwierzęta kontrolne dostawały jedynie samą wodę

W I etapie badań wstępnych kontrolę stanowiły zwierzęta diabetyczne (n=6), które nie otrzymywały związków wanadu, zaś w II etapie zastosowano potrójną kontrolę, były to: zwierzęta zdrowe, zwierzęta diabetyczne, którym nie podawano związków wanadu, oraz szczury zdrowe, którym podawano badane związki (wszędzie n=6).

Podczas wszystkich doświadczeń, dwa razy w tygodniu (poniedziałek i czwartek godz. 8 rano) ważono szczury oraz sprawdzano przy pomocy glukometru poziom glukozy we krwi pobranej z ogona.

W etapie II w czwartym tygodniu eksperymentu przeprowadzono test tolerancji glukozy we wszystkich grupach szczurów. W poniedziałek z rana odebrano zwierzętom pokarm a pozostawiono jedynie wodę. Po upływie 24 godzin przystąpiono do testu tolerancji glukozy (5 g/kg masy ciała). W tym ostatnim tygodniu nie dokonywano pomiarów spożycia paszy i wody, ponieważ były one zakłócone tym eksperymentem. W grupie szczurów zdrowych, którym podawano związek V_3 zaobserwowano padnięcie dwóch szczurów. We krwi tych szczurów poziom glukozy obniżał się z dnia na dzień i przed padnięciem wynosił około 2 mmol/l.

Po zakończeniu doświadczeń szczury dekapitowano.

Wyniki badań I etapu

Wyniki tych badań zostały opublikowane w 2001 r. (Krośniak i współ.). W pracy niniejszej przedstawiono fragmenty tej publikacji.

Uzyskane wyniki z badań biochemicznych zestawiono w tabelach 9 i 10.

Tab. 9. Wskaźniki biochemiczne we krwi badanych szczurów (średnia ± SE)

		Kompleksy oxovanadu (IV)				
	Kontrola diabetyczna	M	F	B	H	V_3
Glukoza (mmol/L)	$36,3 \pm 1,9^{a,b}$	$32,9 \pm 1,6$	$34,6 \pm 5,1$	$31,2 \pm 0,9^{*a}$	$37,8 \pm 1,8$	$30,9 \pm 0,9^{*b}$
Cholesterol (mmol/L)	$1,8 \pm 0,1^{c,d}$	$1,7 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,1^{c}$	$1,6 \pm 0,1^{*b}$	$1,8 \pm 0,1^{d}$
HDL (mmol/L)	$1,03 \pm 0,07$	$0,99 \pm 0,05$	$0,88 \pm 0,12$	$1,04 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,03$	$1,01 \pm 0,08$
Triglycerydy (mmol/L)	$1,47 \pm 0,32$	$1,05 \pm 0,12$	$1,34 \pm 0,29$	$1,07 \pm 0,20$	$1,36 \pm 0,38$	$1,11 \pm 0,23$

* $p<0.05$, kontrolę stanowiły zwierzęta z wywołaną cukrzycą, którym nie podawano związków wanadu

a, b, c, d - grupy zwierząt pomiędzy, którymi istniały istotne różnice

Tab. 10. Wpływ badanych związków na masę ciała zwierząt w kolejnych dniach eksperymentu (średnia ± SD)

Dzień	**Kontrola diabetyczna**	**M**	**F**	**B**	**H**	V_3
0	$213,3 \pm 10,0$	$218,7 \pm 9,6$	$238,1 \pm 14,9$	$228,3 \pm 12,3$	$216,0 \pm 16,9$	$219,3 \pm 13,7$
3	$218,7 \pm 10,8$	$216,4 \pm 10,6$	$224,4 \pm 15,0$	$220,2 \pm 10,8$	$217,5 \pm 16,7$	$219,9 \pm 12,4$
7	$217,5 \pm 11,3$	$216,6 \pm 11,2$	$233,3 \pm 13,3$	$218,7 \pm 9,7$	$221,5 \pm 15,8$	$220,1 \pm 11,9$
10	$205,2 \pm 11,1$	$212,8 \pm 10,4$	$233,4 \pm 14,8$	$219,2 \pm 7,9$	$220,7 \pm 16,0$	$219,6 \pm 14,3$
14	$222,0 \pm 12,4$	$215,1 \pm 10,1$	$233,6 \pm 14,8$	$217,0 \pm 6,8$	$217,3 \pm 15,6$	$221,0 \pm 13,6$
17	$222,7 \pm 12,5$	$218,9 \pm 11,1$	$230,3 \pm 16,5$	$215,8 \pm 12,6$	$220,8 \pm 16,6$	$221,7 \pm 12,1$
21	$213,8 \pm 12,6$	$219,1 \pm 10,8$	$225,3 \pm 17,1$	$218,8 \pm 11,7$	$219,8 \pm 17,2$	$220,9 \pm 11,9$
24	$217,7 \pm 12,4$	$222,9 \pm 10,8$	$231,4 \pm 16,3$	$219,3 \pm 10,6$	$219,3 \pm 16,1$	$221,6 \pm 12,3$
28	$218,0 \pm 13,3$	$224,4 \pm 11,3$	$225,9 \pm 17,4$	$221,0 \pm 13,2$	$218,2 \pm 16,2$	$222,2 \pm 14,0$

Z 4 przebadanych nowych związków wanadu F, B, H tylko dwa a mianowicie B i V_3 wykazywały właściwości hipoglikemizujące. Obniżały on poziom glukozy we krwi szczurów, u których wywołano cukrzycę, nawet nieco silniej, niż związek odniesienia M. Związek M obniżał poziom glukozy u szczurów cukrzycowych jednakże nieistotnie statystycznie.

Związek H nie posiadał właściwości hipoglikemicznych, natomiast wpływał na obniżenie cholesterolu całkowitego.

Dla pozostałych parametrów biochemicznych (HDL i triglicerydy) oraz masy ciała nie zaobserwowano zmian statystycznie istotnych.

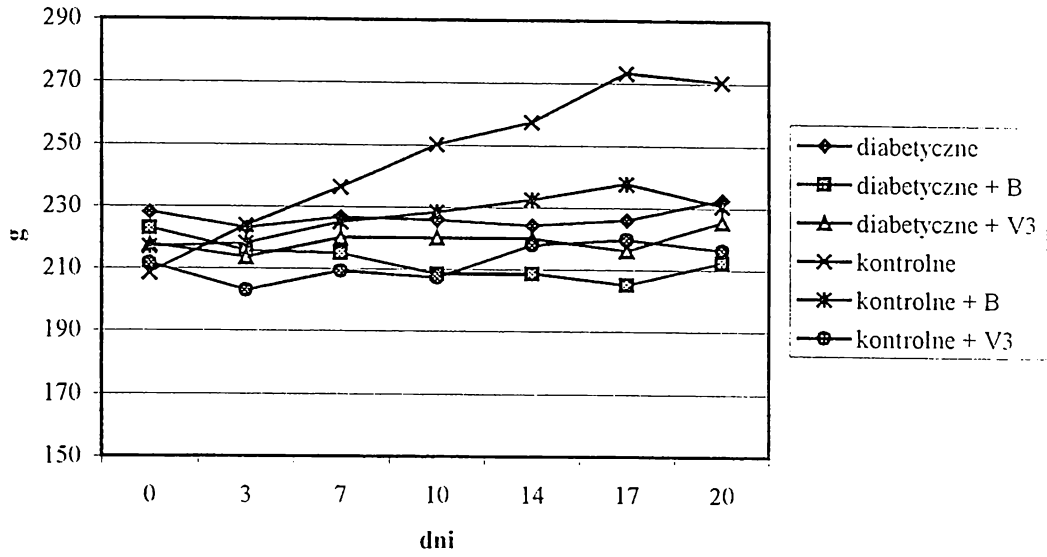
4.1.6.2 Etap II - Badanie wpływu najsilniej hipoglikemizujących związków wanadu (B i V_3) na parametry biochemiczne szczurów z wywołaną cukrzycą

Do badań II Etapu wybrano związek B i V_3, które w badaniach wstępnych wykazywały właściwości hipoglikemizujące.

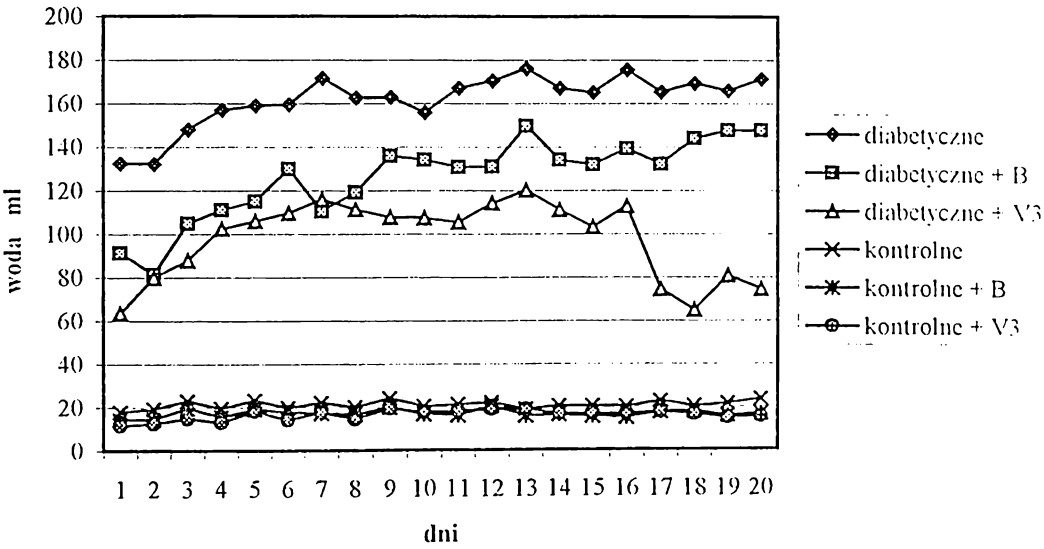
Metodyka badań

Badania biochemiczne były prowadzone w Montpellier w sposób analogiczny jak poprzednie w Polsce. Wykonano oznaczenia: glukozy, insuliny, mocznika, cholesterolu, triglicerydów. Dołączono również wyniki aktywności fosfatazy alkalicznej, AlAT, AspAT celem sprawdzenia ewentualnie hepatotoksycznego działania badanych związków.

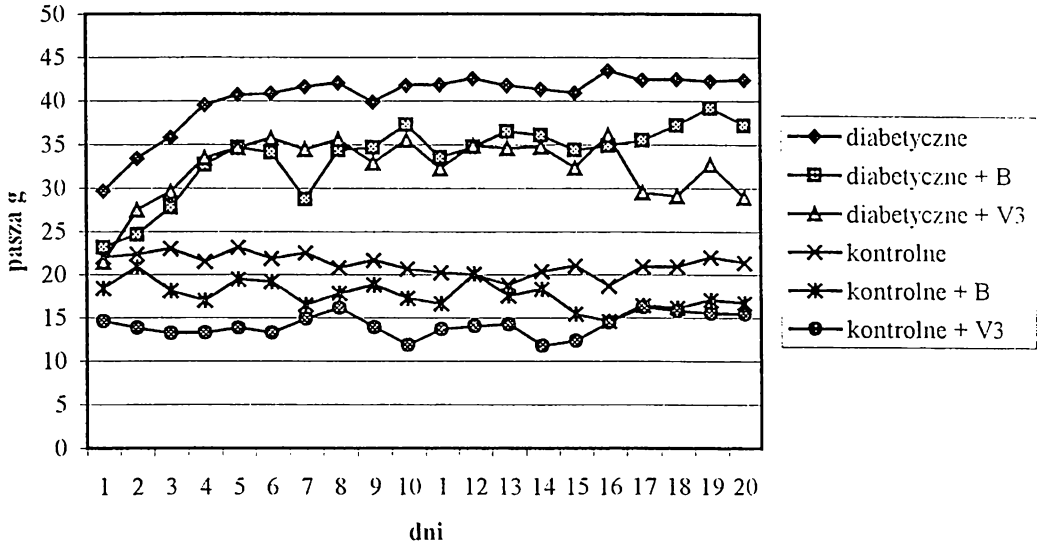
Uzyskane wyniki zestawiono poniżej na Rys. 24-28



Rys. 24. Średnie masy ciała szczurów diabetycznych i kontrolnych podczas trwania eksperymentu

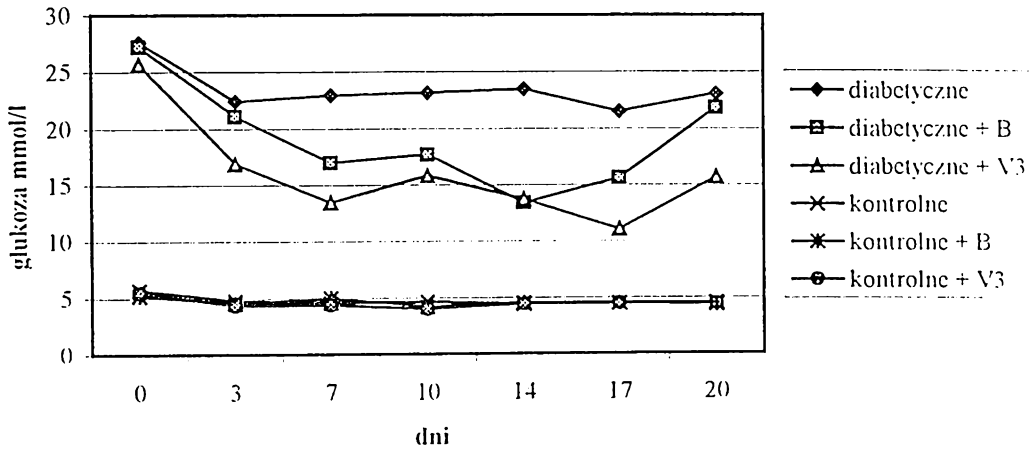


Rys. 25. Spożycie wody przez szczury w kolejnych dniach eksperymentu
(ml wody / dzień / szczura)

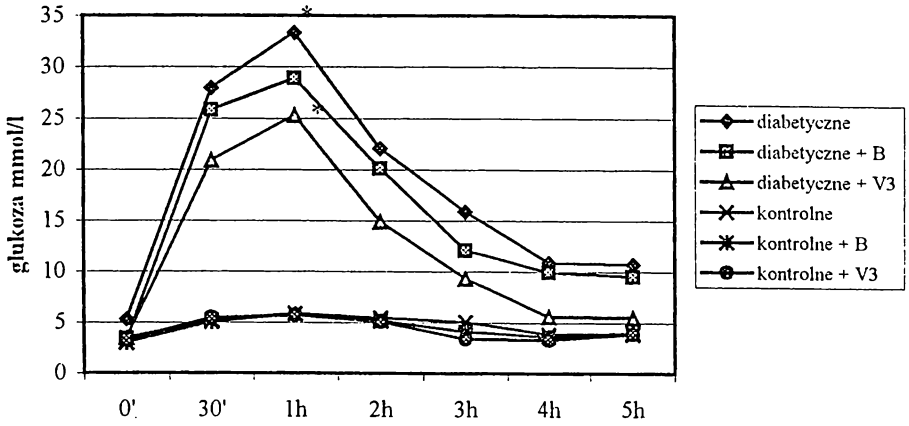


Rys. 26. Spożycie paszy przez szczury w kolejnych dniach eksperymentu

(g paszy / dzień / szczura



Rys. 27. Średnie stężenia glukozy we krwi szczurów diabetycznych i kontrolnych podczas trwania eksperymentu



Rys. 28. Stężenie glukozy mierzone glukometrem paskowym we krwi szczurów diabetycznych i zdrowych po obciążeniu glukozą 5g/kg masy ciała
* $p<0,05$

Po zakończeniu doświadczeń szczury dekapitowano i pobrano krew do oznaczeń biochemicznych oraz naczynia krwionośne krezki i nerkę do pomiarów morfometrycznych.

Wyniki badań biochemicznych zestawiono poniżej w tabeli 11.

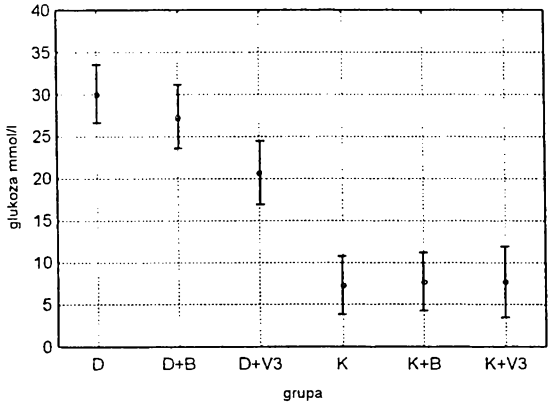
Tab. 11. Średnia wartość (±SE) badanych wskaźników dla poszczególnych grup zwierząt

	D N=6	D + B N=6	D + V_3 N=5	K N=6	K + B N=6	K + V_3 N=4
Glukoza mmol/l	30,08 ± 0,25	27,38 ± 2,63	20,73 ± 3,82	7,35 ± 0,22	7,75 ± 0,43	7,71 ± 0,13
Insulina ng/ml	0,687 ± 0,569	0,646 ± 0,602	1,054 ± 0,824	3,290 ± 3,154	0,687 ± 0,463	0,450 ± 0,218
Cholesterol mmol/l	1,709 ± 0,066	1,797± 0,087	1,860 ± 0,099	1,463 ± 0,087	1,653 ± 0,040	1,625 ± 0,126
Triglicerydy mmol/l	1,461 ± 0,075	1,148 ± 0,105	1,146 ± 0,229	1,038 ± 0,082	0,936± 0,160	1,023 ± 0,097
Mocznik mmol/l	0,808 ± 0,049	0,750 ± 0,072	0,740 ± 0,072	0,492 ± 0,033	0,464 ± 0,039	0,492 ± 0,035
fosfataza alkaliczna UI/l	510,7 ± 289,3	502,0 ± 175,4	203,0 ± 184,0	157,2 ± 31,1	123,3 ± 44,8	87,5 ± 13,8
AspAT UI/l	122,0 ± 38,7	137,6 ± 27,8	111,6 ± 33,6	153,2 ± 50,6	129,5 ± 50,6	158,0 ± 13,7
AlAT UI/l	134,7 ± 23,8	137,2 ± 29,0	97,6 ± 33,6	88,7 ± 7,5	85,5 ± 20,7	104,4 ± 20,1

D – kontrola (szczury z wywołaną cukrzycą) B – związek B
K – kontrola (szczury zdrowe) V_3 – związek V_3

Biblioteka CM UJ w Krakowie

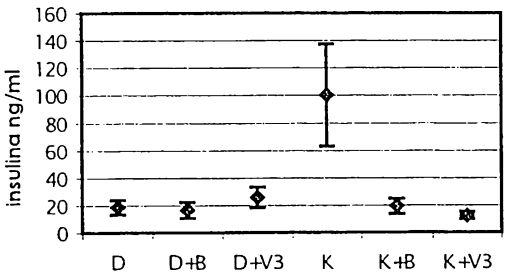
Wartości zebrane w tabeli 11 przedstawiono poniżej na rysunkach 29-36 wraz z oceną statystyczną istotności różnic.



Rys. 29. Średnie stężenie glukozy z 95% przedziałem ufności w surowicy szczurów w poszczególnych grupach zwierząt.

	D	D+B	$D+V_3$	K	K+B	$K+V_3$
D	-		0,0149	0,0001	0,0001	0,0001
D+B		-		0,0001	0,0001	0,0001
$D+V_3$	0,0149		-	0,0004	0,0005	0,0017
K	0,0001	0,0001	0,0004	-		
K+B	0,0001	0,0001	0,0005		-	
$K+V_3$	0,0001	0,0001	0,0017			-

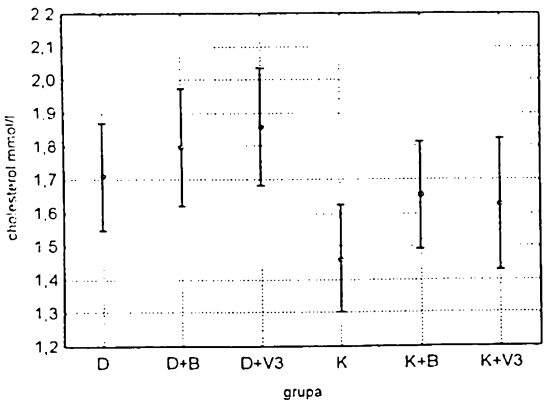
Poziom istotności różnic stężenia glukozy pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne



Rys. 30. % stężenia insuliny w surowicy szczurów w poszczególnych grupach zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej, dla której przyjęto wartość 100 % (± SE).

	D	D+B	$D+V_3$	K	K+B	$K+V_3$
D	-			0,0252		
D+B		-		0,0409		
$D+V_3$			-			
K	0,0252	0,0409		-	0,0270	0,0502
K+B				0,0270	-	
$K+V_3$				0,0502		-

Poziom istotności różnic stężenia insuliny pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.

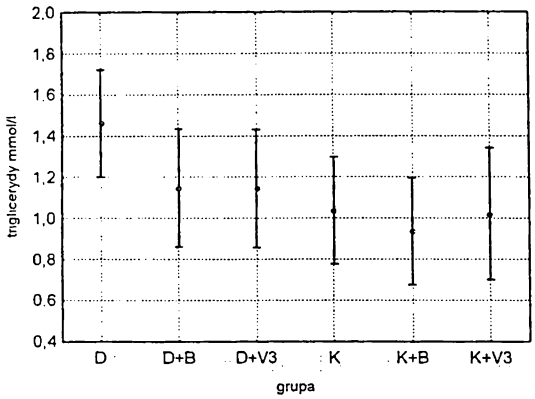


Rys. 31. Średnie stężenie cholesterolu z 95% przedziałem ufności w surowicy szczurów w poszczególnych grupach zwierząt.

	D	D+B	$D+V_3$	K	K+B	$K+V_3$
D	-					
D+B		-				
$D+V_3$			-	0,0322		
K			0,0322	-		
K+B					-	
$K+V_3$						-

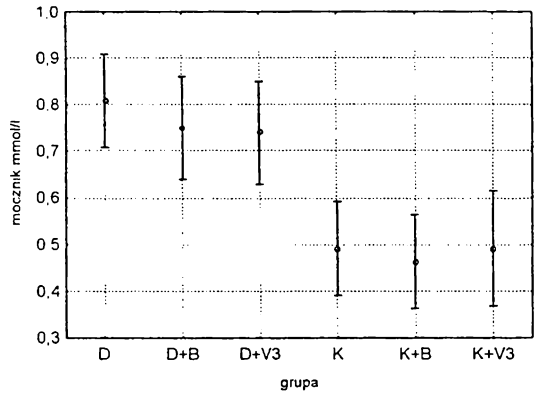
Poziom istotności różnic stężenia cholesterolu pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne

D – grupa diabetyczna
K- grupa kontrolna
B – badany związek B
V_3 - badany związek V_3



Rys. 32. Średnie stężenie triglicerydów z 95 % Przedziałem ufności w surowicy szczurów w poszczególnych grupach zwierząt

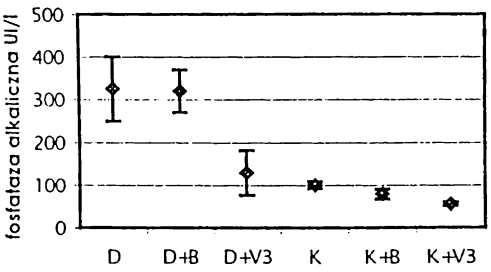
Brak różnic statystycznie istotnych



Rys. 33. Średnie stężenie mocznika z 95 % przedziałem ufności w surowicy szczurów w poszczególnych grupach zwierząt.

	D	D+B	$D+V_3$	K	K+B	$K+V_3$
D	-			0,0014	0,0006	0,0109
D+B		-		0,0237	0,0099	
$D+V_3$			-	0,0321	0,0136	
K	0,0014	0,0237	0,0321	-		
K+B	0,0006	0,0099	0,0136		-	
$K+V_3$	0,0109					-

Poziom istotności różnic stężenia mocznika pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.

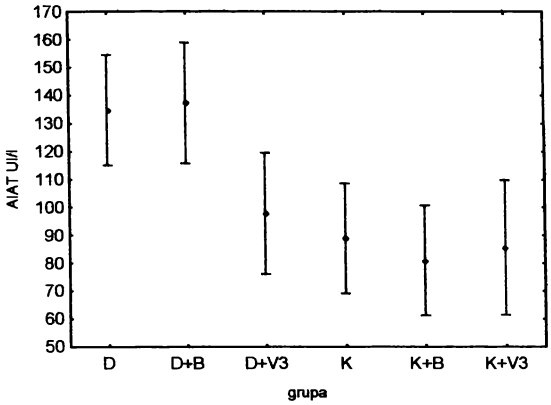


	D	D+B	$D+V_3$	K	K+B	$K+V_3$
D	-		0,0509	0,0104	0,0043	0,0127
D+B		-		0,0274	0,0127	0,0152
$D+V_3$	0,0509		-			
K	0,0104	0,0274		-		
K+B	0,0043	0,0127			-	
$K+V_3$	0,0127	0,0152				-

Rys. 34. % Aktywności fosfatazy alkalicznej w surowicy szczurów w poszczególnych grupach zwierząt w porównaniu do grupy kontrolnej, dla której przyjęto wartość 100 % (±SE).

Poziom istotności różnic aktywności fosfatazy alkalicznej pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.

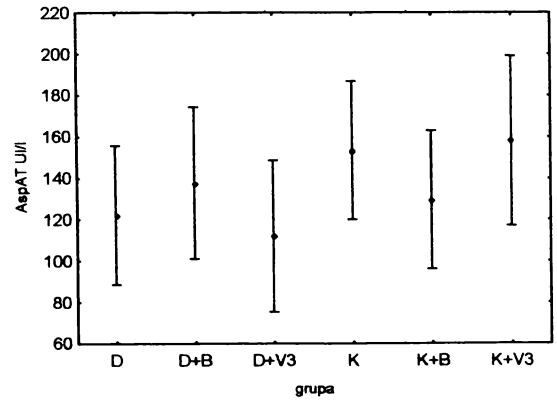
D – grupa diabetyczna B – badany związek B
K- grupa kontrolna V_3 - badany związek V_3



Rys. 35. Średnia aktywność AlAT z 95 % przedziałem ufności w surowicy szczurów w poszczególnych grupach zwierząt.

	D	D+B	D+V_3	K	K+B	K+V_3
D	-			0,0246	0,0061	
D+B		-		0,0327	0,0095	0,0462
D+V_3			-			
K	0,0246	0,0327		-		
K+B	0,0061	0,0095			-	
K+V_3		0,0462				-

Poziom istotności różnic aktywności AlAT pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.



