

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra biologických a lékařských věd

Účinek laktoferinu na makroskopický a mikroskopický obraz  
různých tkání u potkana II. Játra a ledviny  
(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce :

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Vedoucí katedry :

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Květen, 2007

Jan Škrle

Děkuji panu Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při sestavování diplomové práce a panu Mgr. Přemyslu Mladěnkovi za spolupráci na experimentu. Dále děkuji paní laborantce Pavlíně Jabůrkové za pomoc při zpracování praktické části diplomové práce. Děkuji také všem ostatním členům Katedry biologických a lékařských věd a Katedry farmakologie a toxikologie, kteří se podíleli na experimentu. Pro tuto práci byly využity prostředky z grantu GA UK 94/2006/C/Faf.

<b>OBSAH</b>	3
<b>ZKRATKY</b>	4
<b>1. ÚVOD</b>	5
<b>2. CÍL PRÁCE</b>	7
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b>	9
3.1. LAKTOFERIN	10
3.1.1. Fyziologie	10
3.1.2. Struktura	12
3.1.3. Účinky	15
3.1.4. Vlastnosti	21
3.1.5. Využití	23
3.2. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU (ROS)	24
3.2.1. Vznik	24
3.2.2. Účinek	25
3.3. ŽELEZO	26
<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	28
4.1. METODICKÁ ČÁST	29
4.1.1. Zvířata	29
4.1.2. Chemikálie a přístroje	29
4.1.3. Provedení pokusu	30
4.2. HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ	30
4.2.1. Chemikálie, přístroje a nástroje při histologickém zpracování	31
4.2.2. Zpracování materiálu pro histologickou analýzu	32
4.2.3. Histologická barvení pro světelnou mikroskopii	34
<b>5. VÝSLEDKY</b>	40
5.1. HISTOLOGICKÉ ZHODNOCENÍ	41
5.2. ZHODNOCENÍ VYBRANÝCH PARAMETRŮ	52
<b>6. DISKUSE</b>	53
<b>7. ZÁVĚR</b>	56
<b>SUMMARY</b>	58
<b>8. LITERATURA</b>	59

## ZKRATKY

ADP	adenosindifosfát
AK	aminokyselina
ApoE	apoprotein E
apoLf	apolaktoferin
ATP	adenosintrifosfát
CD 14	receptor pro LPS
DMT 1	divalent metal transporter 1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Fas	CD 95 gen
G-	Gramm negativní bakterie
GM-CSF	granulocyty a makrofágy colonie stimulující faktor
holoLf	hololaktoferin
i.v.	intravenózní aplikace
ICAM-1	intracelulární adhezivní molekula 1
IL	interleukin
Lf	laktoferin
LPS	lipopolysacharid
LRP	low-density lipoprotein-receptor-related protein
NK buňky	natural killer buňky
Nramp 2	natural resistance-associated macrofage protein 2
p.o.	perorální podání
PMN	polymorfonukleární leukocyty
ROS	reaktivní formy kyslíku
s.c.	subkutánní aplikace
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
UHT	ultra heat treatment
VEGF <sub>165</sub>	vaskulární endotelový růstový faktor

# **1. ÚVOD**

Laktoferin (Lf) je protein, který se přirozeně vyskytuje v organismu lidí i jiných živočišných druhů. Poprvé byl izolován roku 1960 z mateřského mléka a byl nalezen i v dalších tělních tekutinách a sekretech exokrinních žláz.

Lf patří do stejné skupiny proteinů jako transferin. Je schopen chelatovat trojmocné železo a jeho afinita k železu je 260x vyšší než u transferinu. Účinek Lf vychází ze schopnosti vázat železo, ale jsou popsány i účinky na železe nezávislé.

Železo katalyzuje reakce, při kterých vznikají volné kyslíkové radikály a ty mohou poškodit organismus. Lf díky schopnosti chelatovat železo snižuje tvorbu kyslíkových radikálů.

V současné době je laktoferin studován jako potenciální léčivá látka, která by se mohla uplatnit v léčbě zánětu, rakoviny a jiných onemocnění.

## **2. CÍL PRÁCE**

Cílem této diplomové práce je stanovit účinky intravenózně podaného laktoferinu na makroskopický a mikroskopický obraz jater a ledvin u potkana.

### **3. TEORETICKÁ ČÁST**

### **3.1. LAKTOFERIN**

Laktoferin (Lf) je monomerní železo vázající glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 80 kDa. Spolu s transferinem a ovotransferinem patří do rodiny transferinů.(1)

#### *3.1.1. Fyziologie*

Lf se fyziologicky vyskytuje v mnoha tkáních, orgánech i tekutinách lidského těla. Ačkoliv je intenzivně studován, není jeho funkce v organismu zcela objasněná. Lf vykazuje celé spektrum aktivit a jeho funkce bude pravděpodobně komplexní. (6,7)

#### **Výskyt**

Lf se vyskytuje především v sekretech exokrinních žláz, např.: v slzách, slinách, mléce, synoviální, seminální tekutině, žluči a pankreatické šťávě, které jsou lokalizovány ve vstupních branách do trávicího, respiračního a reprodukčního systému. Lf zde tvoří bariéru proti patogenům. (6, 7)

Dále se nachází v krvi. Tento plazmatický Lf je uvolňován ze sekundárních granul neutrofilů během zánětlivých procesů v těle.(6) Po degranulaci je Lf transportován do jater, kde je vychytáván specifickými receptory a katabolizován. (9)

Vyskytuje se také v buňkách žaludeční mukózy, v epitelálních buňkách duodena a v děloze ( výskyt menšího rozsahu ).(7)

Lf byl také nalezen ve vzorcích moče a stolice, ale jen ve velmi malém množství. (6)

Regulace syntézy Lf je komplexní proces. Transkripce je regulována hormonálními i nehormonálními faktory. V kostní dřeni pravděpodobně dochází k syntéze Lf, ale tento proces je omezen pouze na stav zrání buněk a dospělé monocyty a neutrofile (PMN) tuto schopnost už nemají. (9)

Tabulka č.1 – množství Lf v jednotlivých biologických tekutinách (6)

Biologická tekutina	Množství Lf (mg/ml)
Mléko (colostrum)	> 7
Mléko	>1-2
Slzy	> 2,2
Seminální tekutina	> 0,4 – 1,9
Synoviální tekutina	> 0,01 – 0,08
Sliny	> 0,007 – 0,01
Kravné mléko	> 0,02 – 0,2

### **p.o. podání**

Ukázalo se, že p.o. podaný laktoferin má protektivní účinky proti různým nemocem jak u zvířat tak u lidí. V trávicím traktu se Lf rozkládá na fragmenty, které se vážou na epiteliální buňky a ovlivňují střevní mukósovou imunitu. Tímto je ovlivněna i systémová imunita, čímž se zvýší obranyschopnost organismu. (8)

Receptory pro Lf byly nalezeny v kartáčovém lemu tenkého střeva.(11) Jedná se o LRP (low- density lipoprotein receptor- related protein ), který je zodpovědný za endocytózu Lf. (10)

Receptor pro Lf je vysoce exprimován v tenkém střevě u narozených jedinců, kde slouží jako alternativní cesta pro transport železa. Zatímco u dospělých jedinců je mnohem méně exprimován a transport železa je zde zprostředkován DMT1 (Nramp2 nebo DCT1). DMT1 je divalentní transportér pro kovy. (12)

Perorálně podaný Lf je absorbován receptorem zprostředkovanou endocytósou do buněk střevního epitelu. Odtud je transportován portální žilou a lymfatickými cestami do systémové cirkulace.