Rys. 36. Średnie aktywność AspAT z 95 % przedziałem ufności w surowicy szczurów w poszczególnych grupach zwierząt

Brak różnic statystycznie istotnych

D – grupa diabetyczna
K- grupa kontrolna
B – badany związek B
V_3 - badany związek V_3

Powyżej zestawione wyniki badań wskazują na:

- Znamienne obniżenie poziomu glukozy u zwierząt cukrzycowych zaobserwowano od 6 dnia dla grupy zwierząt, którym podawano związek B i od 2 dnia dla grupy ze związkiem V_3. Dla tej ostatniej grupy utrzymywało się ono do końca eksperymentu zaś dla związku B wzrastało od początku czwartego tygodnia (Rys. 27).
- Szczury cukrzycowe, którym podawano związek V_3 tolerowały znacznie lepiej (statystycznie istotnie) obciążenie glukozą (Rys. 28).
- Hypoglikemia spowodowała śmierć 2 szczurów z grupy zdrowych, którym podawano V_3.
- Stężenie insuliny u szczurów cukrzycowych było niskie bez względu na to czy zwierzęta dostawały związki wanadu czy też nie. U zwierząt zdrowych, którym podawano związki B lub V_3 poziom insuliny obniżał się (Rys. 30).
- U zwierząt, którym podawano testowane związki B i V_3 obserwowano podwyższenie stężenia cholesterolu, jednakże tylko dla związku V_3, było ono istotne statystycznie (Rys. 31).
- Stężenia triglicerydów w surowicy badanych zwierząt nie różniły się istotnie (Rys. 32).
- Badane związki nie miały wpływu na stężenie mocznika zarówno w grupie kontrolnej jak i diabetycznej (Rys. 33)
- Aktywności fosfatazy alkalicznej i AlAT były podwyższone u zwierząt diabetycznych a prawidłowe u zwierząt cukrzycowych, którym podawano związek V_3 (Rys. 34 i 35).
- Aktywność AspAT była zróżnicowana we wszystkich grupach, ale różnice te nie były istotne statystycznie (Rys. 36).
- Masa ciała zwierząt była porównywalna we wszystkich grupach szczurów, poza grupą kontrolną, gdzie stale rosła (Rys. 24).
- Spożycie wody i paszy było najwyższe u szczurów diabetycznych. Podanie związku B a zwłaszcza V_3 tym szczurom obniżało spożycie wody (Rys. 25i 26).

Podsumowując tę część badań można wyciągnąć następujące wnioski:

- ✓ Wszystkie badane kompleksowe związki wanadu F, B, H, V_3 wykazywały niższą toksyczność ostrą niż związek odniesienia M, uznawany dotąd za połączenie o najkorzystniejszych właściwościach hipoglikemizujących u szczurów.
- ✓ Z czterech nowo zsyntetyzowanych związków wanadu tylko dwa (B i V_3) obniżały stężenie glukozy we krwi szczurów diabetycznych. Jednakże obniżka ta była statystycznie istotna tylko w przypadku związku V_3.
- ✓ Związek V_3 wpływał również korzystnie na obniżenie aktywności fosfatazy alkalicznej i AlAT u szczurów cukrzycowych.

Dyskusja nad I i II etapem badań biochemicznych

W szeregu badaniach naukowych wykazano, że wanad wpływa hipoglikemizująco na gospodarkę węglowodanową w obu typach cukrzycy zarówno u zwierząt doświadczalnych jak i u ludzi [Boden i współ., 1996, Thompson, 1999, Srivastava, 2000]. W badaniach tych testowano różne związki wanadu, między innymi połączenia kompleksowe takie jak: BMOV - bis(maltolano)oksowanad(IV), VPA – bis(metylopikolino)oksowanad(IV), VO-MPA – kompleks wanadylowy z estrem metylowym cysteiny, VCME – bis(N-cysteinamido) oksowanad(IV), Naglivan – bis(N-oktylocysteinamido)oksowanad(IV), VO-SALEN - 2,2'-[etano-1,2-diylobis (nitrylometylideno)difenolooksowanad(IV), BAOV – oksobis (pentano-2,4-diono)wanad (IV), DPOV – oksobis(pikolino)wanad(IV) [Cam i współ. 1993, Yuen i współ.1995, Orwig i współ.1999, Thompson i współ. 1999, Crans 2000]. Związki te podawano w dawkach 0,1-0,7 mmol/kg masy ciała na dzień w wodzie do picia lub dożołądkowo. Uzyskane wyniki wskazywały na działanie hipoglikemizujące tych połączeń. Równocześnie obserwowano jednak skutki uboczne w postaci biegunki, odwodnienia czy też toksycznego wpływu na wątrobę i nerki.

Celem niniejszych badań było zatem poszukiwanie nowych związków wanadu o korzystniejszym działaniu farmakologicznym.

Z przetestowanych 4 nowych organicznych kompleksów wanadu (F, B, H, V_3) wszystkie posiadały niższą toksyczność ostrą od związku wzorcowego (M).

Dwa z nich (B i V_3) wykazały działanie hipoglikemizujące. Związek V_3 powodował statystycznie istotne obniżenie poziomu glukozy u szczurów z wywołaną cukrzycą podczas całego okresu prowadzenia eksperymentu, zaś związek B tylko w trzech pierwszych tygodniach.

Należy podkreślić, że obserwowany wpływ badanych związków B i V_3 na poziom glukozy występował przy niższych dawkach (0,07 oraz 0,08 mmol V/kg masy ciała na dzień odpowiednio), niż w przytoczonych powyżej badaniach, w których podawano wanad w ilości 0,1-0,7 mmol/kg masy ciała na dzień.

Według Crans'a (2000) badane przez niego związki wanadu obniżały poziom glukozy we krwi szczurów, lecz nie doprowadzały do całkowitej jej normalizacji. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają te spostrzeżenia.

Oprócz badania wpływu nowych kompleksów wanadu (B i V_3) na stężenie glukozy u szczurów, analizowano również ich wpływ na poziom insuliny. U szczurów z indukowaną cukrzycą, u których STZ zniszczyła komórki β trzustki stężenie insuliny było bardzo niskie bez względu na to, czy zwierzęta otrzymywały związki wanadu. Zastosowano w tej pracy dawkę 55 mg STZ/kg masy ciała, która nie niszczy doszczętnie komórek β, ponieważ przy wyższych dawkach STZ często brak było odpowiedzi na stosowane związki u szczurów diabetycznych. Niskie stężenie insuliny we krwi zwierząt diabetycznych jest zgodne z oczekiwaniami zakładającymi, iż związki wanadu nie wpływają na odbudowę komórek β, a przez to nie zwiększają wydzielania insuliny.

Jednakże otrzymano bardzo interesujące wyniki dotyczące stężenia insuliny u szczurów zdrowych, którym podawano związki wanadu B i V_3. W stosunku do kontrolnych zdrowych szczurów zaobserwowano istotne obniżenie poziomu insuliny w ich krwi. Może to wskazywać na to, że wanad nie zastępuje insuliny lecz zwiększa czułość odpowiednich tkanek na niskie stężenie insuliny a przez to zmniejsza się jej wydzielanie. Ta hipoteza byłaby możliwa do weryfikacji przez analizę wydzielania C peptydu ale możliwości oznaczenia tego peptydu nie miałem.

Podobne spostrzeżenia znaleziono w pracach innych autorów. Shafrir i współ. (2001) obserwowali obniżenie wydzielania insuliny u szczurów piaskowych *Psammomys obesus* z cukrzycą wywołaną dietą wysokoenergetyczną. Również Srivastava (2000) przytacza wyniki innych autorów, którzy stwierdzili obniżenie stężenia insuliny u szczurów fa/fa Zucker, u myszy db/db lub ob/ob., którym podawano związek M lub ortowanadan sodu. Cytuje on także badania wykonane u ludzi z cukrzycą typu II, którym podawano siarczan wanadu i uzyskano obniżenie oporności na insulinę.

Podwyższone stężenie mocznika we krwi szczurów cukrzycowych należy wiązać ze zmianami wywołanymi cukrzycą i STZ. W niniejszej pracy nie zaobserwowano zmian w stężeniu mocznika we krwi szczurów, którym podawano testowane związki wanadu (B i V_3). Dane te są odmienne od wyników pracy Domingo (1991), który stwierdził, że nieorganiczne związki wanadu podnosiły stężenie mocznika i kreatyniny.

Wpływ badanych związków wanadu na gospodarkę lipidową był różny w zależności od związku. Z jednej strony obserwowano obniżenie poziomu cholesterolu u zwierząt cukrzycowych, którym podawano związek H, natomiast w przypadku związku V_3 następowało jego podwyższenie. Być może uzyskany wynik zależał nie tylko od samego wanadu ale i jego ligandu. W pracach podawanych przez niektórych autorów [Hopkins i współ. 1974, Mongold i współ. 1990, Poucheret i współ. 2000] wanad jest spostrzegany jako czynnik obniżający poziom cholesterolu. Inni autorzy Nielsen (1973), Nielsen i współ. (1974) mówią o wzroście poziomu cholesterolu u kurcząt po 49 dniach podawania im związków wanadu.

Ponadto obserwowano obniżenie, jednak statystycznie nieistotne poziomu triglicerydów u szczurów cukrzycowych, którym podawano związki wanadu. Wyniki te są podobne do danych uzyskanych w pracy Kordowiak (1997)

Aby wykluczyć ewentualny toksyczny wpływ wanadu na hepatocyty przebadano aktywność fosfatazy alkalicznej, AlAT i AspAT. Nie zaobserwowano wzrostu aktywności tych enzymów u zwierząt, którym podawano związki wanadu, niezależnie czy była to grupa zwierząt diabetycznych czy też zdrowych. Wyniki te są zgodne z pracą Bishayee i współ. (1995). Co więcej u zwierząt diabetycznych, u których aktywność fosfatazy alkalicznej i AlAT była podwyższona (co raczej należy wiązać z toksycznym działaniem STZ), związek V_3 powodował istotne obniżenie aktywności obu tych enzymów.

Wnioski końcowe

Z czterech nowych syntetycznych kompleksów zawierających wanad na +4 i +5 stopniu utlenienia, dwa (B i V_3) charakteryzowały się działaniem hipoglikemizującym z tym, że najaktywniejszy okazał się związek V_3 zawierający wanad +5.

Oba związki wykazały niższą toksyczność ostrą od związku wzorcowego M.

4.1.7 Wpływ najsilniej hipoglikemizujących związków wanadu (B i V_3) na wskaźniki morfologiczne tętnic krezki oraz kłębuszków nerkowych szczurów

Długotrwała cukrzyca wywołuje zmiany naczyniowe przejawiające się mikro- i makroangiopatią w wielu tkankach i narządach.

W badaniach na zwierzętach, którym podano streptozotocynę (STZ) występowały również zmiany w naczyniach krwionośnych charakterystyczne dla cukrzycy [Brooks i współ. 1989, Trinder i współ. 1994].

W doświadczeniu tym postanowiono sprawdzić czy u zwierząt diabetycznych i zdrowych, którym podawano testowane związki wanadu, będą obserwowane zmiany w obrazie mikroskopowym tętniczek krezki i kłębuszków nerkowych i jaki będzie dynamizm tych zmian.

Metodyka

Po dekapitacji szczurów użytych w drugim etapie badań biochemicznych, pobierano do badań morfometrycznych krezkę oraz lewą nerkę. Następnie wypreparowany organ układano na szalce Petriego, zalewano utrwalaczem Bouin'a (nasycony kwas pikrynowy – 60 ml, formaldehyd – 20 ml i lodowaty kwas octowy 4 ml) na okres 6 godzin po czym preparat przemywano 3 krotnie alkoholem etylowym 70% co 10 min. W ten sposób przygotowane praparaty zanurzone w 70% alkoholu etylowym przewożono do SANOFI-synthelabo w celu pocięcia na mikrotronie i wybarwienia. Preparaty cięto na skrawki grubości 3 μm, odcięte około 5 mm od zewnętrznej krawędzi preparatu. Pocięte skrawki wybarwiano metodą PAS (w pierwszym etapie reakcji 1% kwasem nadjodowym a następnie odczynnikiem Schiffa), by uwidocznić warstwy elastyczne naczyń. Gotowe preparaty oglądano pod mikroskopem sprzężonym z kamerą video podłączoną do komputera z oprogramowaniem umożliwiającym automatyczne obliczanie powierzchni i odległości i opisywano po 4-9 tętniczek krezkowych (tyle ile było widocznych w preparacie) oraz po 25 kłębuszków nerkowych w każdym preparacie.

W preparatach kreski mierzono średnicę małą (SM) wyznaczoną w środku światła tętniczki, prostopadłą do średnicy dużej, powierzchnię światła tętniczki (PST), powierzchnię mięśniówki wraz ze światłem tętniczki (PMST) oraz powierzchnię całej

tętniczki (PCT), liczbę jąder mięśniówki (LJM) oraz liczbę jąder przydanki naczyniowej (LJPN). Pozostałe parametry zostały wyliczone z wcześniej uzyskanych wyników. Były nimi: powierzchnia ściany naczynia (PSN=PCT-PST), powierzchnia przydanki naczyniowej (PPN=PCT-PMST), powierzchnia mięśniówki (PM=PMST-PST), gęstość jąder mięśniówki (GJM=LJM/PM), gęstość jąder przydanki naczyniowej (GJPN=LJPN/PPN). Dodatkowo zlogarytmowano następujące parametry: wszystkie powierzchnie (PST, PMST, PCT, PSN, PPN, PM) oraz liczbę jąder (LJM, LJPN). Wartości te zlogarytmowano, aby uzyskać rozkład normalny danych.

W przypadku preparatów nerki oceniano powierzchnię całego kłębuszka nerkowego (PCK), jego część kłębuszkową (PK), średnicę małą (SM), liczbę jąder w kłębuszku (LJK) oraz liczbę jąder na obrzeżach kłębuszka (LJOK). Z uzyskanych wcześniej wyników obliczono przestrzeń wokołokłębuszkową (PWK), gęstość jąder w kłębuszku (GJK), gęstość jąder na obrzeżach kłębuszka (GJOK). Tak samo jak w przypadku tętniczek krezki uzyskane wartości zlogarytmowano i poddano analizie statystycznej. Dotyczyło to powierzchni całego kłębuszka nerkowego (Log PCK), jego część kłębuszkowej (Log PK), liczby jąder w kłębuszku (Log LJK), liczby jąder na obrzeżach kłębuszka (Log LJOK) i przestrzeni wokołokłębuszkowej (Log PWK).

Wykaz parametrów mierzonych w preparatach krezki:

średnica mała (SM) (Fot. 2)

powierzchnia światła tętniczki (PST) (Fot. 3)

powierzchnia mięśniówki wraz ze światłem tętniczki (PMST) (Fot. 3)

powierzchnia całej tętniczki (PCT) (Fot. 3)

powierzchnia ściany naczynia (PSN)

powierzchnia przydanki naczyniowej (PPN)

powierzchnia mięśniówki (PM)

liczba jąder mięśniówki (LJM) (Fot. 4)

liczba jąder przydanki naczyniowej (LJPN) (Fot. 5)

gęstość jąder mięśniówki (GJM)

gęstość jąder przydanki naczyniowej (GJPN)

Wykaz parametrów mierzonych w preparatach nerki:

średnica mała (SM) (Fot. 7)

powierzchnię całego kłębuszka nerkowego (PCK) (Fot. 7)

powierzchnia kłębuszka nerkowego (PK) (Fot. 8)

przestrzeń wokołokłębuszkowa (PWK)

liczba jąder w kłębuszku (LJK) (Fot. 9)

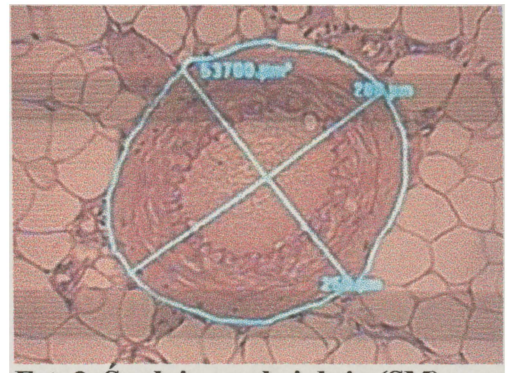
liczbę jąder na obrzeżach kłębuszka (LJOK) (Fot. 10)

gęstość jąder w kłębuszku (GJK)

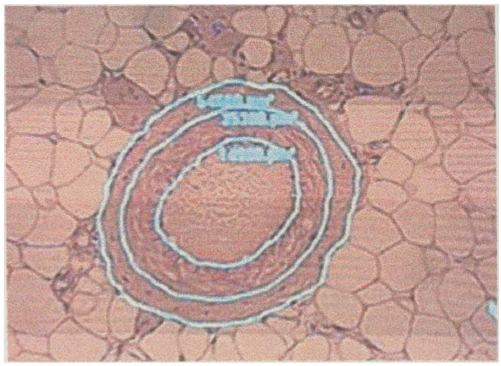
gęstość jąder na obrzeżach kłębuszka (GJOK)

Poniżej zestawiono mikrofotografie (Fot. 1-5) tętniczki krezkowej przedstawiające parametry, które były mierzone w preparatach

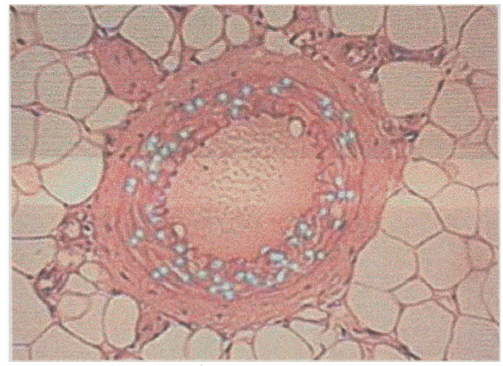
Fot. 1. Tętniczka krezki



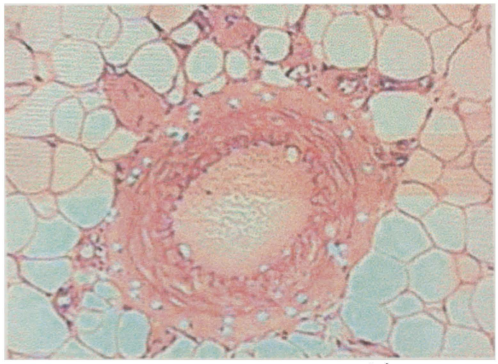
Fot. 2. Średnica mała i duża (SM)



Fot. 3. powierzchnia światła (PST), światła + mięśniówki (PMST), całej tętniczki (PCT)



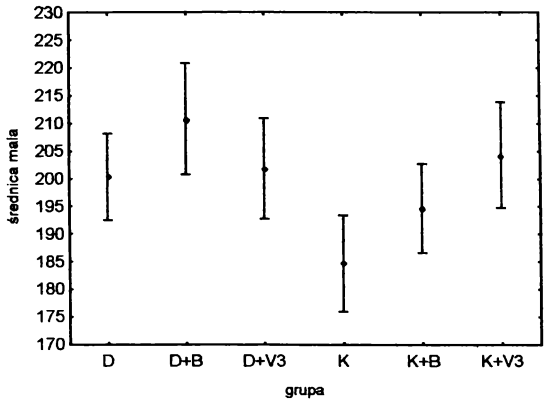
Fot. 4. liczba jąder mięśniówki (LJM)



Fot. 5. Liczba jąder przydanki naczyniowej (LJPN)

Wyniki dla krezki:

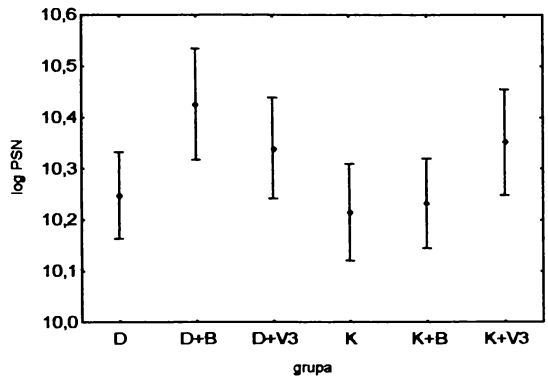
Poniżej przedstawiono uzyskane wyniki.



Rys. 37. Średnia średnicy małej SM z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt.

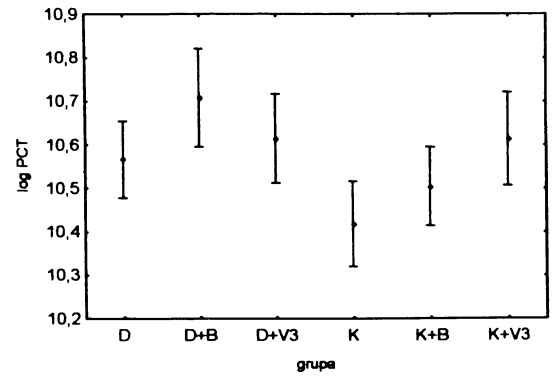
	D	D+B	D+V_3	K	K+B	K+V_3
D	-					
D+B		-		0,0038		
D+V_3			-			
K		0,0038		-		0,0460
K+B					-	
K+V_3				0,0460		-

Poziom istotności różnic średnicy małej SM pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.



Rys. 38. Średnia log PSN z 95 % przedziałem ufności w poszczególnychgrupach zwierząt.

brak różnic statystycznie istotnych

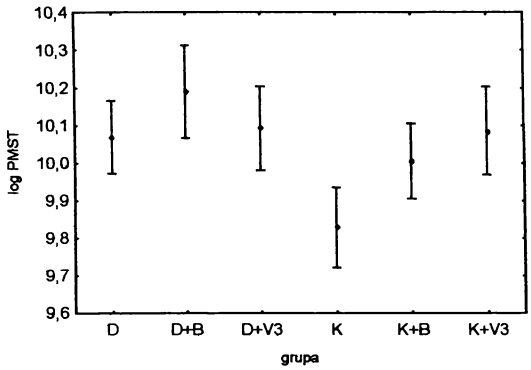


Rys. 39. Średnia log PCT z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt

	D	D+B	D+V_3	K	K+B	K+V_3
D	-					
D+B		-		0,0045		
D+V_3			-			
K		0,0045		-		
K+B					-	
K+V_3						-

Poziom istotności różnic log PCT pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.

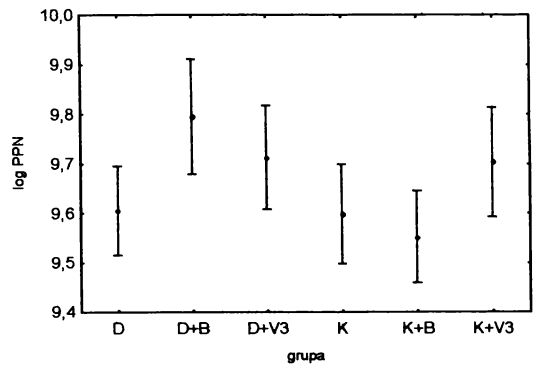
D – grupa kontrolna diabetyczna
K- grupa kontrolna zdrowa
B – badany związek B
V_3 - badany związek V_3



	D	D+B	$D+V_3$	K	K+B	$K+V_3$
D	-			0,0218		
D+B		-		0,0006		
$D+V_3$			-	0,0132		
K	0,0218	0,0006	0,0132	-		0,0267
K+B					-	
$K+V_3$				0,0267		-

Rys. 40. Średnia log PMST z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt .

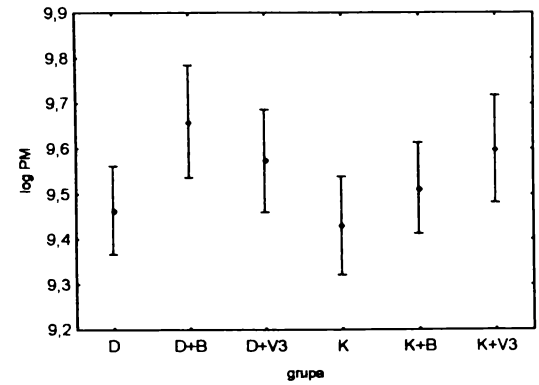
Poziom istotności różnic log PMST pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.



	D	D+B	$D+V_3$	K	K+B	$K+V_3$
D	-					
D+B		-			0,0413	
$D+V_3$			-			
K				-		
K+B		0,0413			-	
$K+V_3$						-

Rys. 41. Średnia log PPN z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt.

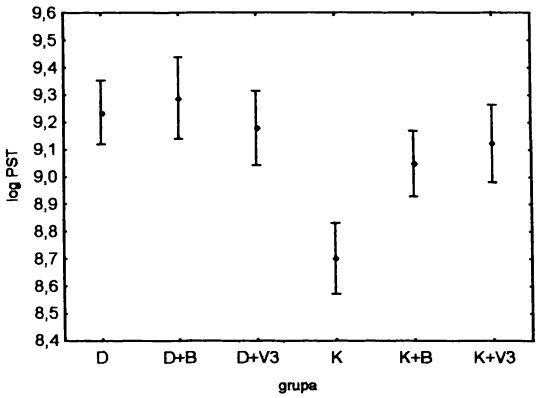
Poziom istotności różnic log PPN pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.



Rys. 42. Średnia log PM z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt.

brak różnic statystycznie istotnych

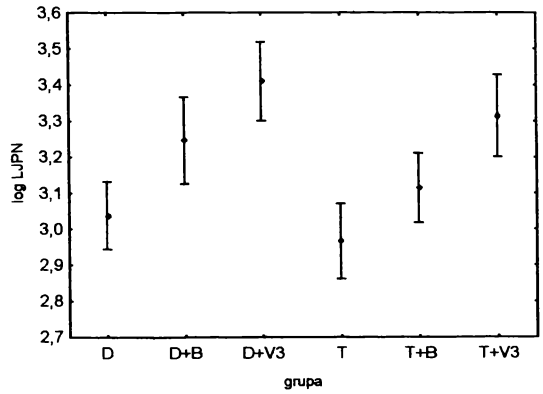
D – grupa kontrolna diabetyczna
K- grupa kontrolna zdrowa
B – badany związek B
V_3 - badany związek V_3



Rys. 43. Średnia log PST z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt .

	D	D+B	$D+V_3$	K	K+B	$K+V_3$
D	-			0,0001		
D+B		-		0,0001		
$D+V_3$			-	0,0001		
K	0,0001	0,0001	0,0001	-	0,0026	0,0005
K+B				0,0026	-	
$K+V_3$				0,0005		-

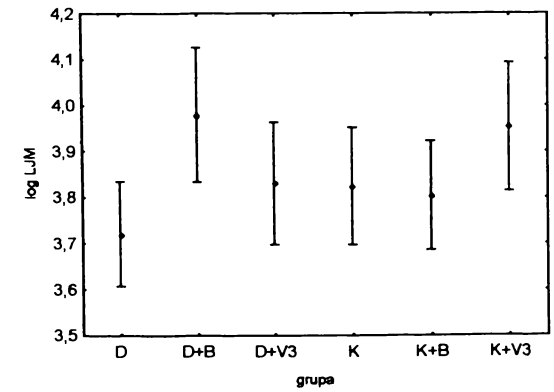
Poziom istotności różnic log PST pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.



Rys. 44. Średnia log LJPN z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt .

	D	D+B	$D+V_3$	K	K+B	$K+V_3$
D	-		0,0001			0,0093
D+B		-		0,0140		
$D+V_3$	0,0001		-	0,0001	0,0022	
K		0,0140	0,0001	-		0,0003
K+B					-	
$K+V_3$	0,0093			0,0003		-

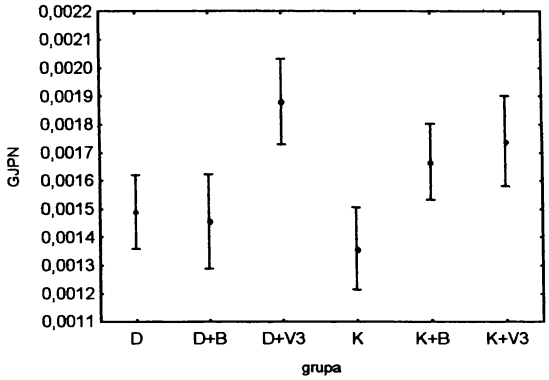
Poziom istotności różnic log LJPN pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.



Rys. 45. Średnia log LJM z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt.

brak różnic statystycznie istotnych

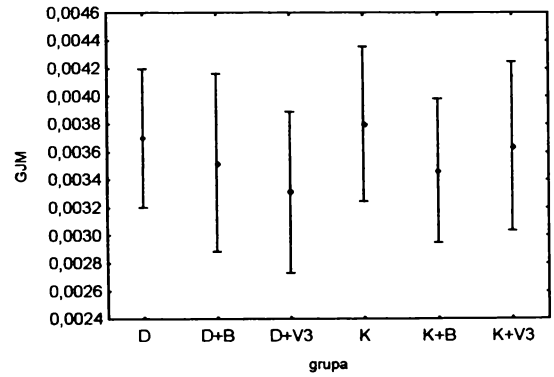
D – grupa kontrolna diabetyczna
K- grupa kontrolna zdrowa
B – badany związek B
V_3 - badany związek V_3



	D	D+B	D+V_3	K	K+B	K+V_3
D	-		0,0049			
D+B		-	0,0057			
D+V_3	0,0049	0,0057	-	0,0001		
K			0,0001	-	0,0370	0,0102
K+B				0,0370	-	
K+V_3				0,0102		-

Rys. 46. Średnia GJPN z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt .

Poziom istotności różnic GJPN pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.



Rys. 47. Średnia GJM z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt.

brak różnic statystycznie istotnych

D – grupa kontrolna diabetyczna
K- grupa kontrolna zdrowa
B – badany związek B
V_3 - badany związek V_3

- Przy porównaniu tętniczek krezki u zwierząt diabetycznych i zdrowych zaobserwowano statystycznie istotny wzrost średnicy małej (SM) (Rys. 37), powierzchni światła tętniczki (PST) (Rys. 43), powierzchni mięśniówki wraz ze światłem tętniczki (PMST) (Rys. 40)
- U zwierząt diabetycznych, zaobserwowano wzrost parametrów związanych z wielkością tętniczek, wyraźny po podaniu związku B (Rys. 37-43) oraz słabszy w przypadku związku V_3 (Rys. 37-43). Różnice te nie były jednakże istotne statystycznie.
- U zwierząt diabetycznych, którym podawano związek V_3 stwierdzono statystycznie istotny wzrost liczby jąder przydanki naczyniowej (LJPN) (Rys. 44) oraz gęstości jąder przydanki naczyniowej (GJPN) (Rys. 46)
- U zwierząt zdrowych, którym podawano związek B zaobserwowano statystycznie istotny wzrost powierzchni światła tętniczki (PST) (Rys. 43) oraz gęstości jąder przydanki naczyniowej (GJPN) (Rys. 46)
- U zwierząt zdrowych, którym podawano związek V_3 stwierdzono statystycznie istotny wzrost średnicy małej tętniczki (SM) (Rys. 37), powierzchni światła tętniczki (PST) (Rys. 43), powierzchni mięśniówki wraz ze światłem tętniczki (PMST) (Rys. 40) a także liczby jąder przydanki naczyniowej (LJPN) (Rys. 44), gęstość jąder przydanki naczyniowej (GJPN) (Rys. 46).
- Nie zaobserwowano zmian w gęstości jąder mięśniówki (GJM) (Rys. 47) pomiędzy poszczególnymi grupami szczurów

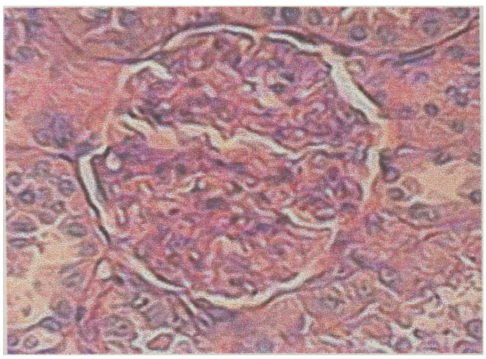
Wnioski

U zwierząt cukrzycowych tętniczki krezki były poszerzone. Podanie tym szczurom związku B lub V_3 powodowało dalsze poszerzenie tych tętniczek, jednakże efekt ten nie był istotny statystycznie.

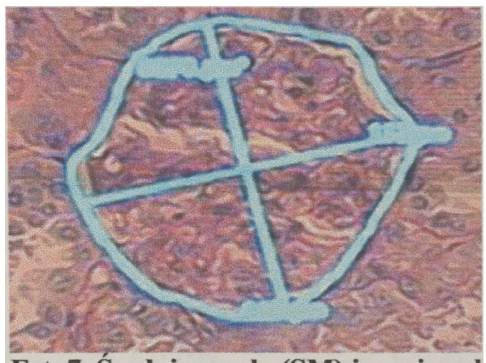
U szczurów zdrowych wykazano istotne działanie wazodylatacyjne badanych kompleksów wanadu (B i V_3).

Ponadto zarówno u szczurów cukrzycowych jak i zdrowych testowane związki wanadu powodowały wzrost proliferacji jąder przydanki naczyniowej.

Poniżej zestawiono mikrofotografie (Fot. 6-10) kłębuszka nerkowego przedstawiające parametry, które były mierzone w preparatach

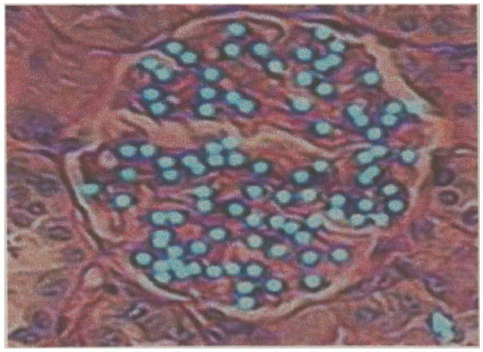


Fot. 6. Kłębuszek nerkowy

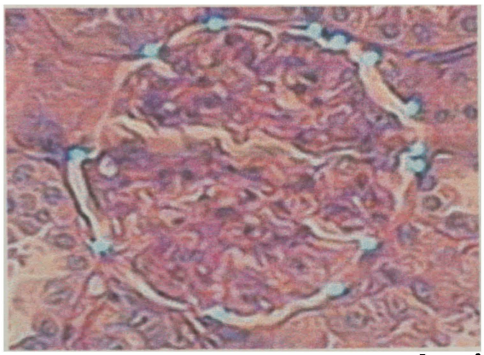


Fot. 7. Średnica mała (SM) i powierzchnia całego kłębuszka (PCK)

Fot. 8. Powierzchnia kłębuszka (PK)



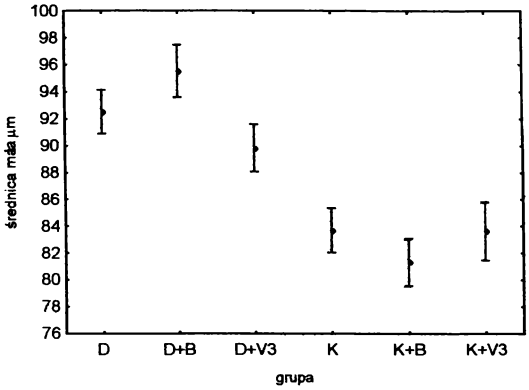
Fot. 9. liczba jąder w kłębuszku (LJK)



Fot. 10. liczba jąder na obrzeżach kłębuszka (LJOK)

Wyniki dla nerki:

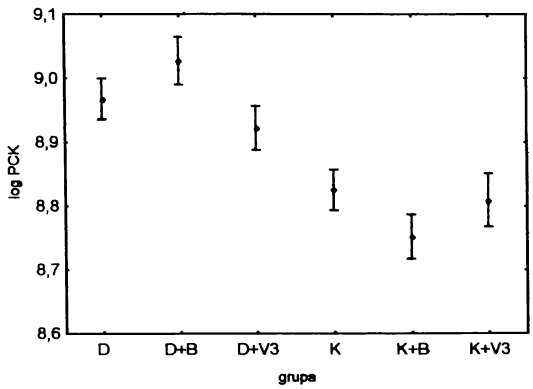
Poniżej przedstawiono uzyskane wyniki.



Rys. 48. Średnia średnicy małej SM z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt.

	D	D+B	$D+V_3$	K	K+B	$K+V_3$
D	-			0,0001	0,0001	0,0001
D+B		-	0,0006	0,0001	0,0001	0,0001
$D+V_3$		0,0006	-	0,0001	0,0001	0,0011
K	0,0001	0,0001	0,0001	-		
K+B	0,0001	0,0001	0,0001		-	
$K+V_3$	0,0001	0,0001	0,0011			-

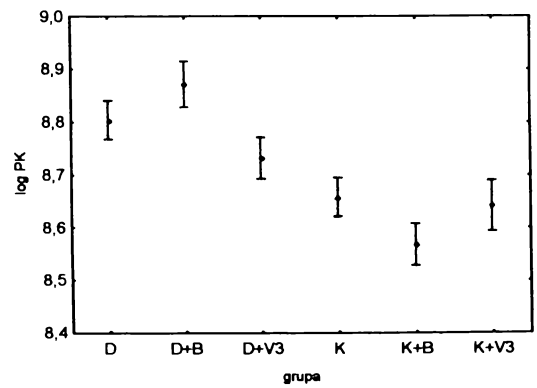
Poziom istotności różnic średnicy małej pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.



Rys. 49. Średnia Log PCK z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt.

	D	D+B	$D+V_3$	K	K+B	$K+V_3$
D	-			0,0001	0,0001	0,0001
D+B		-	0,0013	0,0001	0,0001	0,0001
$D+V_3$		0,0013	-	0,0011	0,0001	0,0027
K	0,0001	0,0001	0,0011	-	0,0387	
K+B	0,0001	0,0001	0,0001	0,0387	-	
$K+V_3$	0,0001	0,0001	0,0027			-

Poziom istotności różnic Log PCK pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.

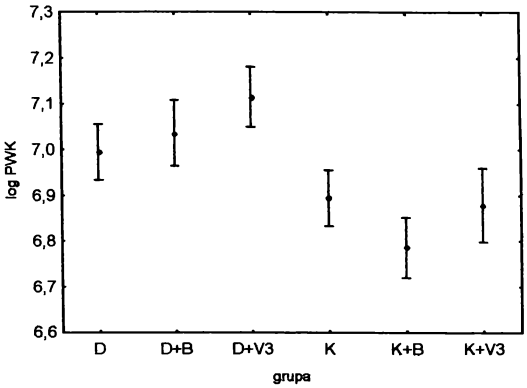


Rys. 50. Średnia Log PK z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt .

	D	D+B	$D+V_3$	K	K+B	$K+V_3$
D	-			0,0001	0,0001	0,0001
D+B		-	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
$D+V_3$		0,0001	-		0,0001	
K	0,0001	0,0001		-	0,0180	
K+B	0,0001	0,0001	0,0001	0,0180	-	
$K+V_3$	0,0001	0,0001				-

Poziom istotności różnic Log PK pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.

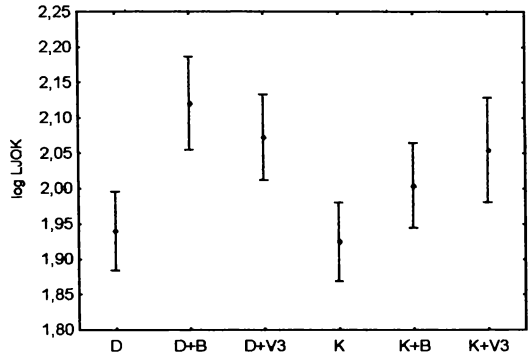
D – grupa kontrolna diabetyczna
K- grupa kontrolna zdrowa
B – badany związek B
V_3 - badany związek V_3



	D	D+B	D+V_3	K	K+B	K+V_3
D	-				0,0002	
D+B		-			0,0001	
D+V_3			-	0,0001	0,0001	0,0007
K			0,0001	-		
K+B	0,0001	0,0001	0,0001		-	
K+V_3			0,0007			-

Rys. 51. Średnia Log PWK z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt .

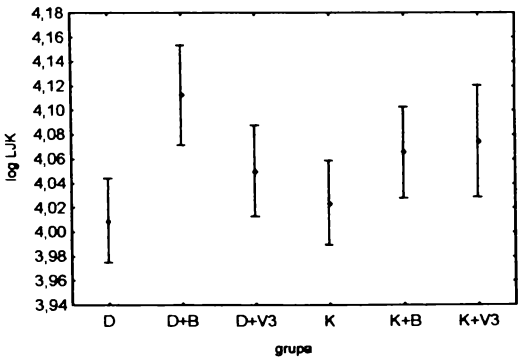
Poziom istotności różnic Log PWK pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.



	D	D+B	D+V_3	K	K+B	K+V_3
D	-	0,0031				
D+B	0,0031	-		0,0004		
D+V_3			-	0,0154		
K		0,0004	0,0154	-		
K+B					-	
K+V_3						-

Rys. 52. Średnia Log LJOK z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt .

Poziom istotności różnic Log LJOK pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.



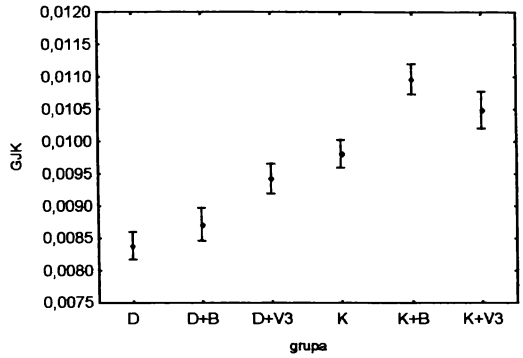
	D	D+B	D+V_3	K	K+B	K+V_3
D	-	0,0067				
D+B	0,0067	-		0,0343		
D+V_3			-			
K		0,0343		-		
K+B					-	
K+V_3						-

Rys. 53. Średnia Log LJK z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt

Poziom istotności różnic Log LJK pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.

D – grupa kontrolna diabetyczna
K- grupa kontrolna zdrowa

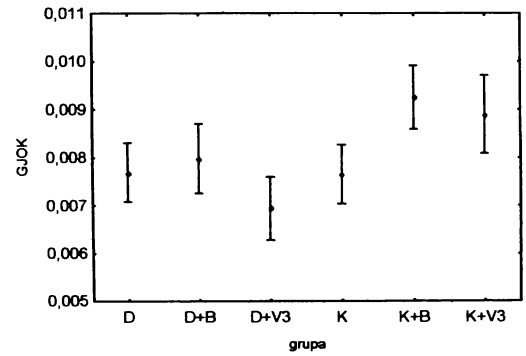
B – badany związek B
V_3 - badany związek V_3



	D	D+B	D+V_3	K	K+B	K+V_3
D	-		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
D+B		-	0,0016	0,0001	0,0001	0,0001
D+V_3	0,0001	0,0016	-		0,0001	0,0001
K	0,0001	0,0001		-	0,0001	0,0113
K+B	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	-	
K+V_3	0,0001	0,0001	0,0001	0,0113		-

Rys. 54. Średnia GJK z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt.

Poziom istotności różnic GJK pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.



	D	D+B	D+V_3	K	K+B	K+V_3
D	-				0,0139	
D+B		-				
D+V_3			-		0,0001	0,0097
K				-	0,0097	
K+B	0,0139		0,0001	0,0097	-	
K+V_3			0,0097			-

Rys. 55. Średnia Log GJOK z 95 % przedziałem ufności w poszczególnych grupach zwierząt .

Poziom istotności różnic GJOK pomiędzy grupami. Podano jedynie wartości znamiennie istotne.

D – grupa kontrolna diabetyczna
K- grupa kontrolna zdrowa
B – badany związek B
V_3 - badany związek V_3

- Porównując wyniki badań morfometrycznych kłębuszków nerkowych szczurów diabetycznych z kontrolnymi stwierdzono statystycznie istotne zwiększenie średnicy małej (SM) (Rys. 48), powierzchni całego kłębuszka (PCK) (Rys. 49), powierzchni kłębuszka (PK) (Rys. 50), stosunku gęstości jąder kłębuszka (GJK) (Rys. 54).
- U szczurów diabetycznych, którym podawano związek B zaobserwowano wzrost wymiarów kłębuszka tzn. wzrost średnicy małej kłębuszków nerkowych (SM) (Rys. 48), powierzchni całego kłębuszka (PCK) (Rys. 49) a także powierzchni kłębuszka (PK) (Rys. 50). Związek V_3 powodował nieznaczne obniżenie tych wymiarów. W obu przypadkach różnice te były statystycznie nieistotne.
- W grupie diabetycznej po podaniu związku B statystycznie istotnie wzrastała liczba jąder kłębuszka (LJK) (Rys. 53) i liczba jąder na obrzeżach kłębuszka (LJOK) (Rys. 52).
- W grupie diabetycznej, po podaniu związku V_3, statystycznie istotnie zwiększyła się gęstość jąder kłębuszka (GJK) (Rys. 54).
- W grupie szczurów zdrowych, którym podawano związek B statystycznie istotnie obniżyła się powierzchnia całego kłębuszka (PCK) (Rys. 49), powierzchnia kanalików nerkowych (PK) (Rys. 50), natomiast zwiększeniu uległa gęstość jąder na obrzeżach kłębuszka (GJOK) (Rys. 55) i gęstość jąder kłębuszków nerkowych (GJK) (Rys. 54).
- W grupie szczurów zdrowych, którym podawano związek V_3 statystycznie istotnie zwiększyła się gęstość jąder kłębuszka (GJK) (Rys. 54).

Wnioski

U szczurów cukrzycowych stwierdzono poszerzenie kłębuszków nerkowych. Podanie tym szczurom związku B powodowało dalszy wzrost wymiarów tych kłębuszków. Związek V_3 działał przeciwnie, nieznacznie zmniejszając je. Efekty te nie były jednakże istotne statystycznie.

U szczurów zdrowych jedynie związek B wpływał na kłębuszki nerkowe, zmniejszając istotnie dwa z czterech mierzonych parametrów.

Oba badane kompleksy wanadu (B i V_3) wykazywały istotne działanie proliferacyjne na jądra kłębuszków nerkowych zarówno u szczurów cukrzycowych jak i zdrowych.

Dyskusja wyników badań morfometrycznych krezki i kłębuszków nerkowych

W początkowym stadium cukrzycy następuje wzrost przepływu krwi i ciśnienia wewnątrznaczyniowego w tętniczkach [Adamiec 1998]. W badaniach na szczurach z chroniczną cukrzycą trwającą trzy miesiące Arshi (2000) wykazał istotne zwiększenie średnicy naczyń krwionośnych. Dalsze zmiany polegające między innymi na stwardnieniu ścian tętniczek i utrudnieniu przepływu krwi występują dopiero w późniejszym stadium choroby.

W przeprowadzonym eksperymencie we wszystkich grupach zwierząt cukrzycowych stwierdzono poszerzenie tętniczek **krezki**. Zmiany te mogą odpowiadać wczesnemu stadium cukrzycy

U **szczurów zdrowych**, którym podawano testowane związki wanadu (zarówno B jak i V_3) stwierdzono poszerzenie naczyń krezki.

Podobnie w badaniach własnych nie przytoczonych tutaj a wykonanych na izolowanej aorcie szczura stwierdzono, że kompleksy B i V_3 posiadały właściwości naczyniorozszerzające (praca ta jest przygotowywana do druku). Przeciwne jednakże wyniki uzyskali Cadene (1996) oraz St-Louis (1995) w badaniach nad wpływem siarczanu wanadu na izolowaną aortę szczurów.

Zaobserwowano również istotny dodatni wpływ związku B i V_3 na proliferację jąder mięśniówki i przydanki naczyniowej krezki zarówno u szczurów diabetycznych jak i zdrowych, przy czym aktywniejszy okazał się związek V_3. Wyniki te są zgodne z danymi uzyskanymi w pracach innych autorów, którzy obserwowali proliferacyjne działanie różnych związków wanadu na osteoblasty [Cortizo 1995] a także na nabłonek kanalików nerkowych oraz komórek śródmiąższowych [al-Bayati 1989].

Zmiany w **nerkach** obserwowane w **cukrzycy** polegają na wzroście powierzchni kłębuszków nerkowych i przestrzeni wokołokłębuszkowej wywołanych przez zwiększone ciśnienie filtracji.

Podanie **szczurom cukrzycowym** związku B powodowało nieistotny statystycznie wzrost wymiarów kłębuszka. Natomiast związek V_3 działał przeciwnie tzn. zmniejszał (również nieistotnie) te parametry, co byłoby korzystne. Podobnie Cam (1993) stwierdził poprawę parametrów histologicznych nerki po podaniu siarczanu wanadu szczurom cukrzycowym.

Gdyby w dalszych badaniach potwierdziło się to pozytywne działanie związku V_3 można by je tłumaczyć obniżonym zapotrzebowaniem szczurów cukrzycowych na wodę, ponieważ związek V_3 obniżał istotnie stężenie glukozy w ich krwi.

W grupie szczurów zdrowych, związek V_3 nie wpływał na kłębuszki nerkowe co potwierdzałoby poprzednie stwierdzenie. Natomiast związek B przeciwnie, niż u zwierząt diabetycznych obniżał mierzone parametry, co jest trudne do wytłumaczenia.

Podobnie jak w przypadku tętniczek krezki zaobserwowano wpływ proliferancyjny badanych związków wanadu na kłębuszki nerkowe, przy czym związek V_3 był bardziej aktywny. Wyniki te są zgodne z pracą al-Bayati (1989).

Wyjaśnienie wpływu różnych związków wanadu na naczynia krwionośne wymaga dalszych, szczegółowych badań. Należałoby zwrócić uwagę na stopień utlenienia wanadu oraz rodzaj połączenia: tzn. czy jest to związek nieorganiczny czy też organiczny? W tym ostatnim przypadku sam ligand lub jego metabolit może odgrywać istotną rolę.

Badania własne opisane powyżej należy traktować jako eksperymenty wstępne. Dalsze badania powinny być prowadzone dłużej, tak aby móc ocenić wpływ związków wanadu na zmiany ujawniające się w naczyniach w późniejszych stadiach cukrzycy.

4.2 Farmakokinetyka związków wanadu

4.2.1 Farmakokinetyka związków wanadu ($VOSO_4$, B, V_3) u szczurów zdrowych i z wywołaną cukrzycą

Aby sprawdzić czy istnieją różnice wchłaniania z przewodu pokarmowego oraz eliminacji z organizmu wanadu podanego w postaci siarczanu ($VOSO_4$) i kompleksów organicznych (B i V_3) przeprowadzono badania farmakokinetyczne. Badania te podzielono na kilka etapów.

Parametry farmakokinetyczne zestawione w tabelach:

AUC – pole pod krzywą stężenie-czas

AUC_{obs}-pole pod krzywą stężenie-czas wyznaczone metodą trapezów

AUC_{ext} – wartość ekstrapolowana do przedziału $(0,\infty)$, obliczona według równania:

$$AUC_{ext}=AUC_{obs}+\frac{C_{ost}}{\lambda_n}$$

gdzie C_{ost} jest ostatnim pomiarem stężenia w chwili (t_{ost}) a λ_n jest nachyleniem ostatniego odcinka krzywej stężenie czas (w skali logarytmicznej)

AUC_{mod} jest polem pod krzywą w przedziale $(0,\infty)$ obliczonym na podstawie wyznaczonych parametrów przyjętego modelu farmakokinetycznego

$t_{1/2}$ – okres półtrwania

$t_{1/2}$ fazy $1=\frac{\ln 2}{\lambda_{fazy1}}$

$t_{1/2}$ fazy $2=\frac{\ln 2}{\lambda_{fazy2}}$

$t_{1/2}$ fazy $3=\frac{\ln 2}{\lambda_{fazy3}}$

MRT – średni czas przebywania

MRT=AUMC/AUC

gdzie AUMC jest polem pod krzywą t-C•t

MRT_{obs} obliczono korzystając z wartości AUC_{obs} i $AUMC_{obs}$, wyznaczonych metodą trapezów:

Wartość ekstrapolowaną do przedziału czasu (0,∞) MRT_{ext} otrzymano z AUC_{ext} oraz

$$AUMC_{ext}=AUMC_{obs}+\frac{C_{ost}t_{ost}}{\lambda_n}+\frac{C_{ost}}{\lambda_n^2}$$

MRT_{mod} – wartość obliczona na podstawie wyznaczonych parametrów przyjętego modelu farmakokinetycznego

k_{12}, k_{21}, k_{13}, k_{31}, k_{10} są stałymi szybkości dla procesów pierwszego rzędu przenikania substancji pomiędzy kompartmentami (są to tzw. mikroparametry modelu)

V_1, V_2, V_3 – są objętościami dystrybucji poszczególnych kompartmentów

V_{ss}- objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym

Tmax – czas po którym wystąpiło najwyższe stężenie wanadu we krwi

Cl – klirens całkowity wanadu

CV% - współczynnik zmienności wyrażony w %

4.2.1 Etap pierwszy

Celem badań było prześledzenie farmakokinetyki $VOSO_4$ u szczurów zdrowych po podaniu dożylnym i dożołądkowym oraz określenie biodostępności wanadu z tego związku.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w 2001 [Azay, Brès, Krośniak i współ.]. W niniejszej pracy przedstawiono jedynie fragmenty tych badań.

Metodyka

Pierwszy etap polegał na podaniu dożylnym i dożołądkowym siarczanu wanadu szczurom zdrowym. Po uprzednim uśpieniu szczurów przy pomocy eteru, podano im jednorazowo dożylnie izotoniczny roztwór siarczanu wanadu o stężeniu 15 mg/l (3,025 mg V/l) w ilości 1 ml/kg masy ciała. Przy badaniach *per os* podano jednorazowo sondą dożołądkową szczurom głodzonym przez okres 24 h dwa wodne roztwory siarczanu wanadu w następujących dawkach: 75 i 37,5 mg $VOSO_4$/kg masy ciała co odpowiadało 15,12 lub 7,56 mg V/kg masy ciała szczura.

Odstępy pomiędzy zbieraniem kolejnych próbek krwi zgodnie z zasadą optymalnego wyboru czasów pobrań [D'Argenio 1981, Bressolle i współ. 1991] powinny wynosić: 10 min, 20 min, 50 min, 2h 50 min, 36,5h, 128h, 504 h. W badaniach zastosowano schematy bardziej odpowiednie do cyklu pracy laboratoryjnej z powtórzeniem niektórych pomiarów po 10 min [D'Argenio i współ. 1981]. Krew pobierano z ogona w ilości około 2-3 kropel w następujących odstępach czasowych:

Przy podaniu dożylnym: 10 min, 20 min, 1 h, 1h 10 min, 3 h, 36 h i 120 h

Przy podaniu dożołądkowym z dawką 15,12 mg V/kg: 20 min, 30 min, 1 h, 1 h 10 min, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 36 h, 120h.

Przy podaniu dożołądkowym z dawką 7,56 mg V/kg: 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h, 36 h, 120h.

Do wymytych, wysuszonych i zważonych probówkach typu eppendorf pobierano kilka kropli (30-80 µl) krwi z ogona szczura i zamrażano do czasu analizy. Procedurę mineralizacji i oznaczanie wanadu we krwi opisano w rozdziale absorpcyjna spektrometria atomowa.

Analiza stężenia wanadu we krwi szczurów

Próbki krwi przygotowywano w następujący sposób:

W pierwszej fazie badania farmakokinetyki wchłaniania związków wanadu przy doświadczeniach z $VOSO_4$ stosowano procedurę mineralizacji krwi przy pomocy mieszaniny (50/50 obj/obj) stężonych kwasów azotowego i nadchlorowego supra pure (Merck). Zważone, zawierające próbki krwi probówki typu eppendorf o pojemności 1,5 ml zalewano 200 µl mieszaniny kwasów i pozostawiono je w temperaturze pokojowej do mineralizacji przez okres 48 godzin. Po tym czasie, próbki dokładnie wymieszano przez wytrząsanie i mierzono ich ciężar właściwy przez 3 krotne pobranie 100 µl płynu i każdorazowy pomiar masy probówki z próbką. Następnie uśredniano uzyskane wyniki. Takie wyniki były niezbędne w celu obliczenia całkowitej objętości roztworu po mineralizacji. W ten sposób zmineralizowaną próbkę nastrzykiwano do wnętrza kuwety grafitowej spektrometru absorpcji atomowej (AAS) w celu dokonania pomiaru.

Wcześniej wykonano 5 prób ślepych tj. zalewano probówki typu eppendorf wyżej wymienioną mieszaniną kwasów, pozostawiano na okres 48 godzin. Następnie dokonano pomiarów zawartości wanadu w tym płynie metodą AAS. W każdym z przypadków

zawartość wanadu była na poziomie szumów i do dalszych wartość tę przyjęto za równą zero.

Podczas pomiarów zauważono, że środowisko stężonych, silnie utleniających kwasów zastosowanych do mineralizacji wpływa bardzo niekorzystnie na żywotność kuwety grafitowej. By obniżyć koszty analizy postanowiono poszukać innej metody mineralizacji próbki. Po wcześniejszych własnych doświadczeniach z bezpośrednią analizą ołowiu we krwi we wnętrzu kuwety grafitowej postanowiono zaadaptować tę metodę także do pomiarów wanadu. Po przeprowadzeniu badań porównawczych stwierdzono, że metodyka ta może z powodzeniem zastąpić wcześniejszy sposób mineralizacji próbki. Dodatkowo bardzo wysoka temperatura topnienia i wrzenia wanadu pozwalała na pozbycie się interferencji pochodzących z matrycy a wpływających na sygnał pochodzący od tego pierwiastka. Uzyskane wyniki były w pełni zgodne z wynikami otrzymanymi „starą" metodą i postanowiono w dalszej części pomiarów zastosować „nową" metodę. Rozmrożone próbki krwi wraz z modyfikatorem (do kolbki miarowej 100 ml dodano 100 mg Triton X-100, 100 mg EDTA supra pure (Merck) 100 mg $Na(H)_2PO_4$ i 1 ml HNO_3 (65%) supra pure (Merck). Całość uzupełniono wodą do kreski) były wytrząsane a następnie bezpośrednio nastrzykiwane przy pomocy autosamplera do wnętrza kuwety grafitowej.

Dla każdego wzorca i próbki robiono po dwa nastrzyknięcia. Krzywą wzorcową wyznaczono w oparciu o następujące stężenia: 0, 20, 50, 100 µg/l. W przypadku stężenia wanadu przewyższającego krzywą wzorcową, próbkę rozcieńczano.

Absorpcyjna spektrometria atomowa

Pomiary stężenia wanadu w próbkach krwi dokonano przy użyciu spektrometru Varian 1275. Pomiarów dokonywano przy następujących parametrach: lampa wanadowa z katodą wnękową, natężenie prądu w lampie 7 mA, długość fali 318,5 nm, szerokość szczeliny 0,5 nm. Korekcja tła przy użyciu lampy deuterowej. Reszta parametrów pracy pieca grafitowego zestawiono w tabeli 12.

Tab. 12. Parametry pracy pieca grafitowego:

Etap	Temperatura [°C]	Czas [sek]	Przepływ azotu [ml/min]
suszenie	75	10	3
	90	10	3
	110	10	3
spopielanie	300	60	3
	450	20	3
	800	20	3
	1400	30	3
	1400	10	3
	40	15	0
atomizacja	2750	1,1	0
	2750	2	0
czyszczenie	2750	2	3

Uzyskane wyniki zestawiono w tabelach 13-16

Tab. 13. Średnia zawartość wanadu (± SD) w mg/l krwi po podaniu dożylnym oraz dożołądkowym (dwie różne dawki) siarczanu wanadu.

Czas po injekcji h	Podanie dożylne (N = 6) 3,025 mg V / kg	Podanie dożołądkowe (N = 6) 15,12 mg V / kg	Podanie dożołądkowe (N = 7) 7,56 mg V / kg
Przed podaniem wanadu	0,0044 ± 0,0027		
0,16	1,283 ± 0,561		-
0,33	1,133 ± 0,446	0,161 ± 0,047	-
0,50	-	0,192 ± 0,014	0,066 ± 0,028
1,0	0,831 ± 0,295	0,228 ± 0,089	0,086 ± 0,035
1,16	0,803 ± 0,265	0,248 ± 0,104	-
3,0 [a)]	0,386 ± 0,075	0,378 ± 0,177	0,167 ± 0,062
6,0 [a)]		0,486 ± 0,193	0,171 ± 0,045
9,0 [a)]		0,544 ± 0,111	0,235 ± 0,083
12 [a)]		0,371 ± 0,117	0,173 ± 0,047
36 [a)]	0,115 ± 0,032	0,103 ± 0,102	0,030 ± 0,007
120 [a)]	0,034 ± 0,016	0,046 ± 0,009	0,020 ± 0,007
336	0,0155 ± 0,0074		
504	0,0133 ± 0,0128		

[a)] dla tego czasu przyjęto wartość średnią z pobrania i z powtórzenia po 10 min od tego pobrania

Tab. 14. Parametry farmakokinetyczne wanadu po jednokrotnym podaniu dożylnym siarczanu wanadu (3,025 mg V/kg masy ciała szczura). Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy stosując rozszerzoną metodę najmniejszych kwadratów

Szczur / Parametr	1	2	3	4	5	6	Średnia ± SD
AUC_{obs} ($mg.L^{-1}.h$)	29,3	24,0	23,2	23,2	21,8	21,1	23,8 ± 2,91
AUC_{ext} ($mg.L^{-1}.h$)	33,8	29,3	26,6	24,5	24,3	22,1	26,8 ± 4,22
AUC_{mod} ($mg.L^{-1}.h$)	33,8	25,0	17,6	22,2	22,3	17,4	23,1 ± 6,04
Cl (L/h)	0,0177	0,0240	0,0340	0,0454	0,0433	0,0613	0,0376 ± 0,0158
$t_{1/2\ phaza\ 1}$ (h)	0,139	0,955	1,12	1,31	0,319	1,58	0,904 ± 0,565
$t_{1/2\ phaza\ 2}$ (h)	2,15	21,8	46,1	23,6	22,5	32,9	24,8 ± 14,5
$t_{1/2\ phaza\ 3}$ (h)	240	228	98,4	212	297	130	201 ± 74
MRT_{obs} (h)	155	67,7	108	108	91,6	71,5	100 ± 32
MRT_{ext} (h)	181	114	112	117	127	76,5	121 ± 34
MRT_{mod} (h)	315	212	116	209	218	124	199 ± 73
k_{12} (h^{-1})	2,07	0,460	0,464	0,319	0,873	0,280	0,744 ± 0,683
k_{21} (h^{-1})	2,63	0,117	0,0470	0,131	1,27	0,0789	0,712 ± 1,051
k_{13} (h^{-1})	0,499	0,0918	-	0,0532	0,0198	0,0320	0,139 ± 0,203
k_{31} (h^{-1})	0,0286	0,00711	-	0,00808	0,00415	0,00998	0,0116 ± 0,0037
k_{10} (h^{-1})	0,0609	0,0838	0,110	0,0478	0,0295	0,0621	0,0657 ± 0,0281
V_1 (L)	0,291	0,286	0,306	0,950	1,46	0,988	0,714 ± 0,493
V_2 (L)	0,228	1,12	3,50	2,31	1,00	3,50	1,94 ± 1,38
V_3 (L)	5,07	3,70	-	6,25	7,01	3,17	5,04 ± 1,63
V_{ss} (L)	5,59	5,11	3,95	9,51	9,48	7,67	6,88 ± 2,35
V_{total} (L)	6,16	7,90	4,82	13,8	18,6	11,5	10,5 ± 5,20
V_{ss} (L/kg)	28,0	25,5	19,7	28,3	29,4	21,6	25,4 ± 3,90

Tab. 15. Parametry farmakokinetyczne wanadu po jednokrotnym podaniu dożołądkowym siarczanu wanadu (15,12 mg V/kg masy ciała szczura). Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy z wchłanianiem zerowego rzędu. Obliczenia wykonywano stosując metodę estymacji bayesowskiej.

Szczur / Parameter	1	2	3	4	5	6	średnia ± SD
Tmax (h)	10,7	8,60	11,10	11,80	8,85	10,50	10,26 ± 1,27
C_{max} (mg/l)	0,591	0,691	0,347	0,346	0,404	0,607	0,498 ± 0,150
AUC_{obs} ($mg.l^{-1}.h$)	18,2	13,54	8,81	10,1	16,7	10,5	12,97 ± 3,83
AUC_{ext} ($mg.l^{-1}.h$)	26,4	16,02	11,8	12,4	27,9	11,8	17,72 ± 7,49
AUC_{mod} ($mg\ l^{-1}.h$)	23,8	11,1	9,40	8,92	20,7	9,40	13,90 ± 6,60
MRT_{obs} (h)	32,6	8,08	20,4	16,8	23,2	10,8	18,6 ± 8,9
MRT_{ext} (h)	97,9	23,5	77,8	60,6	144	39,5	73,8± 43,4
MRT_{mod} (h)	152	102	125	111	246	68,1	134 ± 61
$t_{1/2\ faza\ 1}$ (h)	0,669	0,350	0,496	0,162	0,126	0,771	0,429 ± 0,264
$t_{1/2\ faza\ 2}$ (h)	21,9	6,45	18,5	8,69	9,32	5,24	11,7 ± 6,82
$t_{1/2\ faza\ 3}$ (h)	168	172	172	175	227	196	185 ± 23
V_1/F (l)	0,954	0,437	0,875	0,536	0,649	1,35	0,800 ± 0,333
V_{ss}/F (l)	25,4	32,9	46,2	47,2	41,9	28,9	37,1 ± 9,3
V_{total}/F (l)	41,9	83,5	96,1	113	56,7	1309	86,9 ± 33,4

Tab. 16. Parametry farmakokinetyczne wanadu po jednokrotnym podaniu dożołądkowym siarczanu wanadu (7,56 mg V/kg masy ciała szczura). Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy z wchłanianiem zerowego rzędu. Obliczenia wykonywano stosując metodę estymacji bayesowskiej.

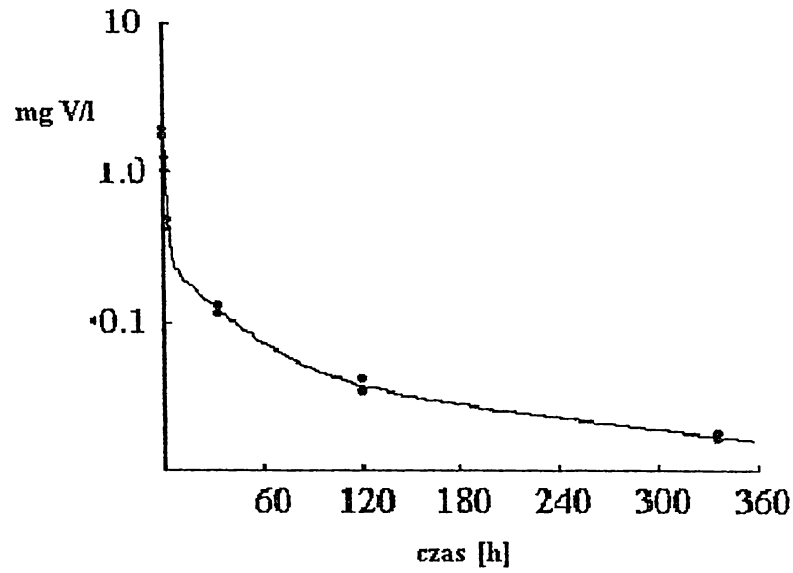
Parametr \ Szczur	1	2	3	4	5	6	7	średnia ± SD
Tmax (h)	11,8	12,0	12,0	11,5	10,0	9,65	9,73	10,9 ± 1,10
C_{max} (mg/l)	0,195	0,181	0,194	0,165	0,292	0,227	0,334	0,227 ± 0,0629
AUC_{obs} ($mg.l^{-1}.h$)	6,44	6,82	6,65	5,32	8,24	5,95	5,82	6,46 ± 0,94
AUC_{ext} ($mg.l^{-1}.h$)	12,3	10,6	10,1	13,2	13,2	10,2	9,00	11,2 ± 1,7
AUC_{mod} ($mg.l^{-1}.h$)	10,2	7,06	8,71	9,68	11,6	9,67	8,34	9,32 ± 1,45
MRT_{obs} (h)	30,4	29,6	29,8	42,6	26,9	32,9	25,2	31,1 ± 5,7
MRT_{ext} (h)	131	109	103	173	131	130	105	126 ± 24
MRT_{mod} (h)	203	110	180	217	207	208	165	184 ± 37
$t_{1/2\ faza\ 1}$ (h)	0,585	0,546	0,517	0,310	0,236	2,60	1,41	0,886 ± 0,847
$t_{1/2\ faza\ 2}$ (h)	7,36	74,7	12,5	5,52	6,76	8,11	9,14	17,7 ± 25,2
$t_{1/2\ faza\ 3}$ (h)	168	174	169	181	211	183	175	180 ± 15
V_1/F (l)	0,846	0,923	0,936	1,44	1,56	3,56	1,18	1,49 ± 0,95
V_{ss}/F (l)	37,0	29,3	39,5	42,8	31,6	40,7	34,5	36,5 ± 4,9
V_{total}/F (l)	45,5	70,8	55,4	52,9	47,7	52,9	54,5	54,2 ± 8,1

Omówienie wyników

Fizjologiczne stężenie wanadu we krwi szczurów przed podaniem $VOSO_4$ wynosiło 4,4 ± 2,7 µg/l.

a) po podaniu dożylnym:

Po podaniu dożylnym, przebieg zmian stężenia wanadu we krwi był najlepiej opisywany modelem trójkompartmentowym (Rys. 56).



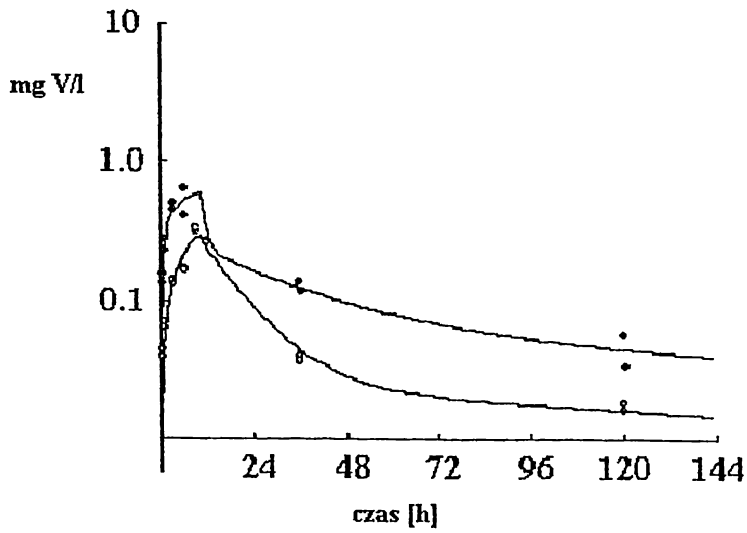
Rys. 56. Półlogarytmiczny przebieg zmian stężenia wanadu we krwi szczura po podaniu dożylnym $VOSO_4$ (3,025 mg V/kg).

Stężenie wanadu spadło z 2,0 do 0,4 mg/l w ciągu pierwszych 5 godzin, oraz z 0,4 do 0,035 mg/l w ciągu 60 godzin. Po 21 dniach obserwowano nadal podwyższone stężenie wanadu wynoszące 10 μg/l.

Średnie czasy półtrwania dla obu faz dystrybucji i fazy eliminacji wynosiły odpowiednio: 1, 25 i 200 godzin.

Pierwsza dystrybucja w tkankach peryferyjnych z centralnego kompartmentu (v_1) do kompartmentu płytkiego (v_2) była szybka, podczas gdy dystrybucja w tkanki głębokie (v_3) okazała się znacznie wolniejszym etapem, o stałej szybkości przenikania wanadu z tkanki głębokiej do krwi wynoszącej k_{31}=0,0116±0,0037 h. Stała szybkości tego ostatniego procesu jest więc dużo niższa od stałej szybkości eliminacji k_{10}=0,0657±0,0281 h.

b) po podaniu dożołądkowym:



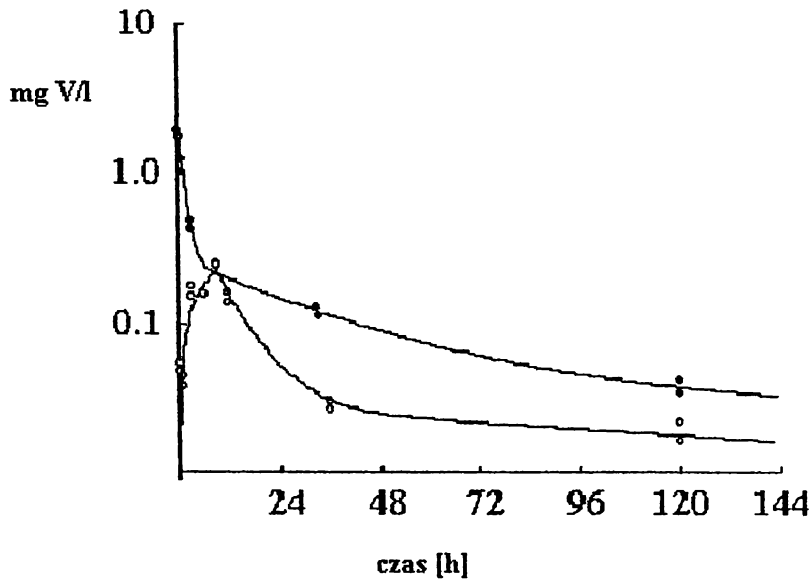
Rys. 57. Półlogarytmiczny przebieg zmian stężenia wanadu we krwi szczura po podaniu dożołądkowym $VOSO_4$ w dwóch dawkach (15,12 (•) i 7,56 (o) mg V/kg).

Maksymalne stężenie wanadu po podaniu dożołądkowym $VOSO_4$ szczurom (15,12 mg V/kg masy ciała) występowało po 8-12 godzinach i wahało się od 0,343 do 0,741 mg/l (Rys. 57)

Przebieg zmian stężenia wanadu we krwi po osiągnięciu maksimum okazał się również zgodny z modelem trójkompartmentowym.

Analiza fazy wchłaniania wykazała, że proces ten jest procesem zerowego rzędu.

Maksymalne stężenie wanadu po podaniu dożołądkowym szczurom 7,56 mg V/kg (z $VOSO_4$) występowało po 9-12 godzinach i wahało się od 0,165do 0,334 mg/l (Rys. 57). W tym przypadku również stwierdzono zgodność z modelem trójkompartmentowym z wchłanianiem zerowego rzędu, a uzyskane wartości parametrów farmakokinetycznych wskazują na liniowość farmakokinetyki wanadu w obserwowanym zakresie stężeń.



Rys. 58. Półlogarytmiczny przebieg zmian stężenia wanadu we krwi szczura po podaniu dożylnym $VOSO_4$ w dawce 3,025 mg V/kg (•) i dożołądkowym w dawce 7,56 mg V/kg (○).

Na podstawie wartości AUC_{ext} po podaniu dożołądkowym i dożylnym wyliczono wartość bezwzględnej dostępności biologicznej, która wyniosła 16%. (Rys. 58)

4.2.2. Etap drugi

Celem tych eksperymentów było przebadanie farmakokinetyki organicznych kompleksów wanadu (B i V_3) po podaniu dożołądkowym a następnie porównanie uzyskanych wyników z danymi farmakokinetycznymi $VOSO_4$ (etap I).

Drugi etap polegał na porównaniu szybkości wchłaniania wanadu z siarczanu wanadu oraz badanych kompleksów wanadu B i V_3. Doświadczenie to miało pokazać czy rodzaj związku wanadu, w którym jest on podawany decyduje o szybkości i wielkości wchłaniania wanadu z podanej dawki. Głodzonym szczurom przez okres 24 godzin podano sondą dożołądkową rozpuszczony w wodzie B lub V_3 w ilości odpowiednio 128 i 100,2 mg/10 ml, co odpowiadało stężeniu 12,75 mg V/kg masy ciała. Roztwór wodny tych związków był podawany w ilości 10 ml/kg masy ciała szczura. Szczurom w odpowiednich odstępach czasowych pobierano krew z ogona w ilości około 30-80 µl do przygotowanych eppendorfów zawierających 200 µl modyfikatora. Całość wymieszano, ważono i obliczano ilość krwi uzyskanej od każdego szczura, z każdego pobrania. Zebrane próbki przechowywano w temperaturze –20°C, aż do czasu pomiaru przy użyciu techniki absorpcji atomowej opisanej w rozdziale 4.2.1.

Porównania pomiędzy parametrami farmakokinetycznymi w etapie drugim i trzecim dokonano stosując jednoczynnikową analizę wariancji a następnie test Tukey'a wielokrotnych porównań dla grup o różnych liczebnościach. Obliczenia wykonano przy pomocy programu Statistica 6,0 for Windows (StatSoft. Inc.).W przypadku parównywania parametrów proporcjonalnych do dawki (C_{max} i AUC) normalizowano je do jednostkowej dawki wanadu.

Uzyskane wyniki zestawiono w tabelach 17-19

Tab. 17. Parametry farmakokinetyczne wanadu we krwi szczurów zdrowych po jednokrotnym podaniu dożołądkowym B w dawce 12,75 mg V/kg masy ciała. Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy z wchłanianiem zerowego rzędu. Obliczenia wykonywano stosując metodę estymacji bayesowskiej.

Szczur / Parametr	1	2	3	4	5	6	7	Średnia ± SD
Tmax, h	12,00	12,02	12,00	11,90	12,00	9,33	8,74	11,14 ± 1,45
C max. (mg/l)	0,431	0,408	0,427	0,443	0,417	0,504	0,488	0,45 ± 0,04
AUCobs.(mg l^{-1}.h)	12,56	12,72	13,31	13,67	14,14	15,36	16,15	13,99 ± 1,34
AUC ext.(mg.l^{-1}.h)	19,64	21,56	19,10	20,92	21,86	23,10	24,27	21,49 ± 1,82
AUC mod.(mg.l^{-1}.h)	17,10	18,96	16,14	14,48	19,36	20,16	21,34	18,22 ± 2,41
MRT obs.	27,00	29,93	25,24	27,58	28,26	27,47	27,78	27,61 ± 1,40
MRT ext.	106,7	120,2	91,80	102,6	103,2	100,2	100,4	103,59 ± 8,63
MRT mod.	176,7	190,6	163,2	69,40	178,2	170,2	170,5	159,83 ± 40,78
$t_{1/2\ faza\ 1}$ (h)	0,355	0,331	0,373	0,842	0,368	3,98	0,304	0,94 ± 1,36
$t_{1/2\ faza\ 2}$ (h)	5,86	6,05	7,63	42,85	8,06	7,52	9,32	12,47 ± 13,45
$t_{1/2\ faza\ 3}$ (h)	172,1	173,5	169,5	169,2	166,7	169,4	169,6	170,00 ± 2,20
V_1 /F (l)	0,635	0,634	0,604	0,869	0,614	3,13	1,29	1,11 ± 0,92
Vss /F (l)	27,75	25,21	24,53	11,66	21,61	20,21	19,78	21,54 ± 5,22
Vtotal /F (l)	40,35	34,18	38,18	44,85	30,19	29,82	29,11	35,24 ± 6,06

Tab. 18. Parametry farmakokinetyczne wanadu we krwi szczurów zdrowych po jednokrotnym podaniu dożołądkowym V_3 w dawce 12,75 mg V/kg masy ciała. Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy z wchłanianiem zerowego rzędu. Obliczenia wykonywano stosując metodę estymacji bayesowskiej.

Parametr \ Szczur	1	2	3	4	5	6	7	Średnia ± SD
T, h	13,08	11,93	11,96	6,81	11,75	12,25	11,79	11,37 ± 2,06
C max. (mg/l)	0,387	0,359	0,384	0,473	0,398	0,375	0,436	0,40 ± 0,04
AUCobs.(mg l^{-1}.h)	15,34	12,04	15,83	11,62	13,31	12,63	10,72	13,07 ± 1,90
AUC ext.(mg.l^{-1}.h)	20,72	19,28	29,11	17,14	18,91	20,72	17,33	20,46 ± 4,07
AUC mod.(mg.l^{-1}.h)	17,11	17,99	27,98	14,95	15,92	18,99	17,88	18,69 ± 4,31
MRT obs.	25,52	29,03	35,08	25,21	26,21	29,91	27,88	28,41 ± 3,44
MRT ext.	82,13	108,5	128,0	97,40	90,70	116,1	110,3	104,73 ± 15,69
MRT mod.	140,9	185,2	207,3	161,6	162,4	188,6	167,7	173,39 ± 21,86
$t_{1/2\ faza\ 1}$ (h)	0,364	0,457	0,380	6,30	2,78	1,94	0,859	1,87 ± 2,16
$t_{1/2\ faza\ 2}$ (h)	17,45	13,17	10,63	27,02	8,14	14,38	8,76	14,22 ± 6,52
$t_{1/2\ faza\ 3}$ (h)	168,8	166,8	165,5	172,6	169,0	172,0	169,1	169,11 ± 2,55
V_1 /F (l)	0,615	0,568	0,635	3,90	3,14	2,33	0,523	1,67 ± 1,43
Vss /F (l)	20,42	23,71	19,64	27,09	24,19	27,29	21,63	23,42 ± 3,04
Vtotal /F (l)	37,01	31,84	23,30	42,66	37,68	37,11	33,44	34,72 ± 6,10

Tab. 19. Porównanie wartości parametrów farmakokinetycznych badanych związków B i V_3 w stosunku do siarczanu wanadu ($VOSO_4$)

Parametr \ Grupa	B	V_3	VS	B/ VOSO	V_3/ $VOSO_4$
Tmax (h)	11,14 ± 1,45	11,37 ± 2,06	10,26 ± 1,27	1,086	1,108
Cmax (mg/l)	0,45 ± 0,04	0,40 ± 0,04	0,498 ± 0,150	1,072	0,953
AUC obs.($mg.l^{-1}.h$)	13,99 ± 1,34	13,07 ± 1,90	12,97 ± 3,83	1,279	1,195
AUC ext.($mg.l^{-1}.h$)	21,49 ± 1,82	20,46 ± 4,07	17,72 ± 7,49	1,438	1,369
AUC mod.($mg.l^{-1}.h$)	18,22 ± 2,41	18,69 ± 4,31	13,9 ± 6,6	1,554	1,595
MRT obs.	27,61 ± 1,40	28,41 ± 3,44	18,6 ± 8,9	1,484	1,527
MRT ext.	103,59 ± 8,63	104,73 ± 15,69	73,8 ± 43,4	1,404	1,419
MRT mod.	159,83 ± 40,78	173,39 ± 21,86	134 ± 61	1,193	1,294
$t_{1/2}$ faza 1 (h)	0,94 ± 1,36	1,87 ± 2,16	0,429 ± 0,264	2,191	4,359
$t_{1/2}$ faza 2 (h)	12,47 ± 13,45	14,22 ± 6,52	11,7 ± 6,8	1,066	1,215
$t_{1/2}$ faza 3 (h)	170,00 ± 2,20	169,11 ± 2,55	185 ± 23	0,919	0,914
V1/F (l)	1,11 ± 0,92	1,67 ± 1,43	0,800 ± 0,333	1,388	2,087
Vss/F (l)	21,54 ± 5,22	23,42 ± 3,04	37,1 ± 9,3	0,581	0,631
Vtotal/F (l)	35,24 ± 6,06	34,72 ± 6,10	86,9 ± 33,4	0,406	0,400

Omówienie wyników

Maksymalne stężenie wanadu w krwi szczurów zdrowych po dożołądkowym podaniu 12,75 mg V/kg w postaci **związku B** występowało po 11,1 ± 1,4 godzinach i wahało się od 0,408 do 0,504 mg V/l.

Maksymalne stężenie wanadu po dożołądkowym podaniu szczurom 12,75 mg V/kg w postaci **związku V_3** występowało po 11,4 ± 2,1 godzinach i wahało się od 0,359 do 0,473 mg V/l.

Dla badanych przypadków przebieg zmian stężenia wanadu we krwi po osiągnięciu maksimum okazał się zgodny z modelem trójkompartmentowym.

Analiza faz wchłaniania wykazała, że procesy te są procesami zerowego rzędu.

Statystycznie istotna różnica ($p<0,05$) wystąpiła wyłącznie w odniesieniu do objętości dystrybucji w stanie stacjonarnym (V_{ss}) pomiędzy siarczanem wanadu a

związkiem V_3. Pozostałe parametry farmakokinetyczne nie wykazały istotnych statystycznie różnic ($p>0,05$).