Po p.o. podání prasatům nebyla nalezena přítomnost Lf v játrech ani ve slezině. (13)

Lf je odolný vůči proteolytické degradaci trypsinem a jemu podobným enzymům. Holo-Lf je více rezistentní než Apo-Lf. (11)

## **Intravenózní podání Lf**

Intravenózně podaný Lf je rychle odstraňován z cirkulace krys, myší a králíků. Rychlá clearance je způsobena vychytáváním Lf játry (92.8 +/- 9.5 % dávky 5 minut po podání). Buňky jaterního parenchymu jsou hlavním místem kumulace Lf. Lf totiž blokuje vychytávání apoE (apolipoprotein E) lipoproteinů játry. Tento proces je zprostředkován receptorem, který se vyskytuje na parenchymálních buňkách. Díky podobnosti v sekvenci AK Lf a apoE dochází ke kompetici o vazebné místo. Významný podíl na kompetici má N-řetězec Lf se svými argininovými zbytky.

Po vychytání játry je Lf transportován do lysosomů, kde je rozložen. Tento proces probíhá pomaleji než eliminace z cirkulace. (14)

### *3.1.2. Struktura*

Trojrozměrná struktura lidského laktoferinu (Lf) byla poprvé popsána v roce 1987.

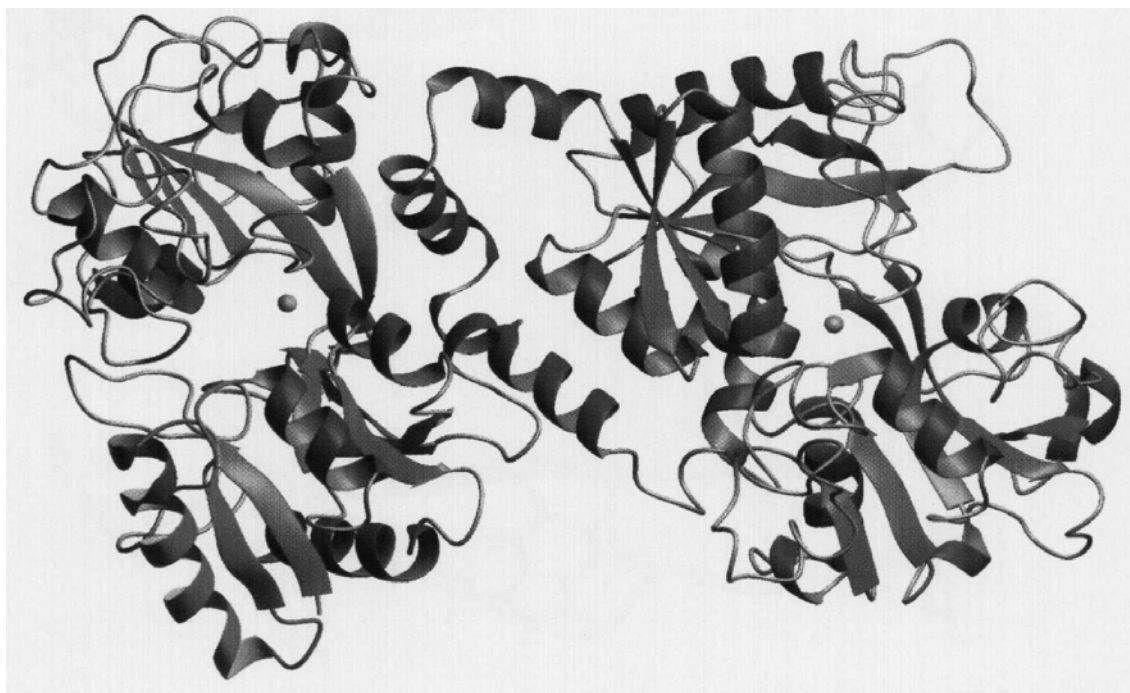
Lidský Lf se ve vysoké míře shoduje na úrovni sekvence aminokyselin se sérovým transferinem (přibližně ze 60 %). Aminokyselinové sekvence laktoferinů jednotlivých druhů (lidský, hovězí, vepřový, koňský, velbloudí, kozí, buvolí a myší) se shodují přibližně ze 70 %. (1)

Protein je tvořen dvěma homologními globulárními podjednotkami – N-podjednotka a C-podjednotka. Každá z těchto podjednotek se skládá ze dvou domén (N1, N2 a C1 a C2), které společně tvoří vazebné místo pro  $Fe^{3+}$ . Obě podjednotky jsou spojeny peptidem složeným z 10-15 AK zbytků. Tyto AK zbytky v molekule Lf tvoří 3 otáčky  $\alpha$ -helix, ale v molekule transferinu je tento úsek tvořen nepravidelnou flexibilní strukturou. Spojovací řetězec hraje významnou roli v otevírání a zavírání domén. Na sekundární struktuře proteinu se částečně podílejí disulfidické můstky mezi cysteinovými zbytky. (1,6)

Molekula glykoproteinu Lf obsahuje 2 místa potencionální glykosilace. Stupeň glykosilace se liší u různých molekul. Mohou obsahovat hexosu, manosu, hexosaminy nebo jiné sacharidy a mohou se lišit ve stupni jejich fosforylace (2).

Samostatně izolovaný N-konec laktoferinu se nazývá laktofericin.(9) Může být odštěpen působením pepsinu při kyselém pH v žaludku. (4 )

Obr. č. 1 – Krystalová struktura hovězího laktoferinu (4)



### **Místo vazby železa**

Vazebné místo pro železo, jedno v každé podjednotce, se nachází mezi dvěmi doménami. Molekula Lf umožňuje vazbu dvou molekul železa, která je pevná, ale reverzibilní. Místo vazby tvoří 2 tyrosinové zbytky, jedna kyselina asparágová, jeden histidin a dva kyslíky ze synergicky vázaného anionu ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). Přítomnost  $\text{CO}_3^{2-}$  je nezbytná pro vazbu železa, což je unikátní vlastností Lf a nevyskytuje se u žádného jiného železo-vázajícího proteinu. (1)

Ligandy pro vazbu  $\text{Fe}^{3+}$  jsou shodné na obou podjednotkách Lf a shodují se také s ligandy sérového transferinu a ovotransferinu.

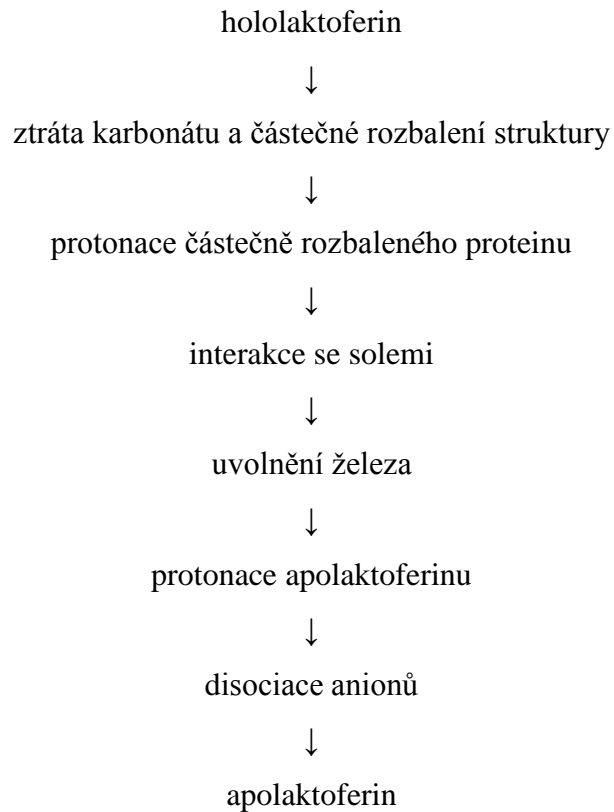
Z trojrozměrné struktury vyplývá, že nejprve dochází k vazbě  $\text{CO}_3^{2-}$ , který neutralizuje kladný náboj argininového zbytku v N- podjednotce a asociované helix a umožňuje propojení železa a čtyř ligandů (2 tyrosiny a 2 kyseliny z  $\text{CO}_3^{2-}$ ) ve vnitřním povrchu N2 domény.