Względna biodostępność badanych związków B i V_3 w stosunku do $VOSO_4$ była wyższa i wynosiła 144 % oraz 137 % odpowiednio.

4.2.3 Etap trzeci

W kolejnym etapie porównano czy i w jaki sposób **cukrzyca** wpływała na absorpcję wanadu z przewodu pokarmowego oraz czy istnieją różnice we wchłanianiu różnych związków wanadu ($VOSO_4$, B i V_3) u zwierząt cukrzycowych.

Metodyka

Kilka dni przed podaniem związków wanadu wywołano w trzech grupach szczurów Wistar (n = 7) sztuk cukrzycę przez podanie dożylne STZ w ilości 55 mg/kg masy ciała. Po 3 dniach sprawdzono poziom glukozy przy pomocy glukometru i zaklasyfikowano wszystkie zwierzęta. Zwierzętom podano podobnie jak w etapie drugim związki B i V_3 i postępowano w sposób analogiczny jak opisano powyżej. Procedurę mineralizacji i oznaczanie wanadu we krwi opisano w rozdziale absorpcyjna spektrometria atomowa.

Wyniki

Uzyskane wyniki zestawiono w tabelach 20-23

Tab. 20. Parametry farmakokinetyczne wanadu we krwi szczurów cukrzycowych po jednokrotnym podaniu dożołądkowym siarczanu wanadu w dawce 15,12 mg V / kg masy ciała. Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy z wchłanianiem zerowego rzędu. Obliczenia wykonywano stosując metodę estymacji bayesowskiej.

Szczur / Parametr	1	2	3	4	5	6	Średnia ± SD
Tmax, [h]	3,00	8,58	5,78	8,99	3,17	9,17	6,45 ± 2,88
C max. (mg/l)	0,570	0,344	0,593	0,120	0,316	0,076	0,34 ± 0,22
AUCobs.(mg l^{-1}.h)	7,98	8,46	7,91	2,51	4,24	1,88	5,50 ± 2,98
AUC ext.(mg.l^{-1}.h)	8,00	8,47	7,95	2,54	4,28	1,94	5,53 ± 2,97
AUC mod.(mg.l^{-1}.h)	6,78	6,30	6,84	1,94	3,32	1,24	4,40 ± 2,55
MRT obs.	13,48	18,37	12,21	18,33	11,42	17,78	15,27 ± 3,25
MRT ext.	14,09	18,72	13,32	20,88	13,85	24,83	17,62 ± 4,67
MRT mod.	14,82	18,28	14,24	24,01	15,71	21,60	18,11 ± 3,96
$t_{1/2\ faza\ 1}$ (h)	0,200	9,17	0,225	0,256	0,626	0,214	1,78 ± 3,62
$t_{1/2\ faza\ 2}$ (h)	9,41	9,45	7,01	9,95	6,24	19,22	10,21 ± 4,66
$t_{1/2\ faza\ 3}$ (h)	158,7	174,2	184,3	174,9	180,8	175,1	174,67 ± 8,78
V_1 /F (l)	1,82	12,19	0,955	3,27	8,43	2,05	4,79 ± 4,50
Vss /F (l)	7,42	12,57	5,06	36,69	14,90	44,95	20,27 ± 16,51
Vtotal /F (l)	127,5	225,9	118,5	474,2	275,2	667,1	314,73 ± 215,69

Tab. 21. Parametry farmakokinetyczne wanadu we krwi szczurów cukrzycowych po jednokrotnym podaniu dożołądkowym B w dawce 12,75 mg V / kg masy ciała. Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy z wchłanianiem zerowego rzędu. Obliczenia wykonywano stosując metodę estymacji bayesowskiej.

Szczur / Parametr	1	2	3	4	56	6	7	Średnia ± SD
Tmax h	10,0	6,0	10,0	6,35	6,0	10,0	8,56	8,13 ± 1,95
C max. (mg/l)	0,588	0,600	0,792	0,605	0,482	0,755	0,614	0,63 ± 0,11
AUCobs.(mg l^{-1}.h)	24,10	23,28	34,65	28,05	27,22	33,88	30,25	28,78 ± 4,43
AUC ext.(mg.l^{-1}.h)	30,93	29,31	44,03	33,46	33,89	40,84	36,26	35,53 ± 5,29
AUC mod.(mg.l^{-1}.h)	24,18	19,04	32,66	24,71	24,00	27,25	26,33	25,45 ± 4,11
MRT obs.	23,94	23,27	23,31	23,30	24,25	20,74	23,83	23,23 ± 1,16
MRT ext.	72,35	69,23	69,65	58,92	67,44	58,78	60,56	65,28 ± 5,69
MRT mod.	135,6	47,87	130,4	86,87	79,89	119,1	85,08	97,83 ± 31,73
$t_{1/2\ faza\ 1}$ (h)	7,39	11,16	0,495	0,432	0,709	0,417	0,440	3,01 ± 4,42
$t_{1/2\ faza\ 2}$ (h)	11,84	35,08	12,31	19,80	27,07	11,41	20,50	19,72 ± 8,91
$t_{1/2\ faza\ 3}$ (h)	168,5	171,1	167,0	168,9	168,8	169,2	170,1	169,09 ± 1,29
V_1 /F (l)	2,28	2,81	2,34	2,91	3,27	2,54	2,85	2,71 ± 0,35
Vss /F (l)	9,45	4,57	9,14	6,98	5,45	10,55	6,17	7,47 ± 2,26
Vtotal /F (l)	17,59	25,16	17,56	20,32	17,25	22,57	18,73	19,88 ± 3,00

Tab. 22. Parametry farmakokinetyczne wanadu we krwi szczurów cukrzycowych po jednokrotnym podaniu dożołądkowym V_3 w dawce 12,75 mg V / kg masy ciała. Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy z wchłanianiem zerowego rzędu. Obliczenia wykonywano stosując metodę estymacji bayesowskiej.

Szczur / Parametr	1	2	3	4	5	6	7	Średnia ± SD
Tmax, h	7,67	10,27	3,70	8,22	9,84	2,01	3,17	6,41 ± 3,38
C max. (mg/l)	0,851	0,585	0,877	0,498	0,535	2,397	0,636	0,91 ± 0,67
AUCobs.(mg l^{-1}.h)	19,72	18,62	23,25	15,38	20,09	22,07	23,77	20,41 ± 2,92
AUC ext.(mg.l^{-1}.h)	26,47	23,13	28,17	20,29	24,91	27,62	30,65	25,89 ± 3,44
AUC mod.(mg.l^{-1}.h)	23,76	17,69	22,29	12,75	19,89	25,29	25,30	21,00 ± 4,59
MRT obs.	24,53	22,24	20,74	23,49	20,95	20,90	23,73	22,37 ± 1,56
MRT ext.	80,09	67,34	59,49	80,35	64,09	65,41	72,39	69,88 ± 8,04
MRT mod.	134,1	124,96	108,0	53,90	120,50	106,1	124,9	110,35 ± 26,78
$t_{1/2\ faza\ 1}$ (h)	0,545	2,79	9,66	7,75	4,12	0,655	0,419	3,71 ± 3,72
$t_{1/2\ faza\ 2}$ (h)	13,14	9,70	9,66	56,07	10,37	11,03	15,26	17,89 ± 16,96
$t_{1/2\ faza\ 3}$ (h)	167,9	175,7	168,9	179,1	168,9	168,0	166,7	170,74 ± 4,71
V_1 /F (l)	0,489	2,20	2,07	3,07	1,87	0,451	2,86	1,86 ± 1,04
Vss /F (l)	12,93	14,84	9,81	8,16	11,58	9,06	10,43	10,97 ± 2,32
Vtotal /F (l)	24,06	31,38	22,51	42,37	24,01	20,90	20,34	26,51 ± 7,89

Tab. 23. Porównanie wartości parametrów farmakokinetycznych badanych związków: siarczanu wanadu, B i V_3 u szczurów diabetycznych (D) w stosunku do tych samych związków u szczurów zdrowych (Z)

Grupa / Parametry	B	V_3	$VOSO_4$	BD/ BZ	V_3D/ V_3Z	$VOSO_4D$/ $VOSO_4Z$
Tmax (h)	8,13 ± 1,95	6,41 ± 3,38	6,45 ± 2,88	0,730	0,564	0,629
Cmax (mg/l)	0,63 ± 0,11	0,91 ± 0,67	0,34 ± 0,22	1,400	2,275	0,683
AUC obs.($mg.l^{-1}.h$)	28,78 ± 4,43	20,41 ± 2,92	5,50 ± 2,98	2,057	1,562	0,424
AUC ext.($mg.l^{-1}.h$)	35,53 ± 5,29	25,89 ± 3,44	5,53 ± 2,97	1,653	1,265	0,312
AUC mod.($mg.l^{-1}.h$)	25,45 ± 4,11	21,00 ± 4,59	4,40 ± 2,55	1,397	1,124	0,317
MRT obs.	23,23 ± 1,16	22,37 ± 1,56	15,27 ± 3,25	0,841	0,787	0,821
MRT ext.	65,28 ± 5,69	69,88 ± 8,04	17,62 ± 4,67	0,630	0,667	0,239
MRT mod.	97,83 ± 31,73	110,35±26,78	18,11 ± 3,96	0,612	0,636	0,135
$t_{1/2}$ faza 1 (h)	3,01 ± 4,42	3,71 ± 3,72	1,78 ± 3,62	3,202	1,984	4,149
$t_{1/2}$ faza 2 (h)	19,72 ± 8,91	17,89 ± 16,96	10,21 ± 4,66	1,581	1,258	0,873
$t_{1/2}$ faza 3 (h)	169,09 ± 1,29	170,74 ± 4,71	174,67 ± 8,78	0,995	1,010	0,944
V1/F (l)	2,71 ± 0,35	1,86 ± 1,04	4,79 ± 4,50	2,441	1,114	5,987
Vss/F (l)	7,47 ± 2,26	10,97 ± 2,32	20,27 ± 16,51	0,347	0,468	0,546
Vtotal/F (l)	19,88 ± 3,00	26,51 ± 7,89	314,73±215,69	0,564	0,764	3,622

Omówienie wyników

Maksymalne stężenie po dożołądkowym podaniu szczurom diabetycznym 15,12 mg V/kg w postaci **siarczanu wanadu** występowało po 6,4 ± 2,9 godzinach i wahało się od 0,076 do 0,593 mg/l.

Maksymalne stężenie po dożołądkowym podaniu szczurom diabetycznym 12,75 mg V/kg w postaci **związku B** występowało po 8,1 ± 1,9 godzinach i wahało się od 0,482 do 0,792 mg/l.

Maksymalne stężenie po dożołądkowym podaniu szczurom diabetycznym 12,75 mg V/kg w postaci **związku V_3** występowało po 6,4 ± 3,4 godzinach i wahało się od 0,498 do 2,397 mg/l.

U badanych szczurów cukrzycowych przebieg zmian stężenia wanadu we krwi po osiągnięciu maksimum również okazał się zgodny z modelem trójkompartmentowym.

Analiza fazy wchłaniania badanych związków (siarczan wanadu, B i V_3) wykazała, że procesy te także są procesami zerowego rzędu.

Względna dostępność biologiczna związków B i V_3 u zwierząt diabetycznych w odniesieniu do zwierząt zdrowych była rzędu 165 i 125 % odpowiednio, zaś dla siarczanu wanadu zaledwie 32 %.

Analiza statystyczna wyników z etapu drugiego i trzeciego

U zwierząt diabetycznych stwierdzono istotne statystycznie obniżenie T_{max} po podaniu siarczanu wanadu i związku V_3 ($p<0,05$).

W grupie zwierząt diabetycznych zaobserwowano wyższe C_{max} (znormalizowane - zobacz metodyka str. 90) dla związków B i V_3 w porównaniu do siarczanu wanadu, przy czym statystycznie istotna różnica ($p<0,05$) występowała tylko dla V_3. W grupie zwierząt zdrowych brak było takiego zróżnicowania.

Znormalizowane AUC_{ext} u zwierząt diabetycznych było statystycznie istotnie niższe ($p<0,05$) dla siarczanu wanadu niż u szczurów zdrowych. Było ono również niższe w stosunku do zwierząt (zdrowych i diabetycznych), którym podawano związki B lub V_3.

Znormalizowane AUC_{ext} u szczurów diabetycznych było statystycznie istotnie wyższe ($p<0,05$) dla związków B i V_3, niż u zwierząt zdrowych.

Takie same wnioski statystyczne uzyskano dla parametru AUC_{mod} we wszystkich powyższych przypadkach.

MRT_{ext} u zwierząt diabetycznych było statystycznie istotnie niższe ($p<0,05$) dla siarczanu wanadu i związku B, niż u szczurów zdrowych, którym również podawano te związki.

MRT_{ext} u zwierząt diabetycznych było statystycznie istotnie niższe ($p<0,05$) dla siarczanu wanadu niż u zwierząt diabetycznych ze związkami B i V_3.

Podobne wyniki uzyskano dla parametru MRT_{mod}.

V_{ss} u zwierząt zdrowych było statystycznie istotnie wyższe ($p<0,05$) dla związku V_3 niż u zwierząt diabetycznych jak i dla pozostałych związków (siarczanu wanadu i B) w obu grupach zwierząt (diabetycznych i zdrowych).

Dla związku B u zwierząt diabetycznych V_{ss} było statystycznie istotnie niższe ($p<0,05$) niż u zwierząt zdrowych z trzema badanymi związkami.

Analiza zmian stężenia wanadu we krwi po podaniu dożylnym siarczanu wanadu wykazała, że do opisu tych zmian należało zastosować trójkompartmentowy, liniowy model farmakokinetyczny.

Analiza zmian stężenia wanadu we krwi po podaniu dożołądkowym siarczanu wanadu jak i związków B i V_3 pozwoliła przyjąć, że wchłanianie tych związków z przewodu pokarmowego jest procesem zerowego rzędu.

U szczurów zdrowych bezwzględna dostępność biologiczna siarczanu wanadu wynosiła 16%. Oznacza to, że wanad podany w tej postaci był słabo wchłaniany z przewodu pokarmowego i duża część podanej dawki była wydalana wraz z kałem.

U szczurów zdrowych względna biodostępność wanadu z badanych kompleksów w stosunku do VOSO4 była wyższa i w przypadku związku B wynosiła 144 % a dla związku V_3 137 % wartości $VOSO_4$.

Cukrzyca indukowana u szczurów, wpływała w sposób istotny na parametry farmakokinetyczne (T_{max}, C_{max}, AUC_{ext} i AUC_{mod}, MRT_{ext} i MRT_{mod}) wanadu po podaniu dożołądkowym związków $VOSO_4$, B lub V_3. Siarczan wanadu wchłaniał się szybciej, ale w mniejszym stopniu niż u zwierząt zdrowych. Związki B i V_3 wchłaniały się lepiej niż u zwierząt zdrowych (względna biodostępność w stosunku do zwierząt zdrowych wynosiła 165% i 125 % odpowiednio). Związek V_3 wchłaniał się u szczurów diabetycznych szybciej niż u szczurów zdrowych, natomiast w przypadku związku B nie stwierdzono różnic w czasie wchłaniania.

U zwierząt diabetycznych postać w jakiej był podany wanad (związek nieorganiczny – siarczan wanadu lub kompleksy organiczne - związek B i V_3) wpływała na wartości niektórych parametrów farmakokinetycznych (AUC_{ext} i AUC_{mod}, MRT_{ext} i MRT_{mod}). Wanad z siarczanu wanadu wchłaniał się najsłabiej i najwolniej, zaś mocniej z V_3 a najsilniej z B.

Względna dostępność biologiczna związków B i V_3 u zwierząt diabetycznych w stosunku do $VOSO_4$ była wyższa.

4.2.4 Farmakokinetyka $VOSO_4$ u szczurów zdrowych w zależności od medium, w którym był rozpuszczony ten związek

Istotnym źródłem wanadu w diecie Francuzów jest wino. Dlatego postanowiono przeanalizować, który z głównych składników wina może wpływać na wchłanianie wanadu z przewodu pokarmowego. Jako związek modelowy wybrano $VOSO_4$, który rozpuszczono w 4 różnych roztworach (patrz metodyka).

Metodyka

Zdrowe szczury rasy Wistar zostały podzielone na 4 grupy po 6 sztuk. Zwierzęta głodzono przez 15 h przed przystąpieniem do zasadniczej części doświadczenia.
Przygotowano roztwory siarczanu wanadu w czterech różnych mediach: w wodzie destylowanej, w roztworze 13% alkoholu etylowego, w liofilizacie wina czerwonego (2,5 g liofilizatu rozpuszczone w jednym litrze wody) i w winie odtworzonym (liofilizat wina + 13% roztwór alkoholu). Średnia zawartość alkoholu we winach wynosi około 13% i dlatego do doświadczeń przyjęto tę wartość. Liofilizat był przygotowany z wina AOC CorbiÈres CI-2 we Francji w 1999 roku.

Roztwór siarczanu wanadu podawano w różnych mediach sondą dożołądkową w ilości 10 ml/kg, co odpowiadało dawce 15,12 mg V/kg masy szczura.

Tuż przed podaniem roztworów wanadu pobrano z ogona krew do eppendorfów w sposób analogiczny jak we wcześniejszych badaniach farmakokinetycznych. Następnie pobierano krew po upływie 1, 3, 6, 9, 12, 36 i 120 godz. od podania roztworów. Pomiary wanadu i obliczenia oraz analizę farmakokinetyczną wykonano w sposób analogiczny jak we wcześniejszych badaniach.

Naturalna zawartość wanadu w ekstrakcie wina użytego do badań wynosiła 27 μg/l. Stanowiło to ułamek procenta dawki wanadu podawanego szczurom w postaci $VOSO_4$. Dlatego wartość tę pominięto w dalszych obliczeniach farmakokinetycznych.

Uzyskane wyniki przedstawiono w poniższych tabelach 24-28 i rysunkach 58-61.

Tab. 24. Parametry farmakokinetyczne wanadu oznaczone we krwi po jednokrotnym podaniu dożołądkowym roztworu siarczanu wanadu (15,12 mg V/kg masy ciała szczura) w **wodzie destylowanej**. Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy z wchłanianiem zerowego rzędu. Obliczenia wykonywano stosując metodę estymacji bayesowskiej.

Szczur / Parametr	1	2	3	4	5	6	Mean ± SD
Dawka (mg)	3,795	3,432	3,644	3,750	3,810	3,977	3,700±0,219
Tmax (h)	6,0	4,18	9,0	11,0	6,0	7,0	7,19±2,43
C_{max} (mg/l)	1,10	1,18	1,48	1,01	1,19	1,173	1,172±0,0174
AUC_{obs} (mg h/l)	20,24	19,66	30,00	24,50	21,900	22,70	23,16±3,77
AUC_{ext} (mg h/l)	29,27	42,99	35,20	30,60	30,10	34,00	33,70±5,11
AUC_{mod} (mg h/l)	25,83	40,31	28,10	25,60	25,60	31,60	29,50±5,78
CL/F (l/h)	0,147	0,0851	0,129	0,147	0,148	0,126	0,130±0,024
MRT_{obs} (h)	23,1	30,5	18,7	21,7	22,0	26,5	23,7±4,15
MRT_{ext} (h)	91,1	206	58,5	65,2	84,8	98,0	100,0±54,0
MRT_{mod} (h)	144	275	88,4	99,8	135	148	148,0±67,0
$t_{½\ faza\ 1}$ (h)	0,454	0,335	1,23	0,529	0,277	0,730	0,590±0,350
$t_{½\ faza\ 2}$ (h)	7,72	5,34	12,2	13,3	10,5	9,04	9,68±2,94
$t_{½\ faza\ 3}$ (h)	168	245	197	168	176	166	186±31,0
V_1/F (l)	0,766	0,885	0,685	0,396	0,358	0,897	0,665±0,223
V_2/F (l)	2,08	1,45	1,31	2,25	2,75	1,93	1,96±0,53
V_3/F (l)	17,9	20,9	8,85	11,2	16,5	15,4	15,1±4,42
V_{ss}/F (l)	20,8	23,2	10,8	13,8	19,6	18,2	17,7±4,61
$V_{całkowite}/F$ (l)	35,7	30,1	36,8	35,5	37,7	30,2	34,3±3,33

Tab. 25. Parametry farmakokinetyczne wanadu oznaczone we krwi po jednokrotnym podaniu dożołądkowym roztworu siarczanu wanadu (15,12 mg V/kg masy ciała szczura) w wodnym roztworze **liofilizatu wina**. Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy z wchłanianiem zerowego rzędu. Obliczenia wykonywano stosując metodę estymacji bayesowskiej.

Szczur / Parametr	1	2	3	4	5	6	Mean ± SD
Dawka (mg)	4,264	4,914	4,309	4,415	4,218	4,415	4,42±0,25
Tmax (h)	8,46	8,99	11,5	8,38	12,0	11,5	10,2±1,70
C_{max} (mg/l)	0,834	1,413	1,289	0,577	0,852	0,604	0,928±0,349
AUC_{obs} (mg h/l)	19,84	30,10	48,15	15,83	28,26	20,78	27,16±11,60
AUC_{ext} (mg h/l)	26,46	69,66	67,37	23,25	41,42	32,95	38,51±16,60
AUC_{mod} (mg h/l)	21,77	57,19	50,74	21,71	34,34	28,17	35,65±15,00
CL/F (l/h)	0,196	0,0859	0,049	0,203	0,123	0,156	0,144±0,052
MRT_{obs} (h)	21,9	21,8	25,0	33,6	26,9	29,2	26,4±4,5
MRT_{ext} (h)	82,0	384	86,3	70,5	95,7	109	138±121
MRT_{mod} (h)	132	456	166	103	166	171	207±125
$t_{½\ faza\ 1}$ (h)	0,206	0,231	0,643	1,90	0,864	0,357	0,70±0,64
$t_{½\ faza\ 2}$ (h)	8,84	4,26	14,3	10,1	12,5	10,7	10,1±3,45
$t_{½\ faza\ 3}$ (h)	181	456	166	103	166	171	207±125
V_1/F (l)	0,529	0,422	0,465	2,76	0,836	0,719	0,876±0,931
V_2/F (l)	3,23	1,17	2,24	0,145	2,69	4,39	2,31±1,50
V_3/F (l)	21,3	40,5	9,83	21,8	15,4	21,9	21,8±10,3
V_{ss}/F (l)	25,1	42,1	12,5	24,7	18,9	27,0	25,1±9,90
$V_{całkowite}/F$ (l)	51,3	56,6	20,4	30,3	29,5	38,7	37,8±13,9

Tab. 26. Parametry farmakokinetyczne wanadu oznaczone we krwi po jednokrotnym podaniu dożołądkowym roztworu siarczanu wanadu (15,12 mg V/kg masy ciała szczura) w **winie odtworzonym**. Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy z wchłanianiem zerowego rzędu. Obliczenia wykonywano stosując metodę estymacji bayesowskiej.

Szczur / Parametr	1	2	3	4	5	6	Mean ± SD
Dawka (mg)	4,475	4,551	4,249	4,687	4,612	4,460	4,51±0,168
Tmax (h)	7,0	6,0	11,5	6,2	6,0	9,0	7,34±2,36
C_{max} (mg/l)	1,73	1,786	1,836	1,50	1,526	1,156	1,657±0,153
AUC_{obs} (mg h/l)	61,48	44,88	63,05	32,48	41,05	23,53	48,6±13,3
AUC_{ext} (mg h/l)	80,23	70,80	86,83	48,73	56,13	27,88	68,5±16,0
AUC_{mod} (mg h/l)	61,98	64,91	72,84	44,0	49,10	21,36	58,5±11,8
CL/F (l/h)	0,0722	0,0701	0,0583	0,106	0,0939	0,209	0,0801±0,019
MRT_{obs} (h)	28,0	29,6	28,2	26,4	26,5	16,4	27,74±1,33
MRT_{ext} (h)	78,1	107	86,6	100	76,4	53,1	89,6±13,5
MRT_{mod} (h)	87,0	164	128	154	122	90,2	131±30,0
$t_{½\ faza\ 1}$ (h)	0,701	0,330	0,589	0,233	0,369	4,08	0,444±0,194
$t_{½\ faza\ 2}$ (h)	23,0	10,3	16,5	9,49	9,88	7,15	13,83±5,87
$t_{½\ faza\ 3}$ (h)	168	167	167	172	147	174	164,2±9,8
V_1/F (l)	0,919	0,550	0,410	0,416	1,43	2,17	0,747±0,435
V_2/F (l)	1,93	1,85	1,62	2,38	1,15	0,172	1,786±0,449
V_3/F (l)	3,17	8,92	5,14	13,3	8,64	15,5	7,83±3,89
V_{ss}/F (l)	6,02	11,3	7,17	16,1	11,2	17,9	10,36±3,98
$V_{całkowite}/F$ (l)	17,5	16,9	14,1	26,5	19,9	52,5	18,98±4,68

Tab. 27. Parametry farmakokinetyczne wanadu oznaczone we krwi po jednokrotnym podaniu dożołądkowym roztworu siarczanu wanadu (15,12 mg V/kg masy ciała szczura) rozpuszczonego w **13% roztworze alkoholu**. Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy z wchłanianiem zerowego rzędu. Obliczenia wykonywano stosując metodę estymacji bayesowskiej.

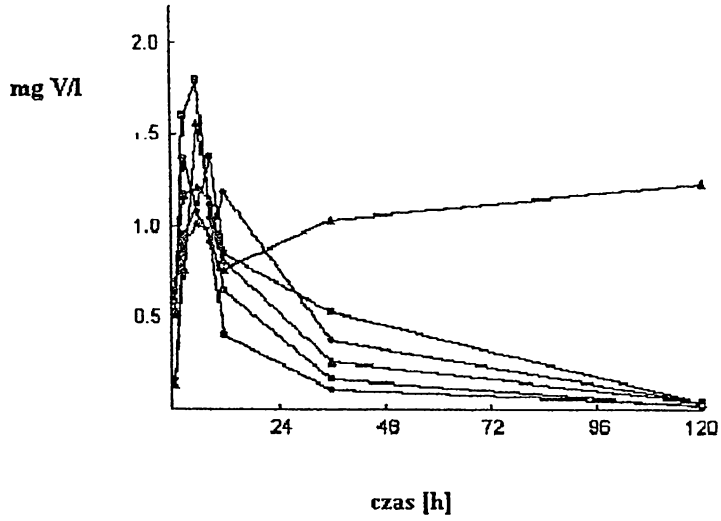
Szczur / Parametr	1	2	3	4	5	6	Mean ± SD
Dawka (mg)	3,549	3,780	3,735	3,689		3,946	3,744±0,144
Tmax (h)	10,0	8,0	8,0	5,15		10,0	8,23±1,99
C_{max} (mg/l)	1,26	1,42	1,58	2,02		1,44	1,54±0,29
AUC_{obs} (mg h/l)	46,54	22,55	52,64	31,62		37,49	38,4±12,2
AUC_{ext} (mg h/l)	55,60	28,64	62,25	36,26		48,95	46,3±18,9
AUC_{mod} (mg h/l)	42,07	25,86	44,90	29,62		41,43	36,8±8,5
CL/F (l/h)	0,0843	0,146	0,0832	0,124		0,0952	0,106±0,027
MRT_{obs} (h)	25,17	19,95	26,92	18,84		24,03	23,0±3,4
MRT_{ext} (h)	60,96	68,59	65,15	48,04		83,61	65,3±12,9
MRT_{mod} (h)	79,07	102	50,10	58,48		123,7	82,7±30,5
$t_{½\ faza\ 1}$ (h)	3,39	0,767	0,369	2,69		0,523	1,55±1,39
$t_{½\ faza\ 2}$ (h)	17,64	10,73	21,32	18,21		14,21	16,4±4,1
$t_{½\ faza\ 3}$ (h)	169,7	172,6	190,3	171,4		193,1	179±11
V_1/F (l)	1,92	0,511	0,435	1,12		0,400	0,877±0,652
V_2/F (l)	0,573	1,556	2,05	1,36		1,95	1,50±0,59
V_3/F (l)	3,75	12,25	1,344	4,48		8,95	6,15±4,38
V_{ss}/F (l)	6,25	14,32	3,83	6,96		11,30	8,53±4,21
$V_{całkowite}/F$ (l)	20,6	36,40	22,83	30,80		26,50	27,4±6,33

Tab. 28. Parametry farmakokinetyczne wanadu oznaczone we krwi po jednokrotnym podaniu dożołądkowym siarczanu wanadu (15,12 mg V/kg masy ciała szczura) rozpuszczonego w różnych mediach. Wyniki analizowano w oparciu o trójkompartmentowy model liniowy z wchłanianiem zerowego rzędu. Obliczenia wykonywano stosując metodę estymacji bayesowskiej.