Jestliže na protein není navázáno železo, obě podjednotky jsou většinou v otevřené konformaci, zatímco při navázání železa dochází k jejich uzavření. Při konformačních změnách, kdy dochází k přibližování obou podjednotek, nedochází k tvorbě kovalentních vazeb, ale převážně ke stabilizaci pomocí hydrofobních interakcí a tvorbě vodíkových můstků. (1)

### **Uvolnění železa**

U Lf probíhá uvolňování železa v normálním stavu při pH kolem 3, zatímco transferin uvolňuje železo už při pH 5,5. Toto je způsobeno rigiditou spojovacího peptidu v molekule Lf.

V kyselém prostředí (pH 3,5) tedy dochází ke ztrátě navázaného železa z molekuly holo a monomerního C- místa Lf mechanismem, který zahrnuje čtyři kroky. V prvních dvou krocích dochází k modifikacím konformace celé molekuly (tato fáze se vyskytuje i u apolaktoferinu). Tyto dva procesy jsou nezávislé na množství železa a jsou následovány třetím krokem, ve kterém dochází k přijetí dvou protonů. Ve čtvrtém kroku se uvolňuje železo při pomalém přijímání dvou protonů. (3)



### 3.1.3. Účinky

Laktoferin je fyziologicky se vyskytující molekula, která má v organismu velké spektrum účinků a ovlivňuje množství procesů, i když jeho role ještě není zcela přesně definována. Strukturální a biochemická podobnost s transferinem ukazuje, že Lf může hrát určitou roli v metabolismu železa jako jeho transportní molekula. Přestože je Lf intenzivně zkoumán, stále chybí přesvědčivý důkaz o jeho zapojení do regulace homeostázy železa nebo vstřebávání železa z tenkého střeva při fyziologickém stavu.(6)

Ve velké míře jeho účinky souvisí se schopností vázat železo a jiné molekuly, např. různé buněčné povrchové molekuly, DNA, heparin a jiné. (6)

## Účinky Lf:

- Ovlivnění zánětu
- Imunomodulační
- Ovlivnění alergické reakce
- Antimikrobiální- bakteriostatický, baktericidní, antiadhezivní a antiinvazivní, vliv na tvorbu biofilmu
- Antivirový
- Antifugální
- Antiparazitické
- Enzymatická aktivita
- Regulace transkripce genů
- Laktoferin jako růstový faktor
- Antitumorový

## Ovlivnění zánětu

Laktoferin je důležitou složkou první obranné linie organismu. Během zánětlivé reakce je uvolněn ze sekundárních granulí neutrofilů do infikované tkáně a do krve.(17)

Během zánětu vzroste hladina Lf v biologických tekutinách několikanásobně. Toto je velmi patrné v plasmě, kde za normálních podmínek dosahuje Lf koncentrace 0,4 – 2 mg/l, ale během patologické reakce vzroste na 200 mg/l. (17)

Studie in vitro a in vivo prokázaly, že Lf inhibuje produkci několika cytokinů, mezi které patří TNF- $\alpha$ , IL- 1 $\beta$  a IL – 6. (10) Tyto cytokiny jsou klíčovými mediátory zánětlivé odpovědi. Inhibiční schopnost Lf je způsobena vazbou na Lipid A, který je součástí LPS uvolněného z bakterií. Touto vazbou je znemožněno navázání LPS k CD14 receptorům na povrchu makrofágů a tím se zamezí rozvoji zánětlivé odpovědi.(18)

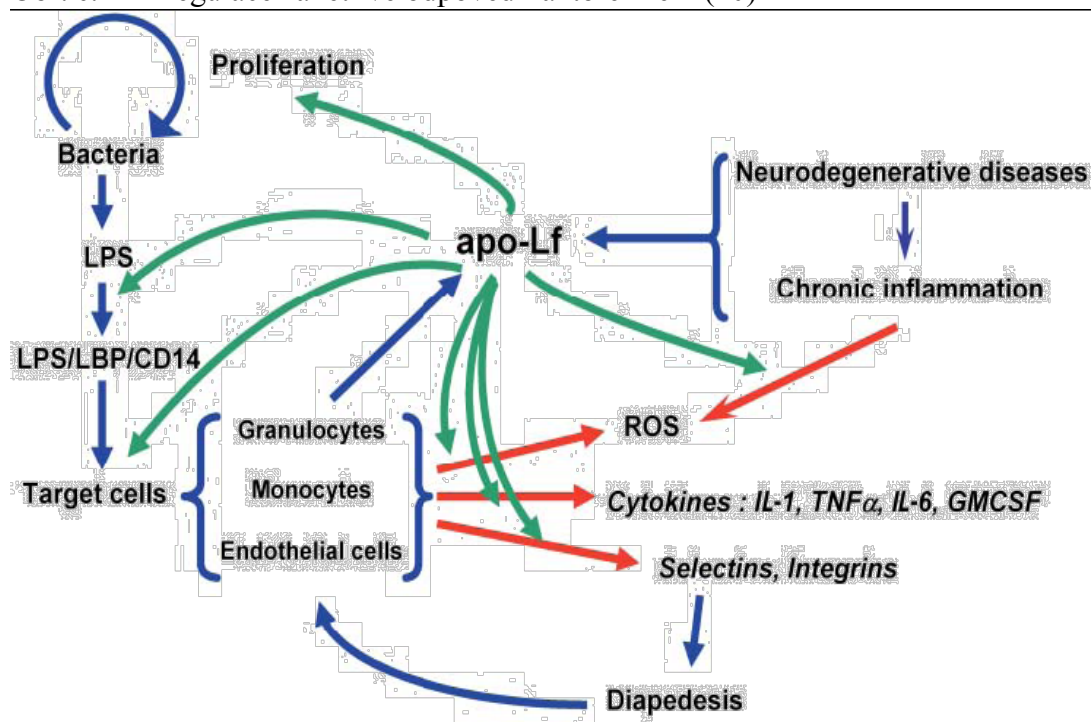
Interakce Lf k LPS neovlivňuje jen aktivaci imunitních buněk, ale také inhibuje expresi adhezivních molekul (E-selectin, ICAM-1, IL-8) na endoteliálních buňkách, které jsou nutné pro přestup imunitních buněk do místa zánětu. (10)

Vazbou Lf k LPS se sníží produkce peroxidu vodíku, který se jinak uvolňuje při vazbě LPS k L-selektinu neutrofilu. L- selektin je na séru nezávislý LPS receptor na buněčném povrchu neutrofilů. Vazbou LPS k L- selektinu dochází k aktivaci leukocytů, oxidativnímu vzplanutí a tvorbě kyslíkových radikálů. (10)

Dále bylo sledováno zvýšené uvolnění protizánětlivého IL-4 a IL-10 u krys s kolitidou krmených Lf. (17)

Lf může mít i prozánětlivé účinky. Indukuje uvolnění IL-8, TNF- $\alpha$  a oxidu dusnatého (NO). (10)

Obr. č. 2 – Regulace zánětlivé odpovědi laktoferinem (10)



Modré čáry znázorňují fyziologický proces, červené čáry biologickou odpověď organismu na infekci a poranění, zelené čáry vliv Lf na zánětlivou reakci.