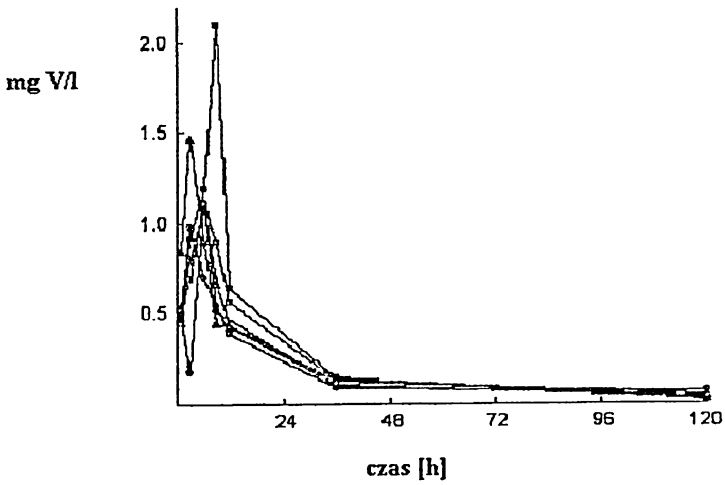
	Woda		Alkohol		Liofilizat wina		Wino odtworzone	
Parametr	śred±SD n=6	CV %	śred±SD n=5	CV %	śred±SD n=6	CV %	śred±SD n=6	CV %
Dawka (mg)	3,700±0,219	5,9	3,744±0,144	3,8	4,42±0,25	5,7	4,51±0,168	3,7
Tmax (h)	7,19±2,43[a]	34,0	8,23±1,99	24,0	10,2±1,70 *[a,b]	16,7	7,34±2,36[b]	32,0
C_{max} (mg/l)	1,172±0,0174	14,8	1,54±0,29[c]	18,7	0,928±0,349 *[c,d]	37,6	1,657±0,153[d]	9,1
AUC_{obs} (mg h/l)	23,16±3,77	16,3	38,4±12,2	31,8	27,16±11,60	42,7	48,6±13,3	27,4
AUC_{ext} (mg h/l)	33,70±5,11	15,2	46,3±18,9	30,0	38,51±16,60	43,3	68,5±16,0	23,3
AUC_{mod} (mg h/l)	29,50±5,78	19,9	36,8±8,5	23,0	35,65±15,00	42,3	58,5±11,8	20,2
CL/F (l/h)	0,130±0,024	18,6	0,106±0,027	26,0	0,144±0,052	37,0	0,0801±0,019	8,0
MRT_{obs} (h)	23,7±4,15	17,5	23,0±3,4	15,0	26,4±4,5	17,2	27,74±1,33	4,8
MRT_{ext} (h)	100,0±54,0	53,4	65,3±12,9	19,7	138±121	16,4	89,6±13,5	15,0
MRT_{mod} (h)	148,0±67,0	44,9	82,7±30,5	36,8	207±125	14,3	131±30,0	23,0
$t_{½ faza 1}$ (h)	0,590±0,350	59,0	1,55±1,39	89,6	0,70±0,64	91,5	0,444±0,194	43,6
$t_{½ faza 2}$ (h)	9,68±2,94	30,3	16,4±4,1	24,7	10,1±3,45	34,0	13,83±5,87	42,5
$t_{½ faza 3}$ (h)	186±31,0	16,5	179±11	6,3	207±125	19,7	164,2±9,8	6,0
V_1/F (l)	0,665±0,223	35,5	0,877±0,652	74,4	0,876±0,931	27,5	0,747±0,435	58,2
V_2/F (l)	1,96±0,53	27,0	1,50±0,59	39,2	2,31±1,50	43,0	1,786±0,449	25,1
V_3/F (l)	15,1±4,42	29,3	6,15±4,38	71,2	21,8±10,3	29,0	7,83±3,89	49,7
V_{ss}/F (l)	17,7±4,61	26,1	8,53±4,21	49,4	25,1±9,90	27,0	10,36±3,98	38,5
$V_{całkowite}/F$ (l)	34,3±3,33	9,7	27,4±6,33	23,1	37,8±13,9	36,7	18,98±4,68	24,6

* $p<0,05$

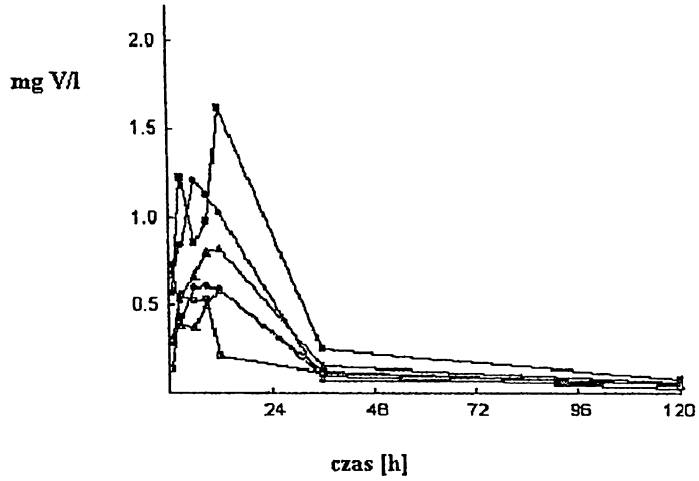
a, b, c, d grupy pomiędzy którymi istniały różnice statystycznie istotne



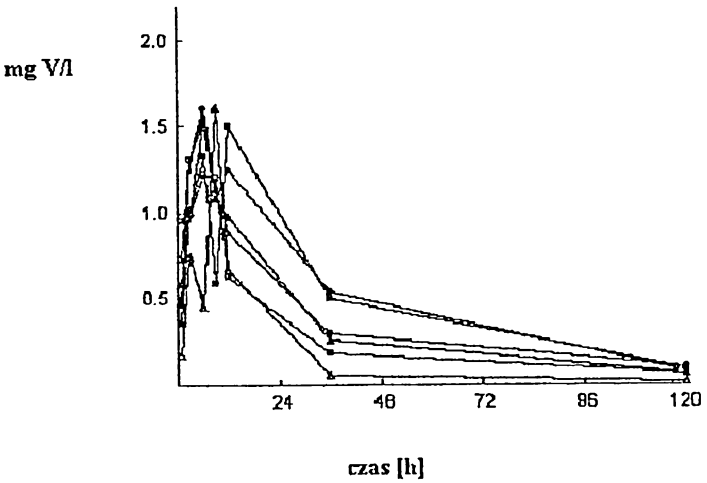
Rys. 58. Zmiany stężenia wanadu we krwi poszczególnych szczurów po podaniu siarczanu wanadu (15,12 mg V/kg masy ciała) rozpuszczonego w **alkoholu**



Rys. 59. Zmiany stężenia wanadu we krwi poszczególnych szczurów po podaniu siarczanu wanadu (15,12 mg V/kg masy ciała) rozpuszczonego w **wodzie destylowanej**



Rys. 60. Zmiany stężenia wanadu we krwi poszczególnych szczurów po podaniu siarczanu wanadu (15,12 mg V/kg masy ciała) rozpuszczonego w **liofilizacie wina**



Rys. 61. Zmiany stężenia wanadu we krwi poszczególnych szczurów po podaniu siarczanu wanadu (15,12 mg V/kg masy ciała) rozpuszczonego **winie odtworzonym**

AUC_{ext} w grupie zwierząt, które dostawały siarczan wanadu rozpuszczony w winie odtworzonym było znacznie wyższe niż w pozostałych grupach, jednak statystycznie istotnie podwyższone występowało jedynie w stosunku do wodnego roztworu siarczanu wanadu.

W grupie zwierząt, którym podawano $VOSO_4$ rozpuszczony w wodnym roztworze liofilizatu wina obserwowano statystycznie istotne obniżenie ($p<0,05$) C_{max} w stosunku do grup z alkoholem i winem odtworzonym.

W tej samej grupie zwierząt, którym podawano liofilizat wina obserwowano nieistotne statystycznie podwyższenie T_{max} w stosunku do pozostałych grup zwierząt.

Wnioski

Jak widać z uzyskanych wyników istnieją różnice w absorpcji wanadu z $VOSO_4$ podanego dożołądkowo, w zależności od tego w jakim medium rozpuszczony był ten związek. Alkohol wraz ze składnikami pochodzącymi z liofilizatu wina (wino odtworzone) zwiększał wchłanianie wanadu, podczas gdy sam alkohol miał dużo słabsze działanie, natomiast woda i wodny roztwór liofilizatu praktycznie nie wpływały na absorpcję wanadu.

Dyskusja badań farmakokinetycznych (etap I-IV)

Dla pełniejszej oceny aktywności kompleksów wanadu niezbędne było poznanie jego famakokinetyki.

Prace Patterson (1986) i Setyawati (1998), w których podawano związki wanadu zawierające ^{48}V wykazały wielokompartmentową farmakokinetykę tego pierwiastka.

Potwierdziły to także obserwacje własne przedstawione powyżej. Niezależnie od drogi podania (dożylnie czy też dożołądkowo) farmakokinetykę wanadu najlepiej opisywał model trójkomparmentowy.

W przeprowadzonym eksperymencie z badanymi związkami wanadu stwierdzono, że okres półtrwania procesu eliminacji wanadu po podaniu tych związków wynosił około 8 dni, co jest zgodne z pracami Patterson i współ. (1986), Setyawati i współ. (1998). Wykazali oni, że okres półtrwania procesu eliminacji wanadu z tkanek miękkich wahał się pomiędzy 1 a 10 dni, natomiast z kości był dłuższy i wynosił 14 dni.

Podobne dane uzyskano w pracach przeprowadzonych z preparatami bizmutu [Koch i współ. 1996] i preparatami platyny Cupissol i współ. 1996].

Wartości biodostępności wanadu przedstawione w niniejszej pracy, a uzyskane po doustnym podaniu siarczanu wanadu szczurom zdrowym wynosiły około 16 %. Inni autorzy badający biodostępność wanadu z różnych związków (głównie $VOSO_4$, ortowanadan sodowy) po podaniu doustnym wykazali, iż wynosiła ona około 5% [French i współ. 1993, al-Bayati i współ. 1991, Conclin i współ. 1982], w granicach 20% [Setyawati i współ. 1998, Wiegmann i współ. 1982] czy też więcej niż 30% [Bodgen i współ. 1982].

Niewiele jest natomiast prac porównujących farmakokinetykę wanadu w zależności od budowy związku, w którym on występował i jak zmieniają się parametry farmakokinetyczne tego pierwiastka u zwierząt cukrzycowych. Jedynie Hiroyuki i współ. (2000) wykazali, że istnieją różnice we wchłanianiu wanadu ze związków kompleksowych w zależności od tego w jakim połączeniu był on podany.

Wyniki te zostały potwierdzone w niniejszej pracy. W przypadku szczurów zdrowych oba testowane związki organiczne B i V_3 wykazały wyższą biodostępność (144% i 137% odpowiednio) niż siarczanu wanadu.

W cukrzycy doświadczalnej wchłanianie obu związków (B i V_3) ulegało nasileniu w stosunku do zwierząt zdrowych (165 % i 125 %) zaś w przypadku siarczanu wanadu osłabieniu (32 %).

Przebadano także wpływ alkoholu i substancji znajdujących się w winie na przyswajanie wanadu z siarczanu wanadu. Wiadomo, że alkohol wchodzi w interakcje z różnymi substancjami podczas podawania preparatów medycznych często wzmacniając ich działanie [za Wójcik-Jawień, 1998]. W przeprowadzonym eksperymencie wykazano, że T_{max} ulegał wydłużeniu w grupie zwierząt, którym podawano wodny roztwór liofilizatu wina, natomiast uzyskano wyższe stężenia wanadu (C_{max}) we krwi badanych szczurów w grupach z alkoholem i winem odtworzonym. Jednak efektywność wchłaniania wanadu (wyrażona parametrem AUC_{ext}) była największa w grupie zwierząt, którym podawano wino odtworzone. Obserwowane efekty można powiązać ze znanym faktem nasilenia ukrwienia w przewodzie pokarmowym pod wpływem alkoholu. Dodatkowo możliwe jest,

że alkohol wraz ze składnikami występującymi w lifilizacie wpływa na przyswajanie wanadu z przewodu pokarmowego.

Wnioski z badań farmakokinetycznych (etapy I-IV)

1) Przebieg zmian stężenia wanadu we krwi szczurów po podaniu badanych związków ($VOSO_4$, B i V_3) zarówno zwierzętom zdrowym jak i diabetycznym można najlepiej opisać modelem trójkompartmentowym. Model ten wyróżnia w organizmie trzy przestrzenie: krew, tkanki miękkie i tkanki twarde, pomiędzy którymi następuje wymiana wanadu.
2) Proces wchłaniania badanych związków wanadu ($VOSO_4$, B i V_3) z przewodu pokarmowego okazał się we wszystkich przypadkach procesem zerowego rzędu (tzn. że szybkość wchłaniania była stała).
3) Po podaniu dożołądkowym badanych związków czas uzyskania maksymalnego stężenia wanadu we krwi (T_{max}) był dłuższy u szczurów zdrowych (około 10 h) niż u cukrzycowych. U tych ostatnich ulegał skróceniu do około 8 h dla zwązku B i do około 6 h dla $VOSO_4$ i V_3.
4) Z porównania stężeń wanadu we krwi szczurów zdrowych po podaniu $VOSO_4$ (dożylnym i dożołądkowym) określono biodostępność wanadu z tego związku i wynosiła ona około 16 %.

   Biodostępność wanadu zależała od rodzaju podawanego związku. U szczurów zdrowych była ona wyraźnie (choć nieistotnie) wyższa w przypadku organicznych związków kompleksowych. Natomiast u szczurów cukrzycowych w stosunku do szczurów zdrowych względna biodostępność organicznych kompleksów wanadu B i V_3 wzrastała do około 165 % i 125 % odpowiednio, a malała dla $VOSO_4$ do 32 %.
5) Znaczącym źródłem wanadu w diecie Francuzów jest wino. Przebadano parametry farmakokinetyczne wchłaniania wanadu z $VOSO_4$ rozpuszczonego w czterech różnych mediach tzn. w: 13 % alkoholu, wodzie, w wodnym roztworze liofilizatu wina oraz w winie odtworzonym (lifilizat rozpuszczony w 13 % alkoholu). Wykazano, iż wanad był lepiej wchłaniany z roztworów alkoholowych niż wodnych, a najlepiej z wina odtworzonego.

4.3 Wanad w wybranych produktach spożywczych

4.3.1 Zawartość wanadu w wybranych winach z Francji (region Languedoc i Bordeaux) i Kalifornii.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w 1998 (Teissèdre, Krośniak, Portet i współ. 1998). Poniżej przedstawiono jedynie najważniejsze fragmenty tej pracy.

W kraju takim jak Francja, zwłaszcza w południowych jego regionach, wino jest napojem towarzyszącym codziennym posiłkom. Z tego też względu postanowiono zbadać jaka jest zawartość wanadu w wybranych winach francuskich. Uzyskane wyniki porównano z danymi otrzymanymi w równolegle prowadzonych analizach win kalifornijskich.

Materiał

Do badań wybrano łącznie 68 próbek wina białego i czerwonego z Francji z regionów Bordeaux i Languedoc oraz z Kalifornii z lat 1982-1994. Ponadto przebadano winogrona pochodzące z 12 odmian winorośli uprawianych na południu Francji.

.

Metodyka

Próbki wina (20 µl) nastrzykiwano bezpośrednio do wnętrza pirolitycznej kuwety grafitowej spektrometru absorpcji atomowej Varian 1275 z deuterowską korekcją tła, wyposażonego w moduł GTA-95. Do próbki dodawano HNO_3 (5 µl) o stężeniu 4% v/v jako modyfikatora. Każda próbka była nastrzykiwana trzykrotnie przy pomocy autosamlera.

Próbki winogron (20 g) zalewano 25 ml HNO_3, 3 ml H_2O_2 i 5 ml $HClO_4$ i przenoszono w specjalnym naczyniu do urządzenia mikrofalowego w celu mineralizacji. Po mineralizacji roztwór uzupełniano woda dejonizowaną (18,2 mΩ) do objętości 50 ml. Tak przygotowane próbki były przeznaczone do oznaczeń metodą AAS z zastosowaniem takiego samego programu temperatura czas jak dla próbek wina.

W celu optymalizacji metody analizy zawartości wanadu w próbkach win i winogron opracowano specjalny program pracy aparatu, przedstawiony poniżej (Tab. 29).

Tab. 29. Parametry (temperatura, czas) zastosowane podczas analizy wanadu w winie i winogronach metodą AAS

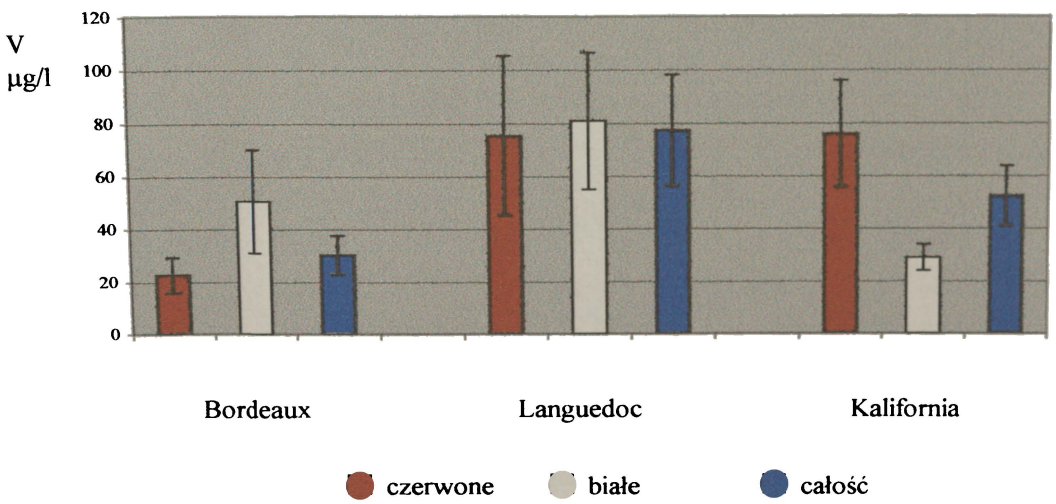
Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Przepływ azotu [mL/min]
nastrzykiwanie	75	10	3,0
odparowanie	90	10	3,0
spopielanie	110	10	3,0
	300	90	3,0
	1000	30	3,0
	1000	5	0
atomizacja	2750	1,1	0
	2750	2	0
czyszczenie	2750	2	3,0

Długość fali 318,5 nm, natężenie prądu w lampie 7 mA, szczelina 0,5 nm, gaz azot o czystości 99,99%

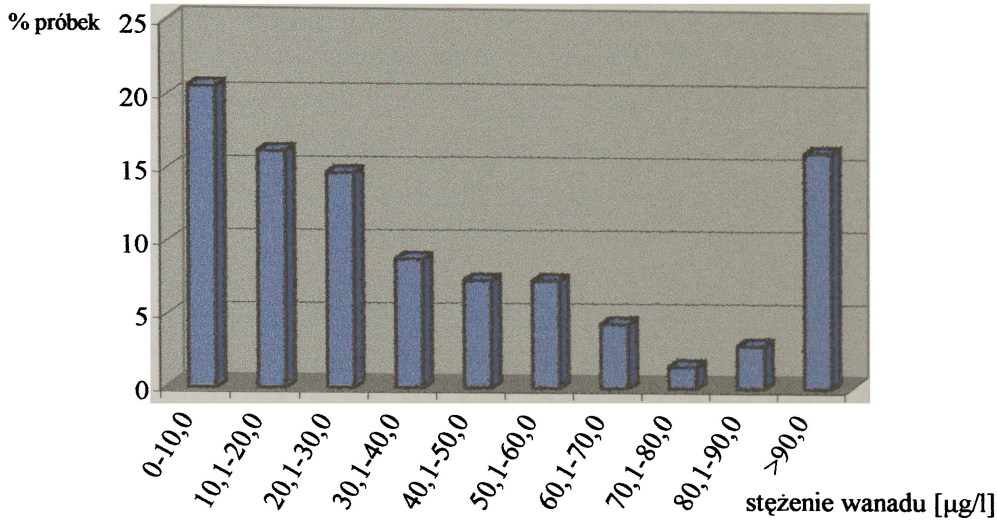
Krzywą wzorcową oparto na wzorcach 0, 25, 50,100 µg/l zrobionych z roztworu wzorcowego wanadu firmy Merck o stężeniu 1,000±0,002 g/l. W razie konieczności próbki wina były rozcieńczane wodą dejonizowaną.

Wyniki i ich omówienie

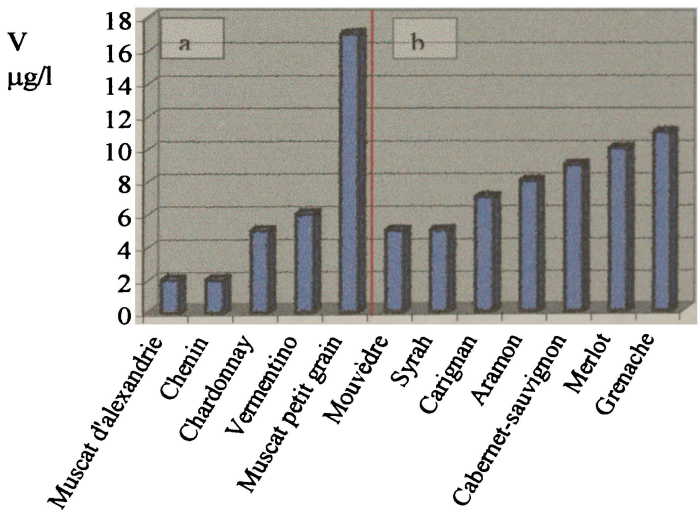
Uzyskane wyniki zestawiono na poniższych rysunkach (Rys. 62-64)



Rys. 62. Średnia zawartość wanadu w wybranych winach francuskich kalifornijskich



Rys. 63. Procentowy udział próbek w poszczególnych przedziałach stężeń wanadu w badanych winach



Rys. 64. Zawartość wanadu w winogronach białych (a) i czerwonych (b)

Zawartość wanadu w badanych winach mieściła się w szerokim zakresie stężeń (4 – 447 μg/l). 80% badanych próbek zawierało 0-70,0 μg V/l zaś 20% powyżej 70 μg V/l (Rys. 63).

Region, z którego pochodziły wina decydował gównie o zawartości wanadu w winie (Rys. 62). Wina z regionu Languedoc zawierały średnio 2,6 razy więcej wanadu niż wina z regionu Bordeaux (odpowiednio 77,3±20,9 μg/l i 30,2±7,4 μg/l, $p \leq 0,05$). Średnie stężenie wanadu w winach z Kalifornii wynosiło 52,4±11,3μg/l było około 1,7 razy wyższe niż w winach z Bordeaux.

Wpływ rodzaju wina (białe czy czerwone) na zawartość w nim wanadu jest niejasny, ponieważ w czerwonych winach z Bordeaux średnia zawartość wanadu była około dwukrotnie niższa, niż w białych winach, podczas gdy w winach z Languedoc różnice te były nieistotne statystycznie. W winach kalifornijskich zaobserwowano odwrotne zjawisko, ponieważ wina czerwone zawierały średnio ponad 2,5 raza więcej wanadu niż wina białe.

Biorąc jednak pod uwagę wszystkie badane wina (bez podziału na regiony) i porównując w nich zawartości wanadu uzyskane dla poszczególnych win białych i czerwonych, daje się jednak zauważyć pewien trend. Wina czerwone były nieco bogatsze w wanad niż wina białe. Zawartość wanadu w winach białych wahała się od 6 do 228 μg/l, a w czerwonych od 4 do 447 μg/l. Ponadto 12% próbek wina białego i 18 % wina czerwonego charakteryzowało się stężeniem wanadu powyżej 90 μg/l.

Aby stwierdzić czy stężenie wanadu w winie jest zależne od zawartości tego pierwiastka w winogronach porównano te materiały (Rys. 64). Oznaczona zawartość wanadu w winogronach wynosiła od 2,0 do 17,0 μg/kg, natomiast w winach była przeważnie o rząd wielkości wyższa.

Sok użyty do produkcji wina stanowi ok. 80% masy winogron. Prawdopodobnie więc niektóre wina są wzbogacane w wanad w toku ich produkcji. Na końcowe stężenie wanadu w winie wpływa więc nie tylko odmiana winorośli i zawartość wanadu w glebie ale również sposób jego produkcji (urządzenia ze stali zawierającej wanad, metody filtracji, pigmenty zawierające wanad, zastosowane do barwienia szkła butelkowego) oraz czas leżakowania wina.

Dokładne wyjaśnienie pochodzenia wanadu w winach wymaga dalszych badań.

W zestawionych powyżej badaniach stężenie wanadu w próbkach win było wyższe niż w wynikach podanych przez Davidescu (1978) 0,2-0,7 μg/L, lecz podobne do badań Interesse i współ. (1984) 10-200 μg/L.

We Francji spożycie wina spadło z 305 ml/dzień (Darret i współ. 1986) do 180 ml/dzień (Boulet i współ. 1995). Byrne i współ. 1991 ocenili, że obecnie statystyczny dorosły Francuz pobiera z wina średnio około 11 μg V/dzień. Dla mieszkańców innych państw kształtuje się to następująco: Hiszpania 11,8 μg V/dzień, południowe stany USA 15,5 μg V/dzień, Włochy 17,7 μg V/dzień, zachodnie stany USA 25,5 μg V/dzień.

4.3.2 Zawartość wanadu w próbkach oliwy z oliwek dostępnych w handlu na południu Francji

Z danych w piśmiennictwie wynika, że tłuszcze roślinne zawierają stosunkowo duże ilości wanadu [Kabata-Pendias i współ. 1999].

Celem tych badań była więc próba oceny zawartości wanadu w próbkach oliwy z oliwek dostępnych w handlu na południu Francji.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w 2000 r. (Krośniak i współ.). Poniżej przedstawiono jedynie niektóre dane.

Materiał

Materiał do badań stanowiły próbki 13 różnych rodzajów olejów z oliwek dostępnych w handlu na południu Francji. Na rys. 65 podano stężenie wanadu w poszczególnych rodzajach olejów zakodowanych symbolami A-Ł.

Metodyka – optymalizacja procedury mineralizacji olejów

W pracy tej opracowano nową metodę oznaczania wanadu w olejach jadalnych. Trudności analityczne polegają na przygotowaniu próbek do analizy. W pracy tej zastąpiono kłopotliwy wstępny etap mineralizacji próbek olejów, mineralizacją bezpośrednio we wnętrzu kuwety grafitowej.

Oleje nie rozpuszczają się w wodzie i mają dużą lepkość, tak że ścisłe odmierzenie objętości rzędu µl przy pomocy autosamplera jest wręcz niemożliwe z powodów pozostawania na końcówce resztek oleju.

W pracy tej próbki oliwy z oliwek rozpuszczano w chloroformie w stosunku objętościowym 1:4, tuż przed wykonaniem pomiarów. Następnie nastrzykiwano je do wnętrza kuwety grafitowej aparatu AAS firmy Varian 1275 z deuterowską korekcją tła, wyposażonego w moduł GTA-95 przy pomocy autosamplera. Potem dostrzykiwano modyfikator (5% HNO_3 – 5µl).

Krzywa wzorcowa została sporządzona metodą dodatków wzorca, który był podawany we wzrastającym stężeniu 20,50,100 µg/l. Wcześniej opracowano specjalny program (temperatura czas) pracy aparatu pozwalający na mineralizację oliwy bezpośrednio w kuwecie grafitowej (Tab. 30).

Tab. 30. Parametry (temperatura, czas) zastosowane podczas analizy wanadu metodą AAS w próbkach oliwy z oliwek.

etap	czas [s]	temperatura [°C]	Gaz azot [l/min]
nastrzykiwanie	1	100	3.0
odparowanie	30	120	3.0
	30	160	3.0
	99	210	3.0
spopielanie	30	800	3.0
	30	1800	3.0
	10	1800	3.0
	10	40	0.0
atomizacja	1.1	2750	0.0
	2	2750	0.0
	2	2750	1.5
czyszczenie	15	100	3.0

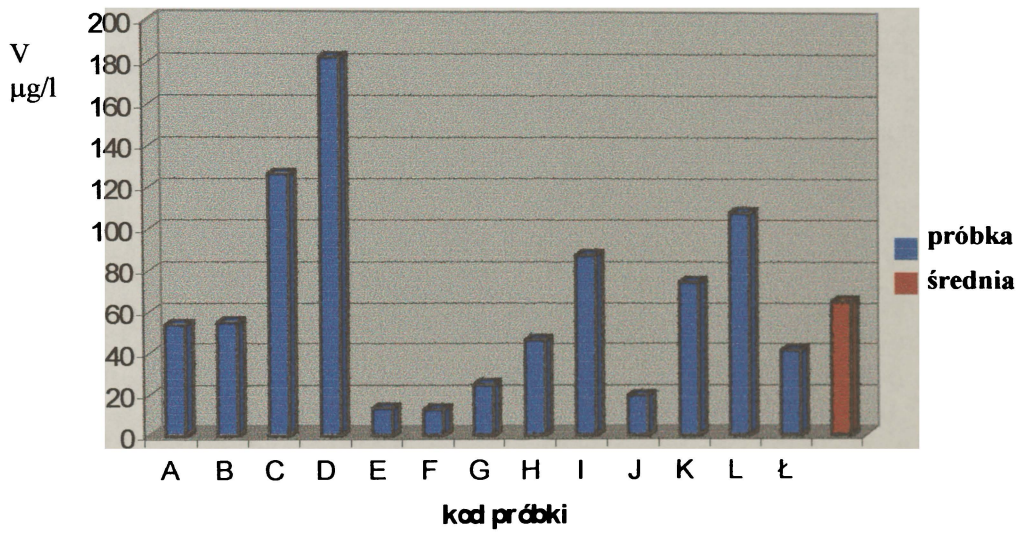
Długość fali 318,5 nm, natężenie prądu lampy 7 mA, szczelina 0,5 nm, gaz azot o czystości 99,99%

Zastosowany w tej pracy proces mineralizacji w pełni spełniał założenia. Uzyskano zadawalającą powtarzalność wyników (%RSD 1-8,3 dla poszczególnych próbek) i wyznaczono limit detekcji 0,33 µg/l dla n=10. Czas samego oznaczenia w aparacie AAS uległ 3 krotnemu wydłużeniu w stosunku do oznaczania gotowych mineralizatów, jednak

łączny czas poświęcony od przygotowania próbki do momentu oznaczenia uległ 2-3 krotnemu skróceniu, ponieważ wyeliminowano pracochłonny i czasochłonny etap wstępnej mineralizacji oleju.

Wyniki analizy zawartości wanadu w oliwie z oliwek

Na rys 65 przedstawiono wyniki oznaczeń stężenia wanadu w poszczególnych próbkach oliwy z oliwek, pochodzących od różnych producentów.



Rys. 65. Stężenie wanadu w różnych rodzajach oliwy z oliwek (poszczególne rodzaje olejów zakodowano symbolami A-Ł zależnie od producenta)

Zawartość wanadu w badanych rodzajach oliwy z oliwek była bardzo zróżnicowana i wahała się w przedziale od kilkunastu do 180 µg/l. Tak szeroki zakres stężeń wanadu może sugerować, że zawartość wanadu w olejach zależy nie tylko od odmiany oliwek i terenu z którego one pochodzą ale również od procesów technologicznych, które mogą wzbogacać końcowy produkt. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga dalszych badań.

4.3.3 Wanad w różnych napojach dostępnych na rynku polskim

W badaniach diet Polaków określa się udział poszczególnych składników w dziennej racji pokarmowej. Bada się między innymi poziomy wielu niezbędnych oraz toksycznych pierwiastków. Przeważnie pomija się w nich wanad jako pierwiastek ultraśladowy, trudny do analizy. W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano tego typu polskich prac.

Praca niniejsza jest próbą wstępnej oceny w jakim stopniu napoje dostępne na rynku krakowskim są zasobne w wanad.

Wyniki tych badań były przedstawiane na konferencji naukowej w 1998 (Krośniak i współ.). Poniżej zamieszczono fragmenty tej pracy.

Materiał:

Materiałem do badań były wybrane losowo próbki różnych napojów dostępnych w handlu w Krakowie. Należały do nich soki i napoje owocowe, piwa, wina oraz wody mineralne.

Metodyka

Do oznaczeń wanadu zastosowano metodę GF AAS. Wykorzystano do tego celu aparat firmy Perkin Elmer typ 5100 ZL. Zawartość wanadu w próbkach napojów wyliczano w oparciu o krzywą kalibracyjną wykonaną na wzorcach: 0, 25, 50, 100 μg/l firmy Merck.

Jako modyfikatora używano 5% roztwór HNO_3. Próbki były bezpośrednio nastrzykiwane do wnętrza kuwety, bez wstępnego przygotowania.

W celu optymalizacji metody analizy opracowano specjalny program (temperatura - czas) pracy aparatu (Tab. 31).

Tab. 31. Parametry (temperatura, czas) zastosowane podczas analizy wanadu metodą AAS w próbkach napojów.

Etap	Temp. [°C]	Czas narastania temperatury	Czas utrzymywania temperatury	Przepływ gazu [ml/min]	Rodzaj gazu
1	120	30	10	250	Argon
2	450	30	10	250	Powietrze
3	450	1	1	250	Argon
4	800	10	25	250	Argon
5	1200	10	20	250	Argon
6	1450	10	20	250	Argon
7	2550	0	5	0	Pomiar
8	2400	1	1	250	Argon
9	95	10	1	250	Argon

Temperatura nastrzykiwania 95 °C

Wyniki i ich omówienie

Wyniki zawartości wanadu w badanych napojach zestawiono w poniższych tabelach 32-34. Napoje uszeregowano według wzrastających stężeń wanadu, zaś soki owocowo – warzywne dodatkowo pogrupowano jeszcze w zależności od rodzaju producenta.

Tab. 32. Zawartość wanadu w wodach mineralnych

Nazwa	Stężenie wanadu µg/l	%RSD
Muszynianka	0,5	6,3
Zuber	1,6	2,3
Jan	2,2	3,5
Krakowianka	3,0	2,8
Grań Hajnos	4,0	1,6

(%RSD – odchylenie standardowe równoległych prób wyrażone w %)

Tab. 33. Zawartość wanadu w sokach i napojach owocowo-warzywnych

Nazwa	Producent	Stężenie wanadu µg/l	%RSD
Sok pomarańczowo-brzoskwiniowy (b)	Tymbark	4,2	4,2
Sok pomarańczowo-brzoskwiniowy (k)	Tymbark	5,1	2,5
Sok grapefruitowy (k)	Tymbark	10,5	1,9
Napój jabłkowo-miętowy (b)	Tymbark	17,3	3,1
Napój jabłkowo-miętowy (k)	Tymbark	34,3	2,8
Napój jabłkowo-ananasowy (k)	Tymbark	34,4	1,1
Sok czarna porzeczka (b)	Tymbark	41,6	0,8
Napój czarna porzeczka (k)	Tymbark	46,3	4,1
Sok czarna porzeczka (k)	Tymbark	86,3	1,6
Napój jabłkowo-wiśniowy (k)	Tymbark	57,3	3,2
Sok pomarańczowy (b)	Dodoni	2,6	4,7
Nektar marchwiowo-pomarańczowy (b)	Dodoni	3,8	5,0
Sok grapefruitowy (b)	Dodon	7,4	3,3
Napój jabłokowy (b)	Dodon	13,9	4,7
Sok czarna porzeczka (b)	Dodon	17,9	3,6
Sok grapefruitowy (k)	Donald Duck	2,9	4,9
Sok pomarańczowy (k)	Donald Duck	4,9	2,8
sok. multiwitaminowy (k)	Donald Duck	11,3	1,5
Sok jabłkowy (k)	Donald Duck	27,0	0,9
Sok winogronowy (k)	Donald Duck	66,2	0,3
Sok z aroni (k)	Clippo	1,3	5,3
Sok pomarańczowy (k)	Clippo	6,2	4,0
Sok jabłkowy (k)	Clippo	14,3	2,9
Sok grapefruitowy (k)	Hortex	2,3	3,8
Napój wiśniowy (k)	Hortex	31,7	2,2
Sok czarna porzeczka (k)	Hortex	44,6	1,4
Napój egzotyczny (k)	Fortuna	3,4	4,1
Napój pomarańczowy (k)	Fortuna	3,8	3,7
Napój czarna porzeczka (k)	Fortuna	15,2	2,6
Frugo zielone (b)	Alima-Gerber	12,7	5,0
Frugo pomarańczowe (b)	Alima-Gerber	13,0	3,0
Frugo czerwone (b)	Alima-Gerber	17,1	2,3
Frugo żółte (b)	Alima-Gerber	33,3	1,7
Napój bananowo-truskawkowy (k)	Eden	0,7	6,7
Napój pomarańczowo-marchewkowy (k)		1,6	4,9
Sok jabłkowo-marchwiowy (b)	Agata	4,3	3,8
Napój pomarańczowy (k)	Natura	5,1	4,2
Sok egzotyczny (b)	Dr Witt	8,2	3,9
Napój jabłkow-marchewkowy (k)	Sokpol	10,1	2,5
Sok z aroni (b)	Owintar	10,9	4,0
Sok marchwiowo-jabłkowy (b)	Bobofrut	22,0	3,1

Objaśnienia: (b) – butelka, (k) - karton

Tab.34. Zawartość wanadu w piwach i winach

Nazwa	Stężenie wanadu µg/l	%RSD
Piwo puszkoweLight Okocim	18,4	4,3
Piwo puszkowe Zagłoba Okocim	18,7	2,6
Piwo bezalkoholowe butelkowe Okocim	19,3	0,9
Piwo butelkowe Browar Okocim	20,4	3,7
Piwo butelkowe Strong Okocim	21,5	2,2
Piwo butelkowe Karmi Okocim	22,9	0,8
Piwo butelkowe Porter Okocim	30,9	4,1
Piwo puszkowe Heineken	26,9	2,8
Piwo butelkowe Keper	30,2	3,4
Piwo butelkowe Kaltenberg	39,6	1,1
Piwo puszkowe Żywiec	64,1	2,3
Piwo puszkowe Horses	70,7	5,0
Piwo puszkowe Beck's	88,0	2,2
Piwo puszkowe Kronenbourg	139,1	0,6
Muscat Sofia	11,1	3,0
Wino il Passato	21,4	1,8
Vinprom	35,1	2,1
Wino Cambras białe	198,4	2,0

Z wyników zestawionych w powyższych tabelach widać, że wanad jest pierwiastkiem, którego stężenie w badanych napojach było bardzo zróżnicowane.

W wodach mineralnych stężenie wanadu było niskie i mieściło się w zakresie 0,5 – 4,0 µg/l. W napojach i sokach owocowo - warzywnych poziom wanadu był wyższy (zakres stężeń bardzo szeroki: 0,7 – 86,3 µg/l). Jeszcze wyższe zawartości wanadu stwierdzono w próbkach piwa (18,4 – 139,1 µg/l) aż do 198,4 µg/l w winie Cambras białym.

W przypadku soków owocowo - warzywnych zawartość wanadu w badanych napojach zależała przede wszystkim od rodzaju surowca użytego do produkcji a mniej od producenta.

Soki i napoje, w których skład wchodziły owoce południowe np. banany, pomarańcze i grapefruity a także aronia i marchew należy zaliczyć do ubogich źródeł wanadu. Średnia zawartość wanadu w nich wynosiła jedynie 4,51 µg/l (0,7 - 10,5 µg/l). Bogatszymi w wanad były soki i napoje w skład których wchodziły jabłka. Średnia zawartość wanadu w nich wynosiła 23,6 µg/l (3,8 - 57,3 µg/l). Znacznie bogatszymi w

wanad były napoje z czarnej porzeczki, wiśni i winogron. Zawartość w nich wanadu wynosiła odpowiednio 41,98 µg/l (15,2 - 86,3 µg/l); 44,5 µg/l (31,7 - 57,3 µg/l); 66,2 µg/l.

4.3.4 Zawartość wanadu w próbkach piwa oraz w poszczególnych etapach jego produkcji

Z badań własnych i przeprowadzonych przez innych autorów wynika, że wanad znajduje się w stosunkowo dużych ilościach w piwie [Anke i współ. 1998 b]. W pracy tej postanowiono sprawdzić czy wanad w piwie pochodzi z surowca czy też napój ten jest wzbogacony w trakcie produkcji.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w 1998 r. (Krośniak i współ.). Poniżej cytuję jedynie wybrane fragmenty tej pracy.

Materiał

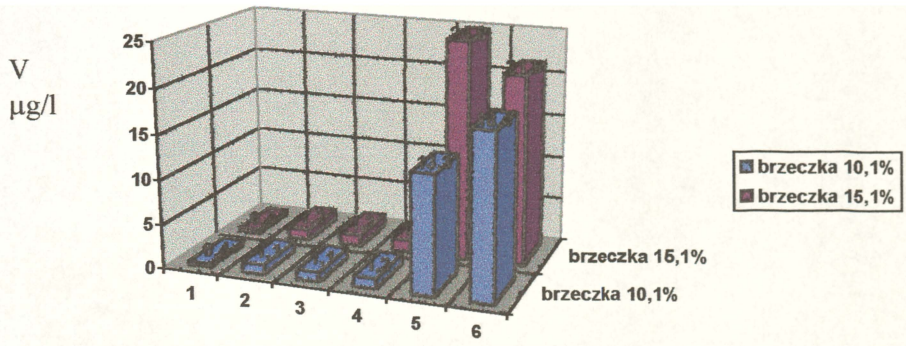
Przebadano próbki piwa pochodzącego z Browaru Okocim S.A. w Brzesku Okocimiu. Do pomiarów wybrano dwa rodzaje piwa Light o ekstrakcie 10,1% i 15,1% wagowo brzeczki podstawowej. Pobrano je z 6 głównych etapów produkcji: woda technologiczna, brzeczka, proces fermentacji, proces dojrzewania, filtracja i produkt końcowy.

Metodyka

Do analizy zawartości wanadu w badanych piwach zastosowano metodę opisaną w części dotyczącej napojów.

Wyniki i ich omówienie

Uzyskane wyniki zestawiono poniżej na rys. 66.



Rys. 66. Zawartość wanadu w piwie, w poszczególnych etapach produkcji. Piwo Light o ekstrakcie 10,1 i 15,1% brzeczki podstawowej. (objaśnienia: 1-woda technologiczna, 2-brzeczka, 3-w trakcie fermentacji, 4-po fermentacji, 5-po filtracji, 6-produkt końcowy)

Wzbogacenie piwa w wanad następowało podczas procesu filtracji, stosowanego do uzyskania klarownego produktu końcowego. Filtrację tę wykonywano w tym browarze przy użyciu ziemi okrzemkowej. W niniejszej pracy nie analizowano zawartości wanadu w ziemi okrzemkowej ponieważ przekraczało to ramy zaplanowanych badań. Jednakże spostrzeżenie to jest bardzo interesujące, nigdzie dotąd nie sygnalizowane i wymaga dalszego opracowania.

Wnioski końcowe wypływające z rozdziału 4.3.

W dostępnym piśmiennictwie spotkano niewiele prac zajmujących się analizą zawartości wanadu w pożywieniu człowieka. Jedynie Anke i współ. przebadali dokładnie niemieckie produkty spożywcze. Stwierdzili oni, iż najbogatszym źródłem wanadu w Niemczech są napoje. Zawartość tego pierwiastka zależała, według tych autorów, od regionu, z którego pochodziły badane produkty.

Celem niniejszej pracy była początkowo optymalizacja metody analizy wanadu w produktach spożywczych a następnie ocena zawartości wanadu w wybranych polskich i francuskich napojach. W końcu pokuszono się o próbę prześledzenia skąd pierwiastek ten przedostaje się do tych produktów.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski.

1. Opracowanie optymalnej analizy wanadu w winach, piwach, sokach i olejach jadalnych w oparciu o metodę AAS pozwoliło na skrócenie czasu analizy. Zastąpiono wstępną mineralizację badanych produktów mineralizacją bezpośrednio w aparacie. Dla poszczególnych rodzajów badanych próbek opracowano specjalne programy pracy spektrometru AAS, optymalizując temperaturę i czas kolejnych etapów analizy.

2. Badane napoje zawierały bardzo zróżnicowane ilości wanadu. Najmniej tego pierwiastka stwierdzono w wodach mineralnych, więcej w sokach owocowo – warzywnych, jeszcze więcej w piwach i najwięcej w niektórych gatunkach win.

3. Zawartość wanadu w polskich sokach i napojach owocowo - warzywnych zależała głównie od rodzaju surowca. Najbogatsze w wanad okazały się te, które pochodziły z czarnej porzeczki, winogron i wiśni. Do średnio bogatych można zaliczyć soki i napoje z jabłek, zaś do ubogich soki i napoje z pomarańcz, grapefruitów, bananów, aroni i marchwi.

4. Aby potwierdzić hipotezę Anke'ego i współ., że zawartość wanadu w produktach spożywczych zależy od regionu, z którego one pochodzą, przebadano dodatkowo różne rodzaje olejów z oliwek dostępnych w południowej Francji. Okazało się, że zawartość w nich wanadu była bardzo zróżnicowana. Stąd wysunięto nową hipotezę, że produkty spożywcze mogą być wzbogacane w wanad w trakcie procesów technologicznych. Na przykładzie piwa z browaru Okocim potwierdzono tę hipotezę, wskazując na znaczny wzrost stężenia wanadu w badanych próbkach, podczas filtracji piwa poprzez ziemię okrzemkową. Wymaga to dalszych badań. Jest to jednak nowe spojrzenie na zawartość wanadu w produktach spożywczych.

Podsumowując wyżej przedstawione wyniki badań własnych należy sugerować, aby przy próbach oszacowania pobrania wanadu z dzienną racją pokarmową uwzględniać znaczne zróżnicowanie zawartości wanadu w poszczególnych produktach spożywczych. Zróżnicowanie to zależy od rodzaju produktu, regionu pochodzenia oraz procesu produkcji przemysłowej. W dalszych badaniach należałoby oszacować, który z tych elementów ma decydujący wpływ na ostateczną zawartość tego ultraśladowego pierwiastka w produkcie końcowym.

5. Podsumowanie i wnioski

Obecnie wiąże się z wanadem nadzieje na uzyskanie leków wspomagających leczenie cukrzycy. Udokumentowano już, iż niektóre związki wanadu posiadają właściwości insulinonaśladowcze. Jednakże wykazują one również niekorzystne efekty uboczne. Zależy to od wartościowości wanadu oraz budowy samych związków. Najpełniej przebadanymi połączeniami wanadu o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym są związki: nieorganiczny $VOSO_4$ oraz organiczny bis(maltolano)-oksowanad(IV). Jednakże ich właściwości biologiczne nie są w pełni zadawalające.

W niniejszej pracy podjęto poszukiwania innych pochodnych wanadu o korzystniejszych właściwościach farmakologicznych. Skoncentrowano się na organicznych, kompleksowych związkach wanadu (IV) i (V) zawierających ligand polipirydynowy i cyklopentenowy.

Przebadano na szczurach toksyczność ostrą oraz wybrane parametry biochemiczne czterech, nowych połączeń wanadu (F, B, H i V_3). Następnie wybrano z nich dwa (B i V_3), najaktywniejsze w działaniu hipoglikemizującym. Poddano je szerszym badaniom biochemicznym, morfometrycznym i farmakokinetycznym.

Ponadto przeanalizowano zawartość wanadu w wybranych produktach spożywczych celem określenia ewentualnych, naturalnych źródeł tego niezbędnego do życia pierwiastka.

Z badań tych można wyciągnąć następujące wnioski:

1) Wszystkie badane kompleksowe związki wanadu (F, B, H i V_3) wykazywały niższą toksyczność ostrą niż związek odniesienia M.
2) Dwa z nich (B i V_3) charakteryzowały się działaniem hipoglikemizującym z tym, że najaktywniejszy okazał się związek V_3 będący 2,2'-dipirydynooxodiperoksowanadan(V) sodu pentahydratem.
3) Związek V_3 wpływał również korzystnie na obniżenie aktywności fosfatazy alkalicznej i AlAT u szczurów cukrzycowych.
4) Związki B i V_3 wykazały działanie wazodylatacyjne w stosunku do tętniczek krezki. Efekt ten był silniejszy u zwierząt zdrowych niż u cukrzycowych.
5) U szczurów diabetycznych stwierdzono poszerzenie kłębuszków nerkowych, spowodowane cukrzycą. Podanie związku B powodowało

dalszy wzrost wymiarów tych kłębuszków. Związek V_3 działał przeciwnie, nieznacznie zmniejszając je.

6) Oba związki (B i V_3) zarówno u szczurów zdrowych jak i diabetycznych powodowały wzrost proliferacji jąder przydanki naczyniowej oraz kłębuszków nerkowych.

7) Badania farmakokinetyczne wykazały, że przebieg zmian stężenia wanadu we krwi szczurów zarówno zdrowych jak i diabetycznych, którym podano badane związki (B lub V_3) można najlepiej opisać modelem trójkompartmentowym, z wchłanianiem zerowego rzędu.

8) Biodostępność wanadu z organicznych związków kompleksowych (B i V_3) była wyższa, niż z nieorganicznego połączenia ($VOSO_4$). Dodatkowo cukrzyca zwiększała biodostępność tych dwóch kompleksów.

9) Wykazano, że wanad z $VOSO_4$ był lepiej wchłaniany z roztworów alkoholowych niż wodnych zaś najlepiej z wina odtworzonego.

10) Zawartość wanadu dostępna na rynku krakowskim była bardzo zróżnicowana. Najmniej tego pierwiastka stwierdzono w wodach mineralnych, więcej w sokach owocowo-warzywnych jeszcze więcej w piwach, zaś najwięcej w niektórych gatunkach win.

11) Zawartość wanadu w sokach i napojach owocowo-warzywnych zależała głównie od rodzaju surowca. Najbogatsze w wanad okazały się te, które pochodziły z czarnej porzeczki, winogron i wiśni. Do średnio bogatych można było zaliczyć soki i napoje z jabłek, zaś do ubogich soki i napoje z pomarańcz, grapefruitów, bananów, aroni i marchwi.

12) Na przykładzie piwa z browaru Okocim wysunięto hipotezę, że produkty spożywcze mogą być wzbogacane w wanad w trakcie procesów technologicznych.

13) Do przeprowadzenia badań zawartych w niniejszej pracy konieczne było opracowanie odpowiednich metod analizy stężenia wanadu we krwi szczurów oraz w produktach spożywczych. W tym celu zoptymalizowano procedury analityczne oparte o metodę absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

6. Streszczenie

Celem badań było przeanalizowanie wpływu nowych, syntetycznych, kompleksowych związków wanadu (IV i V) zawierających ligand polipirydynowy i cyklopentenowy na przebieg cukrzycy u szczurów.

Do wstępnych badań wybrano cztery nowe kompleksy wanadu:

Skrót zastosowany w pracy	Nazewnictwo IUPAC
M	$[VO(mal)_2]$
F	$[VO(SO_4)(phen)_2] \bullet 3H_2O$
B	$[VO(bpy)_2]SO_4 \bullet 2H_2O$
H	$[VOCl_2(Hmcp)_2H_2O]$
V_3	$Na[VO(O_2)_2(bpy)] \bullet 5H_2O$

Związek M traktowano w tej pracy jako substancję odniesienia.

Wszystkie nowe związki (F, B, H i V_3) wykazywały niższą toksycznością ostrą niż związek M.

We wstępnych badaniach, dwa z nich (B i V_3) charakteryzowały się działaniem hipoglikemizującym. W dalszych eksperymentach ze szczurami zdrowymi i diabetycznymi (STZ) oceniono wpływ tych dwóch związków na wskaźniki biochemiczne (glukoza, tolerancja glukozy, insulina, cholesterol, triglicerydy, mocznik, aktywność fosfatazy zasadowej, AlAT i AspAT) oraz na parametry morfometryczne tętniczek krezki i kłębuszków nerkowych. Oznaczono również parametry farmakokinetyczne wanadu u szczurów po podaniu związków B i V_3.

Związek V_3 wykazywał najsilniejsze właściwości hipoglikemizujące a ponadto korzystnie obniżał aktywność fosfatazy alkalicznej i AlAT u szczurów cukrzycowych.

Związki B i V_3 wykazały również działanie wazodylatacyjne w stosunku do tętniczek krezki. Efekt ten był silniejszy u zwierząt zdrowych niż u cukrzycowych. U szczurów diabetycznych stwierdzono poszerzenie kłębuszków nerkowych, spowodowane cukrzycą. Podanie związku B powodowało dalszy wzrost wymiarów tych kłębuszków. Związek V_3 działał przeciwnie, nieznacznie zmniejszając je. Oba związki (B i V_3) zarówno u szczurów zdrowych jak i diabetycznych powodowały wzrost proliferacji jąder przydanki naczyniowej oraz kłębuszków nerkowych.

Badania farmakokinetyczne wykazały, że przebieg zmian stężenia wanadu we krwi szczurów (zarówno zdrowych jak i diabetycznych), którym podano badane związki (B lub V_3) można najlepiej opisać modelem trójkompartmentowym, z wchłanianiem zerowego rzędu. Biodostępność wanadu z organicznych związków kompleksowych (B i V_3) była wyższa, niż z nieorganicznego połączenia ($VOSO_4$). Dodatkowo cukrzyca zwiększała biodostępność tych dwóch kompleksów. Wykazano również, że wanad z $VOSO_4$ był lepiej wchłaniany z roztworów alkoholowych niż wodnych zaś najlepiej z wina odtworzonego.

Ponadto przebadano zawartość wanadu w wybranych produktach spożywczych celem określenia ewentualnych źródeł tego mikropierwiastka w diecie ludzi. Okazało się, że zawartość wanadu była bardzo zróżnicowana i wahała się od mniej niż 1 μg/l do ponad 400 μg/l. Zakres stężeń wanadu w wodach mineralnych wynosił od 0,5 do 4 μg/l, w sokach i napojach owocowo-warzywnych od 0,7 do 86,3 μg/l, w oliwie z oliwek od 12,5 do 180 μg/l, w piwach od 18,4 do 139,1 μg/l oraz w winach od 4 do 447 μg/l.