## **Imunomodulační účinky**

V in vitro studiích bylo zjištěno, že laktoferin může indukovat buněčnou proliferaci a maturaci tím, že slouží jako dárce železa pro T- buňky. Lf reguluje zrání a aktivaci lymfocytů. Jeho receptor byl popsán v T- lymfocytech. Interakce Lf s T- buňkami zesiluje expresi CD4 antigenů. Dále byly popsány diferenciační účinky Lf na B-buňky ve slezině a brzlíku. (17)

Laktoferin redukuje uvolnění GM-CSF z mononukleárních fagocytů. Tím dochází k inhibici produkce TNF- $\alpha$  a IL-1, což snižuje proliferaci B-buněk a inhibuje uvolnění IL-2 z T-buněk. Inhibicí produkce IL-2 se snižuje aktivace NK buněk, T- buněk a B-buňky nedostávají signál k produkci protilátek. (19)

Po p.o. podávání Lf zdravým dobrovolníkům vzrostl počet nezralých neutrofilů v cirkulující krvi. Toto zvýšení bylo více než dvojnásobné při dávce 10 mg, ale statisticky významné bylo i zvýšení při dávkách 2 a 50 mg. Podávání Lf také způsobilo pokles spontánní produkce IL – 6 a TNF $\alpha$  , tento pokles byl významný zejména den po poslední dávce a pokračoval i v následujících 14 dnech. (25)

## **Ovlivnění alergické reakce**

Některé in vivo studie ukázaly protektivní účinky Lf proti alergiím postihujícím kůži a plíce. Lf je nadměrně exprimován u pacientů s alergiemi. U kožních alergií se Lf váže na keratinocyty a inhibuje uvolnění TNF- $\alpha$  z těchto buněk. Tím se zamezí migraci buněk prezentujících antigen a následně aktivaci žírných buněk a bazofilů. Jiné vysvětlení antialergického účinku Lf spočívá ve schopnosti destabilizovat tryptázu, což je silně prozánětlivě působící proteáza uvolněná z žírných buněk. (17)

## **Antimikrobiální účinky**

### 1. bakteriostatické působení

Lf má schopnost vázat železo a tím omezuje jeho přísun bakteriím. Při nedostatku železa dochází k zastavení růstu bakterií. (4)

## 2. baktericidní působení

Druhý mechanismus antibakteriálního účinku Lf je na železe nezávislý a je zprostředkován N-koncem Lf.(9) Fyziologicky se uvolňuje LPS (lipopolysacharid) z vnější membrány G- bakterií, což vede k zánětlivé reakci. Silně bazický N- konec laktoferinu váže kyselý LPS a tím blokuje zánětlivou odpověď. (4)

## 3. Antiadhezivní a antiinvasivní vlastnosti

Laktoferin inhibuje schopnost bakteriálních buněk vázat se na hostitelské buňky, čímž je schopen např. inhibovat vazbu *Helicobacter pylori* na epitelální buňky žaludku. Mimoto bylo zjištěno, že laktoferin nezávisle na schopnosti vázat železo inhibuje intracelulární invazi patogenů jakými jsou např.: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* a *Shigella flexneri*. (15)

## 4. Vliv laktoferinu na bakteriální agregaci a tvorbu biofilmu

Biofilm je skupina bakterií, které žijí ve spojení s povrchem a jsou uzavřeny do polymerní matrix. Mezi infekce způsobené biofilmem patří např.: endokarditida, osteomyelitida, infekce urinárního a bilárního traktu, zubní infekce.

*Pseudomonas aeruginosa* žijící v biofilmu je až 100x více rezistentní k léčbě než samostatná bakterie. Bakterie přilnou k povrchu a následně tvoří mikrokolonie, které jsou raným stádiem vývoje biofilmu. V přítomnosti subinhibiční koncentrace laktoferinu (20 µg/ml) bakterie nejsou schopny tvořit mikrokolonie a následně ani biofilm. Lf totiž vyvolá u bakterií „škubavý“ pohyb, který znemožní jejich shluknutí. Tento účinek je způsoben chelatací železa. (16)

## **Antivirové účinky**

Lf je schopen redukovat infektivitu různých virů hlavně in vitro. Mechanismus tohoto účinku je zatím nejistý. Pravděpodobně souvisí s blokováním interakcí mezi hostitelskou buňkou a virem. Tento účinek vyplývá ze schopnosti Lf vázat kyselé molekuly.(9) Virová aktivita je inhibována v rané fázi virové infekce vazbou Lf s glykosaminoglykanem nebo s virovými částicemi.(15)

### **Antifugální účinky**

Laktoferin působí na rod *Candida* díky své schopnosti vázat železo a díky přímé interakci s buňkami těchto organismů. Účinnost Lf byla testována v kombinaci s antifugálními léčivy. (15)

### **Antiparazitické účinky**

Role Lf je tady velmi nejasná, Lf působí různými mechanismy. Byla prokázána redukce aktivity při inkubaci sporozoitů *Toxoplasma gondii* a *Eimeria stiedai* s Lf. Usuzuje se buď na snížení integrity membrány parazita nebo na interakci s hostitelskými tkáněmi.(9)

### **Enzymatická aktivita**

Různé frakce purifikovaného lidského Lf mají 5 enzymových aktivit: DNáza, RNáza, ATPáza, fosfatáza a hydroláza malto-oligosacharidů. Odlišná enzymová aktivita je dána specifickou konformací monomerního Lf, kterou ovlivňují navázané ligandy.

DNázová a RNázová aktivita přispívá k ochraně před viry a bakteriemi tím, že hydrolyzuje jejich nukleové kyseliny.

Některé z katalytických schopností jednotlivých frakcí jsou cytotoxické a indukují apoptósu. (2)

### **Regulace transkripce genů**

Lf je schopen proniknout do jádra buňky, kde se váže na DNA a tím ovlivňuje transkripci. Tato vazba je umožněna N-koncem Lf. (4)

### **Laktoferin jako růstový faktor**

U čerstvě narozených mláďat krmených mateřským mlékem byl prokázán rychlejší růst a vývoj gastrointestinálního traktu než u mláďat krmených náhradní výživou. Za tento účinek je zodpovědný Lf, který stimuluje začlenění thymidinu do DNA. Pouze holo- Lf má tyto účinky. (11)

## **Antitumorové účinky**

Antitumorové účinky Lf jsou velice rozmanité. Zahrnují regulaci aktivity NK buněk, modulaci exprese G1 proteinů, inhibici VEGF<sub>165</sub> – uvolňovaný při angiogenezi a urychlení apoptózy. Žádný z těchto účinků není závislý na vazbě železa. Existuje mnoho studií na zvířatech, které ukazují, že Lf může inhibovat rozvoj experimentálních tumorů. (9)

### *3.1.4. Vlastnosti*

#### **Biochemické vlastnosti**

V přirozeném stavu je Lf z 15-20% nasycen železem a má lososovitě růžovou barvu, jejíž intenzita je závislá na stupni nasycení železem. Lf, který obsahuje méně jak 5% železa je označován jako **apolaktoferin** (apo-Lf). Naopak Lf plně nasycený železem je **hololaktoferin** (holo-Lf). V mateřském mléce se Lf nachází v podobě apo-Lf.

Afinita Lf k železu je vysoká, asi 260krát vyšší než afinita sérového transferinu a na rozdíl od transferinu je schopen udržet železo i při nižším pH. Množství navázaného železa je závislé na přítomnosti bikarbonátového anionu. (6)

1 mg Lf je schopen vázat 1,4 µg železa. (5)

Lf nemusí vždy vázat jen železo. Je schopen vázat i jiné kationy kovů jako např.: Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>3+</sup>, Co<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>. Tato vazba pak mění i vlnovou délku absorpčního maxima. (6)

N-konec jak hovězího tak lidského Lf je silný kationický peptid, který je bohatý na argininové zbytky. Je schopen vázat mnoho kyselých molekul ( LPS, lysosym, heparin a DNA). Pokud dojde k odstranění prvních pěti AK (Gly-Arg-Arg-Arg-Arg), Lf ztrácí schopnost vázat tyto molekuly. Stupeň saturace Lf železem neovlivňuje tuto vazbu. N-konec je zodpovědný za antibakteriální účinky. (6)

## **Fyzikálně- chemické vlastnosti**

Lf má velmi vysokou hodnotu isoelektrického bodu. Teoretická hodnota  $pI$  vypočtená pro Lf je 9,4-9,5. Avšak experimentálně zjištěné hodnoty se pohybují ve velkém rozmezí od 5,5 po 10, což může být vysvětleno variací v arginin- bohatých N podjednotkách za různých podmínek separace. (6)

## **Technologické vlastnosti**

### Tepelná stabilita

Tepelná stabilita Lf je velmi důležitou vlastností, která určuje možnosti jeho zpracování a tím i využitelnosti jako léčiva. Chování jednotlivých forem Lf při tepelných změnách se znatelně liší. Holo-Lf byl více rezistentní vůči teplem indukovaným změnám než apo-Lf.

Pasterizace při 72°C na 15s neměla žádný vliv na antimikrobiální vlastnosti apo -Lf ani železem-saturovaného Lf. Avšak UHT (což je bleskové 2-3s zahřátí na 137°C a následné rychlé zchlazení) zrušila schopnost holo-Lf vázat se na povrch bakterií stejně jako bakteriostatickou schopnost apo-Lf.

Při procesu UHT byly obě formy proteinů zcela denaturovány. Jak se zdá díky UHT dochází ke změnám ve struktuře i v biologických vlastnostech přirozeného Lf, tedy apo-Lf i holo-Lf.

Mezi 72 - 85 °C dochází k denuraci Lf reakcí 1.řádu. Bylo potvrzeno, že standardní režimy pasterizace, které se používají každodenně v průmyslu, nemají žádný efekt na strukturu Lf. Proto se pasterizace jeví jako nejlepší způsob při zpracování produktů, které obsahují tento protein.

Lf díky své schopnosti inhibovat Fentonovu reakci a tím i volných radikálů, je využitelný jako antioxidant v různých potravinových produktech a může se tak doplňkově podílet na prodloužení doby použitelnosti. (6)

### 3.1.5. Využití

#### **Účinek na oxidační stabilitu polynenasycených mastných kyselin**

Lipidová oxidace je značným problémem u potravin obsahující vysoce nenasycené mastné kyseliny. Tyto specifické lipidy jsou do potravin přidávány pro dosažení určitých nutričních a funkčních vlastností, ale vykazují nižší oxidační stabilitu než tradiční lipidy.

Železo katalyzuje oxidaci, při níž dochází ke vzniku alkoxy- radikálů, které pak reagují s molekulami lipidů a tím dále šíří oxidaci.

Hovězí Lf přidáný do mléka a majonézy projevil velký antioxidační účinek při koncentraci 1-20  $\mu\text{M}$  v 10% emulsi typu olej ve vodě.

Tento účinek souvisí s chelatačními schopnostmi Lf. (22)

#### **Preventan Quatro**

Lf je součástí volně prodejného přípravku Preventan Quatro vyráběného firmou SVUS Pharma a.s. , Hradec Králové.

V jedné tabletě je obsaženo 44 mg Lf, 1 mg účinné složky ( nukleotidy, aminokyseliny, oligopeptidy ), 3mg silice máty peprné, 5mg eukaliptové silice a pomocné látky.

Tento přípravek je určen proti bolesti v krku. Jeho účinnost spočívá v aktivaci slizniční imunity. Výrobce udává, že při provedení klinické studie došlo k nárůstu sekrečního Ig A o 60% u osob užívajících tento preparát.

Doporučené dávkování je 2 tablety denně ( ráno a večer ) nechat volně rozplynout v ústech.

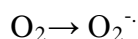
Přípravek je určen pro děti starší 3 let a pro těhotné po prvním trimestru.

## **3.2. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU (ROS)**

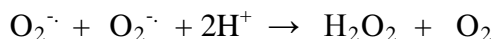
### *3.2.1. Vznik*

Kyslík ( $O_2$ ) se v mitochondriích normálně kompletně redukuje na vodu ( $H_2O$ ) tím, že přijímá 4 elektrony. Při nekompletní redukci mohou vzniknout velmi toxické deriváty: hydroxylový ion, superoxidový radikál a peroxid vodíku. Dochází k tomu při řadě enzymových reakcí v různých buněčných složkách (mitochondrie, lysosomy, peroxisomy, plazmatická membrána). (20)

Superoxidový radikál vzniká buď přímo při oxidaci v mitochondriích nebo při reakcích katalyzovaných xanthinoxidázou, cytochromem P450, event. jinými oxidázami:

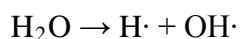


Vzniklý superoxid může být inaktivován spontánně nebo mnohem rychleji účinkem superoxidodismutázy za vzniku  $H_2O_2$ :

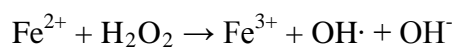


Peroxid vodíku se tvoří buď dismutací  $O_2^{\cdot -}$  nebo přímo oxidázami v peroxisomech, obsahujících katalázu, která jej ihned rozkládá.

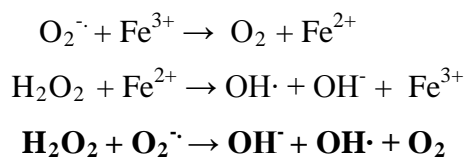
Hydroxylové radikály vznikají hydrolýzou vody při ionizační radiaci :



Nebo při Fentonově reakci katalyzované přechodnými kovy (např. Fe, Cu) :



Nebo při přímé reakci peroxidu vodíku se superoxidovým radikálem nazývané Haber-Weissova reakce, která je rovněž katalyzována železem.



Odhaduje se, že zhruba 1 % redukce  $\text{O}_2$  probíhající v buňkách skončí jako kyslíkový radikál. Reaktivní produkty vznikající při metabolismu kyslíku jsou schopné zničit prakticky jakoukoliv biologickou sloučeninu (protein, DNA, lipidy). Proto mnoho buněk vlastní různé enzymatické a jiné mechanismy, aby se bránily těmto nežádoucím účinkům. Naproti tomu fagocytující bílé krvinky (neutrofil, monocyt, makrofág a eosinofil) záměrně produkují  $\text{O}_2^{\cdot-}$  jako součást jejich mikrobicidního účinku. (20)

Bylo prokázáno, že výše uvedené reakce, jimiž neutrofil, monocyt a makrofág produkují  $\text{OH}\cdot$  Haber-Weissovou reakcí nemohou probíhat bez katalýzy železem.

Lf chelatuje trojmocné železo a tak působí proti tvorbě volných radikálů. (20)

### 3.2.2. Účinek

#### **Lipidová peroxidace**

Peroxidace membránových lipidů narušuje uspořádání soudržné lipidové dvojvrstvy a strukturní organizace. Během ataku ROS dochází ke zkracování a zmenšování struktury kyselin. (21)

#### **Poškození DNA**

Reaktivní druhy kyslíku mohou způsobit změny ve struktuře DNA a vznik specifických chemických modifikací purinových a pyrimidinových bazí.

Oxidační modifikace bazí se mohou projevit jako mutace, oxidace a řetězcové zlomy DNA. Oxidace deoxyribosové části může indukovat uvolnění baze. (21)

## Poškození proteinů

Oxidace aminokyselin v proteinech vede k nevratným fyziologickým změnám. Tyto fyziologické změny jsou kategorizovány do tří skupin: fragmentace, agregace (denaturace), citlivost k proteolytickému štěpení (vlivem konformačních změn). (21)

## 3.3. ŽELEZO

Železo je nepostradatelný biogenní prvek.(24) Buňky potřebují železo k syntéze DNA, RNA a proteinů, k transportu elektronů, respiraci, proliferaci, diferenciaci a k regulaci genové exprese. Železo je nutné k přechodu buněk z G1 do S fáze buněčného cyklu a ovlivňuje expresi molekul, které kontrolují průběh buněčného cyklu. (23)

V organismu se uplatňuje převážně v procesech buněčného dýchání. Závisí na něm reverzibilní vazba kyslíku na hemoglobin i další významné biochemické reakce.