Aby wykonać oznaczenia zawartości wanadu we krwi szczurów oraz w produktach spożywczych zoptymalizowano procedury analityczne oparte o metodę absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

Piśmiennictwo

1. Adamiec R., (red.) w; Cukrzyca, AM, Wrocław, wydanie II, 1998
2. Adams R.J.; Fed. Proc., 1980, 39, 979-88
3. Aisen P., Listowsky I.; Annu. Rew. Biochem., 1980, 49, 357-93
4. al-Bayati M.A., Giri S.N., Raabe O.G., Rosenblatt L.S., Shifrine M.; J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., 1989, 9, 435-55,
5. al-Bayati M.A., Raabe O.G., Giri S.N., Knaan J.B.; J. Am. Coll. Toxicol., 1991, 10, 233-41
6. Almeida M.G., Humanes M., Melo R., Silva J.A., da Silva J.J., Wever R.; Phytochemistry., 2000, 54, 5-11
7. Almost A.F., McCarty D.J., Zimmet P.; Diabet. Med., 1997, 14 Suppl 5, 81-5
8. Anderson R. A.; Nutritioin, 1999, 15, 720-2
9. Anderson R.A.; Diabetes Metab., 2000, 26, 22-7
10. Anderson R.A., Roussel A.M., Zouari N., Mahjoub S., Matheau J.M., Kerkeni A.; J .Am. Coll. Nutr., 2001, 20, 212-8
11. Anke M., Groppel B., Gruhn K., Kośla T., Szilágyi M. w; 5. Spurelement-Symposium New Trace Element, Jena, 1986, 1266
12. Anke M., Groppel B., Gruhn K., Langer M., Arnhold W. w; 6th International Trace Element Symposium, (Anke M. Baumann W., Bräunlich H., Brückner C., Groppel B., Grün M. red.) Karl-Marx-Universität, Leipzig, 1989, 17
13. Anke M. Groppel B., Arnhold W., Langer M., Krause U. w; Trace Element in Clinical Medicine (Tomita H. red.) Springer-Verlag, Tokyo, 1990, 361
14. Anke M., Groppel B., Krause U. w; Trace Element in Man and Animals Tom 7 (Momčilović B. red.) IMI, Zagreb, 1991, 11-9
15. Anke M., Illing-Günther H., Röhring B., Glei M., Schäfer U., Lösch E., Müller M., Neagoe A. w; Mengen und Spuren-Elemente, 18 Arbeitstagung (Anke M. red.), Friedrich-Schille-Universitat, Jena, 1998a, 996-1006
16. Anke M., Illing-Günther H., Dorn W., Müller M., Glei M., Arnhold W., Möller E. w; Mengen und Spuren-Elemente, 18 Arbeitstagung (Anke M. red.), Friedrich-Schille-Universitat, Jena, 1998b, 1018-27
17. Anke M., Glei M., Müller M., Schäfer U., Holzinger S., Illing-Günther H., Mocanu H., Hartmann E. w; Mengen und Spuren-Elemente, 18 Arbeitstagung (Anke M. red.), Friedrich-Schille-Universitat, Jena, 1998c, 985-95

18. Anke M., Illing-Günther H., Gürtler H., Holzinger S., Jaritz M., Anke S., Schäfer U. w; Trace Element in Man and Animals (Roussel i współ. red.), Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 2000, 221-5
19. Archer R.D., Hardiman C.J., Gryboś R., Chien J.C.W.; "Transition and Innertransition Metal Chelate Polymers for High Energy Resist Lithography", Patent USA nr 4 693 957 z dnia 15 września 1987 r.
20. Arnhold W., Anke M., Müller M., Glei M. w: Trace Elements in Man and Animals-TEMA 8 (Anke M. red.), 1993, 739-41
21. Arshi K., Bendayan M., Ghitescu L.D.; Lab. Invest., 2000, 80, 1171-84
22. Asri-Nawi M., Riechel T. L.; Inorg. Chem. Acta., 1987, 136, 33-7
23. Azay J., Brès J., Krośniak M., Teissèdre P.L., Cabanis J.C., Serrano J.J., Cros G.; Fundam. Clin. Phar., 2001, 15, 313-24
24. Badmaev V., Prakash S., Majeed M.; J. Altern. Complement Med. 1999, 5, 273-91
25. Barałkiewicz D., Krośniak M., Morawska A.; praca w przygotowaniu
26. Barbera A., Rodriguez-Gil J.E., Guinovart J.J.; J. Biol. Chem., 1994, 269, 2047-53
27. Barbera A, Gomis R.R., Prats N., Rodriguez-Gil J.E., Domingo M., Gomis R., Guinovart J.J.; Diabetologia, 2001, 44, 507-13
28. Barceloux D.G.; Clin. Toxicol., 1999, 37, 265-78
29. Battell M.L., Delgatty H.L.M., McNeill J.H.; Mol. Cell. Biochem., 1998, 179, 27-34
30. Bello-Reuss E.N., Grady T.P., Mazumdar D.C.; Ann. Intern. Med., 1979, 91, 743
31. Bishayee A., Chatterjee M.; Biol.Trace Elem. Res., 1995, 48, 275-85
32. Blalock T.L., Hill C.H.; Biol. Trace Elem. Res., 1987, 14, 225-35
33. Boden G., Chen X., Ruiz J., van Rossum D.V., Turco S.; Metabolism, 1996, 45, 1130-5
34. Bodgen J.D., Higashino H., Lavenhar M.A., Bauman J.W., Kemp F.W., Aviv A.; J. Nutr. 1982, 112, 2279-85
35. Bolewski A., Ney R., Smakowski T. (red.); Bilans Gospodarki surowcami mineralnymi w Polsce na tle gospodarki światowej, 1996, 791-5

36. Bonadies J.A., Pecorraro V.L., Butler W., Carrano C.; J. Inorg. Chem., 1987, 26, 1218-21
37. Boulet D., Laporte J.P., Aigrin P., Lalanne J.B.; ONIVINS Infos., 1995, 26, 72-112
38. Bracken W.M., Sharma R.P., Elsner Y.Y.; Cell. Biol. Toxicol., 1985, 1, 259-68
39. Bressolle F., Ray P., Jacquet J.M.; Cancer Chemother. Pharmacol., 1991, 29, 53-60
40. Brichard S.M., Lederer J., Henquin J.C.; Diabete. Metab., 1991, 17, 435-40
41. Brichard S.M., Assimacopoulos-Jeanet F., Jeanrenaud B.; Endocrinology, 1992, 131, 311-7
42. Brichard S.M., Desbuquois B., Girard J.; Mol. Cell. Endocrinol., 1993, 91, 91-7
43. Brooks G., Nutting J.T., Crofton J.T., Share L.; Diabetes, 1989, 38, 109-16
44. Buliński R., Kot A., Błoniarz J, Koktysz N.; Bromat. Chem. Toksykol, 1986, 19, 21-6
45. Butler A., Carrano C.J.; Coor. Chem. Rev., 1991, 109, 61-105
46. Byrne A.R., Kucera J.; Trace Element in Man and Animals, 7, (Momcilović B. red.), Zagrzeb, 1991, 18-25
47. Byrne A.R., Kosta L.; Sci. Total Environ., 1993, 10, 17-30
48. Cadene A., Praca dotorska, Universytet Montpellier I, 1996
49. Cam M.C., Pederson R.A., Brownsey R.W., McNeill J.H.; Diabetologia, 1993, 36, 218-24
50. Cam M.C., Brownsey R.W., McNeill J.H.; Can. J. Physiol. Pharmacol., 2000, 78, 829-47
51. Cameron L.M., Hales B.J.; J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 279-80
52. Canalis E.; Endocrinology, 1985, 116, 855-62
53. Cantley L.C. Jr, Josephson L., Warner R., Yanagisawa M., Lechene C., Guidotti G.; J. Biol. Chem., 1997, 252, 7421-3
54. Carlton B.D., Beneke M.B., Fisher G.L.; Environ. Res., 1982, 29, 256-62
55. Chacraborty D., Battacharyya A., Majumdar K., Chaterjee G.C.; Int. J. Vit. Nutr. Res. 1977, 47, 81-7
56. Chasteen N.D.; Struct. Bonding, 1983, 53, 105-38

57. Chasteen N.D., Lord E.M., Tomson H.J. w; Frontiers in Bioinorganic Chemistry (Xavier A.V., red.) VCH, Weinheim, 1986, 133-49
58. Chen Y.X., Yang D.C, Brown A.B., Jeng Y., Tatoyan A., Chan T.M.; Arch. Biochem. Biophys., 1990, 283, 184-92
59. Chmielewski J.; Młody technik, 2000, 1, 26-8
60. Clark A.S., Fagon J.M., Mitch W.E.; Biochem. J., 1985, 232, 273-6
61. Cohen N., Halberstam M., Shlimovich P., Chang C.J., Shamoon H., Rossetti L.; J. Clin. Invest., 1995, 95, 2501-9
62. Conclin A.W., Skinner C.S., Felten T.L., Sanders C.L.; Toxicol. Lett., 1982, 11, 199-203
63. Conri C., Simonoff B., Moreau F.; Biol. Psychiatry, 1986, 309, 94-104
64. Cortizo A.M., Etcheverry S.B.; Mol. Cell. Biochem., 1995, 145, 97-102
65. Cortizo A.M., Caporossi M., Lettieri G., Etcheverryy S.B.; Eur. J. Pharmacol., 2000, 400, 279-85
66. Crans D.C., Bunch R.L., Theisen L.A.; J. Am. Chem. Soc., 1989, 111, 7597-607
67. Crans D.C., Mahroof-Tahir M., Keramidas A.D.; Mol. Cell. Biochem., 1995, 153, 17-24
68. Crans D.C.; J. Inorg. Biochem., 2000, 80,123-31
69. Cupissol D., Brès J., Gestin-Boyer C.; Bull. Cancer 1996, 83, 664-76
70. Czech A., Taton J., Bernas M.; Kompendium diabetologii, Via Medica, Gdańsk, 2000
71. D'Argenio D.Z.; J. Pharmacokinet. Biopharm., 1981, 9, 739-56
72. D'Argenio D.Z., Khakmahd K.; J. Pharmacokinet. Biopharm., 1983, 11, 547-59
73. Dafnis E., Spohn M., Lonis B., Kurtzman N.A., Sabatini S.; Am. J. Physiol., 1992, 262, 449-53
74. Dai S., Thompson K.H., Vera E., McNeill J.H.; Pharmacol. Toxicol., 1994a. 75, 265-73.
75. Dai S., Thompson K.H., McNeill J.H.; Pharmacol. Toxicol., 1994b, 74, 101-9
76. Dai S., Vera E., McNeill J.H.; Pharmacol. Toxicol., 1995, 76, 263-8
77. Darret G., Couzy F., Antoine J.M., Magliola C., Mareschi J.P.; Ann. Nutr. Metab., 1986, 30, 335-44

78. Davidescu D.; Annals Technol. Agric. 1978, 27, 53-4
79. de Boer E., Wever R.; J. Biol. Chem., 1988, 263, 12326-32
80. de la Torre A., Granero S., Mayayo E., Corbella J., Domingo J.L.; Toxicol. Lett., 1999, 105, 75-82
81. Dobkowska Z., Pazdro K.M.; Szkolny poradnik chemiczny, Wydawnictwa szkolne i pedagogiczne, 1986
82. Domingo J.L., Gomez M., Llobet J.M., Corbella J., Keen C.L.; Toxicology, 1991, 66, 279-87
83. Dufour J.P., Bontey M., Goffean A.; J. Biol. Chem., 1980, 255, 5735-41
84. Edel J., Sabbioni E.;J. Trace Elem. Electrolycytes Health Dis., 1988, 2, 23-30
85. Edel J., Sabbioni E.; Biol. Trace Elem. Res., 1989, 22, 265-75
86. El-Yazigi A., Kanaan I., Raines D.A.; Trace Elem. Med., 1992, 9, 183-9
87. Ferber S., Meyerovitch J., Kriauciunas K.M., Kahn C.R.; Metabolism, 1994, 43, 1346-54
88. Frank P., Kustin K., Robinson W.E., Linebought L.; Inorg Chem., 1995, 34, 5942-9
89. French R.J., Jones P.J.H.; Life Sci., 1993, 52, 339-46
90. Furst P., Solioz M.; J. Biol. Chem., 1989, 260, 50-9
91. Ganguli S., Reuland S.P., Franklin L.A., Deakins D.D., Johnston W.J., Pasha A.; Life Sci., 1994a, 55, 1267-76
92. Ganguli S., Reuland S.P., Franklin L.A., Tucker M.; Metabolism, 1994b, 43, 1384-8
93. Geraldes C., Castro M.; J.Inorg. Biochem., 1989, 37, 213-32
94. Gerrard D.F., Fawcet J.P., Farquar S.J.; New Zeland Med. J., 1993, 958, 259
95. Goldfine A.B., Simson D.C., Folli F., Patti M.E., Kahn C.R.; Mol. Cell. Biochem., 1995, 153, 217-31
96. Gomez M., Sanchez D., Domingo J.L., Corbella J.; J. Toxicol. Environ. Health, 1992, 37, 47-56
97. Gruszczyk H., Pawlikowski S. W; Surowce mineralne świata: Wanad-V, Tytan-Ti, Cyrkon-Zr, Hafn-Hf, (Bolewski A. i współ. red), Wyd. Geologiczne, Warszawa, 1982, 87-9
98. Guerrieri N., Scippa S., Maietti M., de Vincentiis V., Cerletti P.; Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol., 2000, 125, 445-50

99. Hackbarth I., Schmitz W., Scholz H., Wetzel E., Erdmann E., Krawietz W., Philipp G.; Biochem. Pharmacol., 1980, 29, 1439-42
100. Hampel C.A.; Rare metals handbook, RPC, 1961, 629-49
101. Hansen T.V., Aaseth J., Skaug V.; Acta Pharmacol. Toxicol., 1985, 59, 562-5
102. Hara I., Sakurai T.; J. Inorg. Biochem., 1998, 72, 23-8
103. Harland B.F., Harden-Williams B.A.; J. Am. Diet Assoc., 1994, 94, 891-4
104. Hasselbach W., Medda P., Migala A., Agostini B.; Naturforsch, 1983, 38c, 1015-22
105. Hei Y.Jr, Farahbakhshian S., Chen X., Battell M.L., McNeill J.H.; Mol. Cell. Biochem., 1998, 178, 367-75
106. Heiserman D.L. w; Ksiega pierwiastkow chemicznych, Prószyński i S-ka, W-a, 1997, 112-5
107. Henquin J.C., Brichard S.M.; La Presse Médicale, 1992, 21, 1100-1
108. Herbert V., Lau K.S., Gottlieb C.W., Bleicher S.J.; J. Clin. Endocrinol. Metab. 1965, 25, 1375-84
109. Hiroyuki Y., Koji T., Hiromu S.; J. Inorg. Biochem., 2000, 78, 185-96
110. - Hopkins L.L.Jr, Mohr H.E.; w Newer Trace Elements in Nutrition (Mertz W., Cornatzer W. red.) Marcel Dekker, New York, 1971, 195
111. Hopkins L.L.Jr, Mohr H.E.; Fed. Proc., 1974, 33, 1773-5
112. Hura T.; Praca magisterska, Wydział Chemii UJ, 1997
113. Interesse F.S., Lamparelli F., Aloggio V.; Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und-Forschung, 1984, 178, 272-8
114. Isupov M.N., Dalby A.R., Brindley A.A., Izumi Y., Tanabe T., Murshudov G.N., Littlechild J.A.; J. Mol. Biol., 2000, 299, 1035-49
115. Kabata-Pendias A., Pendias H, Pierwiastki śladowe w środowisku człowieka, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1979, 190-4
116. Kabata-Pendias A., Pendias H.; Biogeochemia pierwiastków śladowych, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999, 257-62
117. Kadota S., Fantus I.G., Deragon G., Guyda H.J., Hersh B., Posner B.I.; Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 259-67
118. Kiersztan A., Jarzyna R., Bryla J.; Pharmacol. Toxicol., 1998, 82, 167-72
119. Kiersztan A.; Postępy Biochemii, 1998a, 44, 275-82

120. Koch K.M., Kerr B.M., Gooding A.E., Davis I.M.; Br. J. Clin. Pharmacol. 1996, 42, 207-11
121. Kopp S.J., Daar J., Paulson D.J., Romano F.D., Laddage R.; J. Mol. Cell. Cardiol. 1997, 29, 2355-62
122. Kordowiak A.M., Trzos R., Grybos R.; Horm. Metab. Res., 1997, 29, 101-5
123. Krośniak M., Azay J., Cros G., Maurel J.C., Teissèdre P.L. w; Contemporary state, development and applications of spectroscopic methods proceedings of "4th european Furnace Symposium and XVth Slovak Spectroscopic Conference 2000, 153-7
124. Krośniak M., Capik A., Schlegel-Zawadzka M., Zachwieja Z. w; Mengen und Spuren-Elemente, 18 Arbeitstagung (Anke M. red.), Friedrich-Schille-Universitat, Jena 1998, 678-81
125. Krośniak M., Zachwieja Z., Filipek B., Zygmunt M., Gryboś R.; Arch. Pharm. 2001, 334, 388-92
126. Krośniak M., Zachwieja Z.; Brom. Chem. Toksykol., 1997, 30 (supl), 64, abstr. P-47
127. Kusior D.; Praca magisterska, Wydział Chemii UJ, 1996
128. Lau K.H.W., Tanimoto H., Baylink D.J.; Endocrinology, 1988, 123, 2858-67
129. Lepp N.W., Harrison S.C.S., Morrell B.G.; Environ. Geochem. Health., 1987, 9, 61
130. Litchfield T., Wilcoxon F.; J. Pharmacol. Exp. Ther., 1949, 96, 99-113.
131. Llobet J.M., Domingp J.L.; Toxicol. Lett., 1984, 23, 227-31
132. Llobet J.M., Colomina M.T., Sirvent J.J., Domingo J.L., Corbella J.; Toxicology, 1993, 80, 199-206
133. Macara I.G., Kustin K., Cantley L.C. Jr; Biochim. Biophys. Acta, 1980, 629, 95-106
134. Mèchaly I., Krośniak M., Azay J., Cassanas G., Roque C., Cahard D., Serrano J.J., Cros G.; J. Pharmacol. Toxicol., 1999, 41, 59-67
135. Meneses M., Llobet J.M., Granero S., Schuhmacher M., Domingo J.L.; Sci. Total Environ., 1999, 226, 157-64
136. Millet-Crerc J., Michel D., Chaumont J.P.; Ann. Pharm., 1989, 47, 157-61
137. Miralpeix M.; Diabetologia, 1992, 35, 243-8

138. Molero J.C., Martinez C., Andrés A., Satrustegui J., Carrascosa J.M.; FEBS Lett., 1998, 425, 298-304
139. Mongold J.J., Cros G.H., Vian L., Tep A., Ramanadham S., Siou G., Diaz J., McNeill J.H., Serrano J.J.; Pharmacol. Toxicol., 1990, 67, 192-8,
140. Morinville A., Maysinger D., Shaver A.; TiPS, 1998, 19, 452-60
141. Mountjoy K.G., Flier J.S.; Endocrinology, 1990, 26, 2778-87
142. Munoz M.C., Barbera A., Dominguez J., Fernandez-Alvarez J., Gomis R., Guinovart J.J.; Diabetes, 2001, 50, 131-8
143. Naylor G.J., Corrigan F.M., Smith A.H., Connely P., Ward N.J.; Br. J. Psychiatry, 1987, 150, 656-61
144. Nechay B.R., Nanninga L.B., Nechay P.S.E., Post R.L., Grantham J.J., Macara I.G., Kubena L.F., Philips T.D., Nielsen J.J.; Fed. Proc., 1986, 45, 123-32
145. Nette G., Scippa S., Genovese M., de Vincentiis M.; Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol., 1999, 122, 231-7
146. Nette G., Scippa S., de Vincentiis M.; Naturwissenschaften, 2000, 87, 220-4
147. Neumann R., Assael I.J.; J. Am. Chem., 1989, 111, 8410-2
148. Nielsen F.H., Ollerich D.A.; Fed. Proc.,1973, 32, 929-34
149. Nielsen F.H.; Food Technol., 1974, 28, 38-42
150. Nielsen F.H. w: Vanadium, Trace Elements in Human and Animal Nutrition, Vol. 1, 15 edycja (Mertz W. red.), Academic Press, San Diego, 1987
151. Osaki S., McDermott J.A., Johnson D.A, Friend E. w; The biochemistry of Copper (Peisach J., Aisen P., Blumberg W.E., red.), Academic Press, New York, 1966,
152. Paquet M.R., Romanek R.J., Sargeant R.J.; Mol. Cell. Biochem., 1992, 109, 149-55
153. Paternain J.L., Domingo J.L., Gomez M., Ortega A., Corbella J.; J. Appl. Toxicol., 1993, 10, 181-6
154. Patterson B.W., Hansard II S.L., Ammerman C.B., Henry P.R., Zech L.A., Fisher W.R.; Am. J. Physiol., 1986, 251, 325-32
155. Pieńkowski A.; Wiedza i życie, 1998,11, 2
156. Poucheret P., Verma S., Grynpas M.D., McNeill J.H.; Mol. Cell. Biochem., 2000, 208, 167-8
157. Rehder D.; BioMetals, 1992, 35, 8-17

158. Rehder D.; J. Inorg. Biochem., 2000, 80, 133-6
159. Rider M.H., Bartrons R., Hue L.; Eur. J. Biochem., 1990, 190, 53-6
160. Ronzani N., Stephan L., Hasselbach W.; Eur. J. Biochem., 1991, 201, 265-72
161. Roshchin A., Ordzhonikidze E.K., Shalganova I.V.; J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 1980, 24, 377-83
162. Rothenberg P.L., Lane W.S., Karasik A., Backer J.M., White M., Kahn C.R.; J. Biol. Chem., 1991, 266, 8302-11
163. Sanchez D., Ortega A., Domingo J.L., Corbella J.; Biol. Trace Elem. Res., 1991, 30, 219-226
164. Sanchez D.J., Colomina M.T., Domingo J.L.; Physiol. Behav., 1998, 63, 345-50
165. Schechter Y.; Diabetes, 1990, 39, 1-5
166. Setyawati A., Thomson K.H., Yuen V.G., Sun Y., Battell M., Lyster D.M., Vo C., Ruth T.J., Zeisler S., McNeill J.H., Orvig C.; J. Appl. Physiol., 1998, 84, 569-75
167. Shafrir E., Spielman S., Nachlied I., Khamaisi M., Bar-On H., Ziv E.; Diabetes Metab. Res. Rev., 2001, 17, 55-66
168. Shavera A., Ng J.B., Hall D.A., Posner B.I.; Mol. Cell. Biochem., 1995, 153, 5-15
169. Shisheva A., Schechter Y.; Biochemistry, 1992, 31, 8059-63
170. Sigel H., Sigel A (red.); Metal ions in biological systems, Marcel Dekker Inc., 1995
171. Srivastava P., Saxena A.K., Kale R.K., Baquer N.Z.; Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 1993, 80, 283-93
172. Srivastava A.K.; Mol. Cell. Biochem., 2000, 206, 177-82
173. Stearns D.S.; BioFactors, 2000, 11, 149-62
174. St-Lois J., Sicotte B., Breton E., Srivastava A.K.; Mol. Cell. Biochem., 1995, 153, 145-50
175. Strout H.V., Vicario P.P., Biswas C., Saperstein R., Brady E.J., Pilch P.F., Berger J.; Endocrinology, 1990, 126, 2728-32
176. Ścibor A., Zaporowska H.; Ekopartner, Tarnów, 1997, 5, 9-11
177. Tang S., Lu B., Fantus G.; Metabolism, 1998, 47, 630-6
178. Tanner L.I., Lienhard G.E.; J. Biol. Chem., 1987, 262, 8975-80

179. Teissèdre P.L., Krośniak M., Portet K., Gasc F., Waterhouse A.L., Serrano J.J., Cabanic J.C., Cros G.; Food Additiv. Contaminants, 1998, 15, 585-91
180. Thompson K. H., Battell M., McNeill J.H. w; Vanadium in environment, part 2, (Nriagu J.O. red.), John Wiley & Sons Inc., 1998
181. Thompson K.H.; BioFactors 1999, 10, 43-51
182. Toney J.H., Brock C. P., Marks J.; J. Am. Chem. Soc., 1986, 108, 7263-8
183. Trinder D., Philips P.A., Stephenson J.M., Risvanis J.K., Aminian A., Adam W., Cooper M., Johnston C.I.; Am. J. Physiol., 1994, 266, 217-23
184. Tsiani E., Fantus I.G.; Trends Endocrinol. Metab, 1997, 8, 51-8
185. Tsiani E., Bogdanovic E., Sorisky A., Nagy L., Fantus G.; Diabetes, 1998, 47, 1676-86
186. Tyczkowski J.; Wiedza i życie, 1999, 12, 32-7
187. Ueki T., Uyama T., Yamamoto K., Kanamori K., Michibata H.; Biochim. Biophys. Acta., 2000, 1494, 83-90
188. Urban J., Antonowicz-Juchniewicz J., Andrzejak R.; Med. Pr., 2001, 52, 125-33
189. Uthus E.O., Nielsen F.H.; Magnes. Trace Elem., 1990, 9, 219-26
190. Uyama T., Kinoshita T., Takahashi H., Satoh N., Kanamori K., Michibata H.; J. Biochem. (Tokyo), 1998, 124, 377-82
191. Venugopal B., Luckey T.D. w; Metal Toxicity in Mammals. Vol. 2 of Chemical Toxicity of Metals and Metalloids, Plenum Press, New York, 1978
192. Verdel E.F., Kline P.C., Wani S., Woods A.E.; Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol., 2000, 125, 179-87
193. Vescina C.M., Salice V.C., Cortizo A.M., Etcheverry S.B.; Biol. Tr. Elem. Res., 1996, 53, 185-91
194. Wenzel U.O., Fouqueray B.B.P., Grandaliano G., Choudhury G.G., Abbound H.E.; J. Clin. Invest., 1995, 95, 1244-52
195. Wide M.; Environ. Res., 1984, 33, 47-53
196. Wiegmann T.B., Day H.D., Patak R.V.; J. Toxicol. Environ. Health, 1982, 10, 233-45
197. Witkowska D., Olędzka R., Pietrzyk B.; Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1986, 37, 899-906

198. Witkowska D., Olędzka R., Markowska B.; Bull. Environ. Contam. Toxicol., 1988, 40, 309-16
199. Wójcik-Jawień M.; Fa. Po., 1998, 54, 584-9
200. Yoshikawa Y., Ueda E., Suzuki Y., Yanagihara N., Sakurai H., Kojima Y.; Chem. Pharm. Bull., (Tokyo), 2001, 49, 652-4
201. Zaporowska H., Górski M. Arch. Med. Sąd. Krym., 1984, 34, 41-8
202. Zaporowska H., Wasilewski W.; Comp. Biochem. Physiol., 1989, 93C, 175-80
203. Zaporowska H., Wasilewski W.; Comp. Biochem. Physiol., 1991, 99C, 349-52
204. Zaporowska H., Wasilewski W.; Comp. Biochem. Physiol., 1992, 101C, 57-61
205. Zaporowska H.; Post. Biol. Kom.,1995, 22, 149-65
206. Zporowska H., Ścibior A. W; Vanadium in environment, part 2 (Nriagu J.O. red.), John Wiley & Sons Inc., 1998
207. Zaporowska H.; PAN oddz. Lublin, Zeszyty Naukowe, Lublin 2000, zeszyt 193-99
208. http://www.gulflink.osd.mil/owf_ii/owf_ii_refs/n44en180/mr1018ch1.html
209. http://www.penfield-gill.com/presentations/CDCall-final.htm
210. http://priv.ciechnet.pl/dso/sklep/sklep28.htm
211. http://altcancer.w.interia.pl/witaminy.htm
212. http://staywellvitamins.com/vitasaur.htm
213. http://www5.netrition.com/vanadyl_page.html
214. http://www.health-pages.com/mv/index/html
215. http://vitaminfun.com/products.htm
216. http://lek.info.pl/vita-complete/