V těle dospělého člověka je obsaženo 3,5-4 g železa. 65-70 % celkového železa je v hemoglobinu cirkulujících erytrocytů, 4 % jsou v myoglobinu. Zlomek ( asi 1 % ) je vázán v enzymech ( cytochromy, cytochromoxidáza, peroxidáza, kataláza aj.). 15-30 % tvoří zásobní železo a na transportní připadá 0,1 %.

Železo se v organismu vyskytuje ve dvou oxidačních stavech. Ve ferro (  $Fe^{2+}$  ) a ferri (  $Fe^{3+}$  ) formě. Ferro-forma je charakteristická pro hemové železo, kdežto skladovací a transportní proteiny vážou železo ve formě trojmocné.

Hlavním transportním proteinem železa u obratlovců je plazmatická bílkovina transferin ( $\beta$ 1-globulin). Transferin má dvě vazebná místa pro železo, které váže v trojmocné podobě. (24)

Železo je rezorbováno v tenkém střevě a jeho transport přes intestinální povrch zprostředkovává protein DMT1 (známý jako Nramp2 nebo DCT1). (12)

Zásobní železo je uloženo v makrofázích sleziny, v játrech, v kostní dřeni a nepatrné množství se nachází ve většině buněk. Hlavní zásobní formou železa je feritin. Další zásobní formou je hemosiderin, který představuje pravděpodobně degradační produkt feritinu. Železo z něj může být mobilizováno, ale uvolňuje se velmi obtížně. (24)

Železo je obzvláště důležité při toxickém kyslíkovém poškození. Většina volného železa je v trojmocné formě a musí být redukována na dvojmocnou, aby mohla být účinná ve Fentonově a Haber-Weissově reakci. (20)

## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## **4.1. METODICKÁ ČÁST**

### *4.1.1. Zvířata*

K experimentům byli použiti samci potkanů kmene Wistar (Bio Test sro. Česká republika) o průměrné hmotnosti 350g. Zvířata byla chována ve viváriu Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové se zajištěním ventilace vzduchu pro otevřenou chovu, teplotou v rozmezí 22-24°C, s volným přístupem ke standardní peletizované stravě a pitné vodě. Studie byla prováděna v souladu se Zákonem č.246/1992 Sb. O ochraně zvířat proti týrání a pod odborným dohledem Etické komise Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

### *4.1.2. Chemikálie a přístroje*

urethan (ethylurethan, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

aqua pro inj. Biotika, inj. Sol. (Biotika a.s. Slovensko)

heparin Léčiva (Zentiva a.s., Česká republika)

laktoferin (SVUS Hradec Králové)

chirurgické nástroje (peany, nůžky, skalpely, nitě apod.)

kanylky

valu-Set, PE katetry

tlakový snímač BPR-0,2

cardiosys® (Experimentria Ltd, Maďarsko)

software Cardiosys V1.1

mikropipety

### *4.1.3. Provedení pokusu*

Ke zjištění makroskopických a mikroskopických tkáňových změn jsme použili dva experimentální modely. Dvěma potkanům jsme odděleně podávali intravenózně vodný roztok laktoferinu. U prvního z dvojice (La1) jsme podávali Lf v dávce 20mg/kg každých 24 hodin po tři dny. U druhého jedince (La7) byl Lf podán jednorázově v dávce 50 mg/kg. Aplikace Lf byla prováděna do postranní ocasní žíly pomocí kanylky a Valu-Setu. Pro usnadnění aplikace byly žíly dilatovány nahříváním ocasu v horké vodě. Po ukončení podávání Lf byla zvířata uspána intraperitoneálně podaným roztokem 20% urethanu (5,8 ml/kg) a sloužila kolegům z Katedry farmakologie k hodnocení funkčních parametrů srdce. Po ukončení pokusu jsme tkáň fixovali intravenózně podaným paraformaldehydem a následně jsme je odebrali k histologickému vyšetření.

K dalšímu experimentu bylo použito 14 zvířat, která byla náhodně rozdělena do dvou skupin (po sedmi jedincích). Jedné skupině byl i.v. aplikován fyziologický roztok (2ml/kg) a druhé skupině byl i.v. aplikován roztok Lf (50mg/kg). Tento pokus sloužil ke zjištění hodnot malonyldialdehydu v plazmě a k měření arteriálního krevního tlaku. K měření krevního tlaku byla použita Stewartova-Hamiltonova termodiluční metoda. Malonyldialdehyd byl stanoven biochemickou analýzou. Statistické rozdíly mezi skupinami byly testovány pomocí T-testu za využití softwaru GraphPad Prism verze 4.00 pro Windows, GraphPad Software, (San Diego California USA). Výsledky tohoto experimentu nám poskytli kolegové z Katedry farmakologie, se kterými jsme spolupracovali. Na Katedře farmakologie probíhá výzkum vlivu Lf na infarkt myokardu.

## **4.2. HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ**

Tkáň odebranou pro histologické vyšetření jsme umístili do nádoby s fixační tekutinou a označili ji číslem pod níž byl vzorek evidován. Vzorek jsme odvodnili, projasnili, prosytili parafínem a zalili do parafínu (viz. fixace). Z parafínových bločků jsme připravili histologické řezy, které jsme dále nabarvili. Obarvené preparáty jsme zamontovali do Solakrylu. Po zaschnutí byly vzorky připraveny pro analýzu světelnou mikroskopií.

#### *4.2.1 Chemikálie, přístroje a nástroje při histologickém zpracování*

aceton (LACH-NER s.r.o. NERATOVICE)  
alciánová modř (SIGMA-ALDRICH)  
bazický fuchsin (Loba Feinchemie)  
eosin G (MERCK)  
ethanol 96% (Lihovar Chrudim a.s.)  
ethylenglykol (Lachema Brno)  
formol konc. (PENTA-CHRUDIM)  
glycerol (ALMA)  
hematoxylin (Lachema Brno)  
chlorid železitý (Lachema Brno)  
jodičnan sodný (Lachema Brno)  
jodid draselný (Lachema Brno)  
kyselina fosfomolybdenová (LACH-NER s.r.o. NERATOVICE)  
kyselina chlorovodíková (Lachema Brno)  
kyselina jodistá (Lachema Brno)  
kyselina octová (LACH-NER s.r.o. NERATOVICE)  
kyselina pikrová (Polskie Oddczynniki Chemiczne)  
kyselina octová ledová (LACH-NER s.r.o. NERATOVICE)  
kyselý fuchsin (Fischer Scientific)  
parafín (PARAMIX-HOLICE)  
pirosiřičitan draselný (Lachema Brno)  
síran hlinitý (PENTA-CHRUDIM)  
sirnatán sodný (Lachema Brno)  
Solakryl (Lachema Brno)  
světlá zeleň (Flusa AG, Switzerland)  
xylen (Kulich Hradec Králové)

pH metr (pH 538 WTW)  
míchačka (MM1, Laboratorní přístroje Praha)  
laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, pipety apod.)

kyvety

podložní a krycí sklička

sáňkový mikrotom ( Leitz-Wetzlar, Reichert)

rotační mikrotom (MPS-2)

světelný mikroskop (Hund Wetzlar V300)

mikroskop Olympus AX-70 (Olympus Ltd.,Japan)

digitální kamera Pixeling PL-A642 (Vitana Corp.,USA)

software LUCIA verze 4.71(Laboratory Imaging Prague, ČR)

#### *4.2.2. Zpracování materiálu pro histologickou analýzu*

##### **Fixace**

Fixace je rychlé vysrážení (denaturace) bílkovin, protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky. Cílem je zabránit samovolnému rozkladu tkáně nebo-li autolýze. Ta je podmíněna působením enzymů a vede rychle k markantním změnám protoplazmy až k úplnému rozkladu buněk a tkání. Fixace musí být šetrná, aby byla zachována pokud možno taková struktura tkáně, jakou má tkáň zaživa. Fixace dále nesmí porušovat barvitelnost tkáně a musí do tkáně rychle pronikat. Tkáň respektive vzorek tkáně je nutno vložit do fixace co nejrychleji po odebrání. U celých orgánů se fixační roztok vstříkuje přímo do cév. Minimální doba fixace je 24 hodin – záleží na velikosti vzorku. K fixaci jsme použili Bouinovu fixační tekutinu a formol.

##### **Bouinova fixační tekutina**

Bouinova tekutina patří mezi fixační prostředky na bázi kyseliny pikrové. Rychle proniká tkání a tkáň se po fixaci rychle barví. Průměrná doba fixace je 24 hodin a nedoporučuje se vypírat tkáň ve vodě, protože dojde ke zbobtnání vaziva.

Složení:

nasycený roztok kyseliny pikrové 300 ml

neutrální formol 100 ml

Před použitím se přidává 3-5 ml kyseliny octové ledové na každých 100 ml roztoku.

### *Neutrální formol*

Neutrální formol je formol neutralizovaný od účinku kyseliny mravenčí pomocí uhličitanu. K neutralizaci se používá práškový  $\text{CaCO}_3$  nebo  $\text{MgCO}_3$ . Nasype se do láhve s formolem asi do výše 2-5 cm, občas se protřepe a během několika dnů je formol zneutralizován. Ředí se vodou na požadovanou koncentraci.

Zpracování vzorku z fixace Bouinovou tekutinou

80 % etanol	1 hod
acetón	3 x během 24 hod
benzen	3 x po 10 min
parafín	2 x během 24 hod
zalití do parafínu	

### **Formol**

Formol je jednou z nejpoužívanějších fixačních tekutin. 40% roztok formaldehydu v destilované vodě je 100% formol. K běžné fixaci se používá 10% či 20% formol. Formol je dobrá fixační tekutina, dobře proniká tkání a fixovaná tkáň se dobře barví. Doba fixace ve formolu je jeden týden.

Zpracování vzorku fixovaného ve formolu:

70 % etanol	30 min
70 % etanol	30 min
80 % etanol	3 hod
90 % etanol	2 hod
96 % etanol	přes noc
acetón I	30 min
acetón II	30 min
xylen I	2 hod
xylen II	4 hod
parafín I	přes noc
parafín II	přes noc
zalití do parafínu	

### **Zalítí tkáně do parafínu**

K zalítí tkáně do parafínu se používá zkvalitněný a přefiltrovaný parafín. Ten se získá tak, že k přetavenému parafínu se přidá 3-5 g včelího vosku na 100 g parafínu. Sestavili jsme kovové komůrky, do nichž jsme umístili fixovanou tkáň, zalili parafínem a na horní část jsme přiložili plastovou destičku, která sloužila jako nosič vzorku. Destičku jsme označili číslem vzorku. Po ztuhnutí parafínu jsme bloček ořízli tak, aby vrstva parafínu kolem vzorku byla široká 3-5 mm. Takto připraveny bloček jsme uložili do označeného sáčku a dále uchovávali v lednici.

### **Krájení parafinových bločků**

Ke krájení jsme používali sáňkový mikrotom (Reichert, Leitz-Wetzlar). Bloček jsme nejprve nahrubo prokrájeli ke tkáni a pomocí mikrometrického šroubu nastavili požadovanou tloušťku řezu (2-4 $\mu$ m). Řezy jsme přenesli do kapky vody na podložním sklíčku, které jsme předem potřeli směsí glycerolu a bílku, aby se řez na sklíčko přilepil a zůstal fixován při dalším zpracování.

### **Směs glycerolu s bílkem**

Směs vaječného bílku a glycerolu v poměru 1:1 se ušlehá a přefiltruje. K filtrátu se přidá malý kousek kafru za účelem konzervace.

Řezy na podložním sklíčku jsme přenesli na elektrickou plotýnku předehřátou na 40°C. Po vypnutí řezů jsme slili přebytečnou vodu a sklíčka označili pomocí diamantu číslem vzorku. Takto připravené preparáty jsme nechali volně uschnout a dále je zpracovávali barvicími technikami.

### *4.2.3. Histologická barvení pro světelnou mikroskopii*

Při barvení využíváme toho, že různé části buněk a tkání vážou různá barviva, takže je v mikroskopu zřetelně rozlišíme.

## HEMATOXYLIN A EOSIN

Používá se jako základní barvení pro světelnou mikroskopii.

### Roztoky:

#### **Hematoxylin Hill**

hematoxylin	4,0 g
jodičnan sodný	0,4 g
síran hlinitý	35,2 g
destilovaná voda	710,0 ml
ethylenglykol	250,0 ml
kyselina octová	40,0 ml

#### **Eosin**

1 % roztok eosinu v dest.vodě

<u>odparafinování:</u>	3 x xylen	5 min
	96 % ethanol	5 min
	70 % ethanol	5 min
	destilovaná voda	5 min
	otření sklíček	
<u>barvení:</u>	hematoxylin	6-8 min
	pramenitá voda	10 min (modření)
	otření sklíček	
	eosin	2 min
	destilovaná voda	opláchnutí
<u>odvodnění:</u>	2 x 96 % ethanol	opláchnutí
	ethanol – xylen (2:1)	3 min
	ethanol – xylen (1:2)	3 min

projasnění: 3 x xylen 3 min  
otření sklíček

zamontování do Solakrylu

**výsledek barvení:** jádra buněk a kolagenní vazivo růžově  
svalstvo červeně

## **WEIGERTŮV ŽELEZITÝ HEMATOXYLIN - VAN GIESONŮV PIKROFUCHSIN**

### **Roztoky:**

#### **Weigertův železitý hematoxylin:**

roztok A		roztok B	
96 % ethanol	100,0ml	destilovaná voda	95,0ml
hematoxylin	1,0ml	chlorid železitý	0,6g
		HCl	0,75ml

Roztok A: Roztok B = 1:1

#### **Pikrofuchsin:**

Za studena nasycený roztok kyseliny pikrové	100,0ml
2 % roztok kyselého fuchsinu	6,0ml

před použitím jsme okyselili 1 kapkou 2 % kyseliny octové na 10 ml

odparafinování: 3x xylen 5min  
96 % ethanol 5min  
70 % ethanol 5min  
destilovaná voda 5min  
otření sklíček

<u>barvení:</u>	Weigertův hematoxylin	15-20 min
	pramenitá voda	5min
	destilovaná voda	opláchnutí
	pikrofuchsin	5 – 10 min
	destilovaná voda	opláchnutí (rychle)
<u>odvodnění:</u>	70 % ethanol	opláchnutí (rychle)
	80 % ethanol	opláchnutí (rychle)
	96 % ethanol	opláchnutí
	96 % ethanol	opláchnutí
	ethanol – xylen (2:1)	opláchnutí
	ethanol – xylen (1:2)	opláchnutí
<u>projasnění:</u>	3x xylen	3min

zamontování do Solakrylu

<b>výsledek barvení:</b>	jádra	červenohnědě
	kolagenní vazivo	červeně
	svalstvo	žlutě

## **PAS REAKCE**

PAS (Periodic Acid and Schiff) reakce je reakcí založenou na oxidaci polysacharidů kyselinou jodistou (periodic acid) při které vznikají aldehydy které reagují s Schiffovým reagens za vzniku třešňově červeného zbarvení..

### **Roztoky:**

#### **Kyselina jodistá**

kyselina jodistá	1 g
70 % etanol	100 ml

### Sirnatanová lázeň

jodid draselný	10 g
sirnatan sodný	10 g
1 N HCl	10 g
destilovaná voda	125 ml
1 N HCl ( 8 ml konc. HCl do 100 ml dest. vody)	

### Schiffovo reagens

bazický fuchsin	1 g
dest. voda	200 ml
1N HCl	20 ml

bezvod. pirosiřičitan draselný 1g

<u>odparafinování:</u>	3x xylén	5min
	96 % ethanol	5min
	70 % ethanol	5min
	destilovaná voda	5min
	otření sklíček	

<u>barvení:</u>	kyselina jodistá	7min
	sirnatanová lázeň	30 s
	70 % ethanol	opláchnutí
	destilovaná voda	opláchnutí
	Schiffovo reagens	20 min
	Schiffovo reagens slít do kyvety s pramenitou vodou	
	a nechat stát	5 min
	pramenitá voda	20 min
	otření sklíček a kontrola v mikroskopu	
	hematoxilin	45 s
	kyselý alkohol	diferenciace
	pramenitá voda	10 min
	otření sklíček	

<u>odvodnění:</u>	2 x 96 % ethanol	opláchnutí
	ethanol – xylen (2:1)	3 min
	ethanol – xylen (1:1)	3 min

<u>projasnění:</u>	3x xylen	3 min
--------------------	----------	-------

zamontování do Solakrylu

<b>výsledek barvení:</b>	glykogen	třešňově červeně
	jádra	modře
	erytrocyty	žlutě
	elastická vlákna	žlutooranžově

### **Zamontování do Solakrylu**

Skříčka s obarvenými preparáty vyjmutá z kyvety s xylenem jsme otřeli v okolí tkáně. Poté jsme preparáty překryli krycím sklíčkem, na němž byla kapka Solakrylu a nechali několik dní zaschnout.

## **5. VÝSLEDKY**

## **5.1. Histologické zhodnocení**

K histologickému zhodnocení jsme použili příčné a podélné řezy jednotlivých orgánů.

Fotodokumentace a digitalizace mikroskopických nálezů byla provedena pomocí mikroskopu Olympus AX-70 (Olympus Ltd., Japan), digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA) a za pomoci softwaru LUCIA verze 4.71 (Laboratory Imaging Prague, ČR).

### **Játra**

Na začátku obrazové dokumentace je pro lepší porovnání nálezů uveden histologický řez fyziologických jater (obr.3).

#### **LA7 (jednorázové podání Lf v dávce 50mg/kg)**

Na přehledném průřezu játry jsme pozorovali normální umístění cévního a žlučového systému. V sekundárních lalůčcích jater byly nápadně rozšířené sinusoidy. V některých byla přítomna větší krevní náplň, jiné byly naopak volné. Rozšíření bylo obzvláště patrné pod kapsulou (obr.4). Při větším zvětšení jsou lépe viditelné překrvené a nepřekrvené oblasti (obr.5).

Při velkém zvětšení se potvrdily nálezy z předešlého pozorování. Nejnápadnější byla výrazná pěnivost cytoplazmy hepatocytů na periferii buňky. Jádra hepatocytů byla nápadně velká s výrazně rozloženým chromatinem. Oproti kontrolnímu preparátu jsme našli větší počet dvojjaderných buněk. Výrazné změny jsme pozorovali i ve výstelce jaterních sinusoid. Endoteliální litorální buňky měly často zduřelá jádra. Nacházely se rovnoběžně s výstelkou krevní sinusoidy a v některých případech byly dokonce orientovány kolmo k výstelce. Endoteliální výstelka větších úseků nebyla pozměněna. Nápadná byla i aktivace Kupfferových buněk. Nebyly pozorovány patologické změny v morfologii erytrocytů, ale docházelo k jejich atypické kumulaci v rozšířeních. Žlučové cesty byly bez nálezu (obr.6).

V centrální části hepatocytů okolo jádra byla pozorována depozita glykogenu, o jehož nálezu jsme se přesvědčili při barvení technikou PAS (obr. 7).

### **LA1 (opakované podání Lf v dávce 3x 20mg/kg)**

Při menším zvětšení jsme pozorovali zachovalou strukturu jater. Nápadné bylo rozšíření jaterních sinusoid jako u La7 (obr.8)

Při detailnějším zobrazení byla patrná vakuolizace hepatocytů, která byla menší než u La7. V jádrech se nacházel rozprostřený chromatin. Rovněž jako u La7 jsme pozorovali dvojjaderné buňky, deposita glykogenu a aktivované Kupfferovy buňky. Morfologie erytrocytů byla nezměněna. (obr 9).

Jako vedlejší nález jsme pozorovali vakuolizaci jader hepatocytů ( srpkovitý tvar), které pravděpodobně vedly k destrukci buňky (obr.10).

## **Ledviny**

### **LA7 (jednorázové podání Lf v dávce 50mg/kg)**

V kůře jsme pozorovali téměř normální morfologickou strukturu. Mírné překrvení lze pozorovat v kapilárním řečišti glomerulu. Některé glomeruly měly zúžený prostor mezi listy Bowmanova pouzdra. Výraznější změna byla v distálních tubulech kortikálních nefronů. Jejich cytoplazma byla nápadně eosinofilní s oploštěním jader. Místy se vyskytovaly odloučené epiteliální buňky (obr.11). Na detailním zobrazení je patrný nález v distálních tubulech (obr.12).

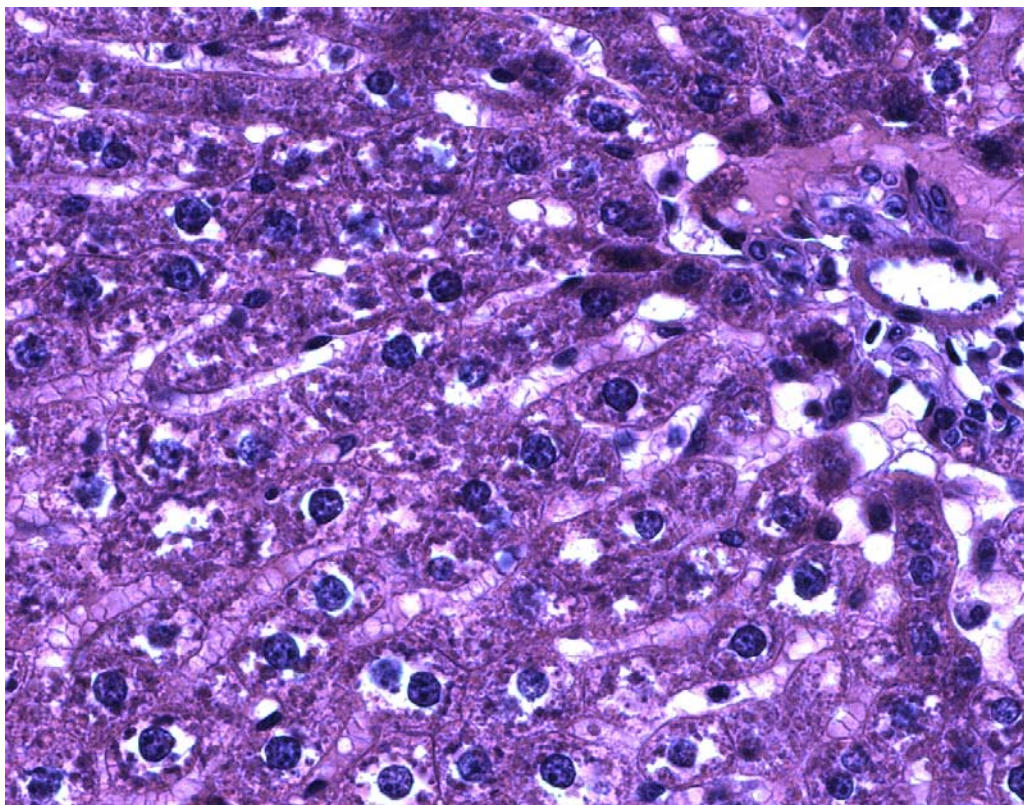
Na hranici korové a dřevové části jsme pozorovali výrazné překrvení intersticiálních cév (obr.13). Dřevová část nefronu byla bez patologického nálezu.

Při barvení technikou PAS jsme pozorovali pozitivní reakci na přítomnost glykogenu především v kortikální části tubulárního systému. Pozitivita byla výrazná na lumenální straně tubulů (obr.14).

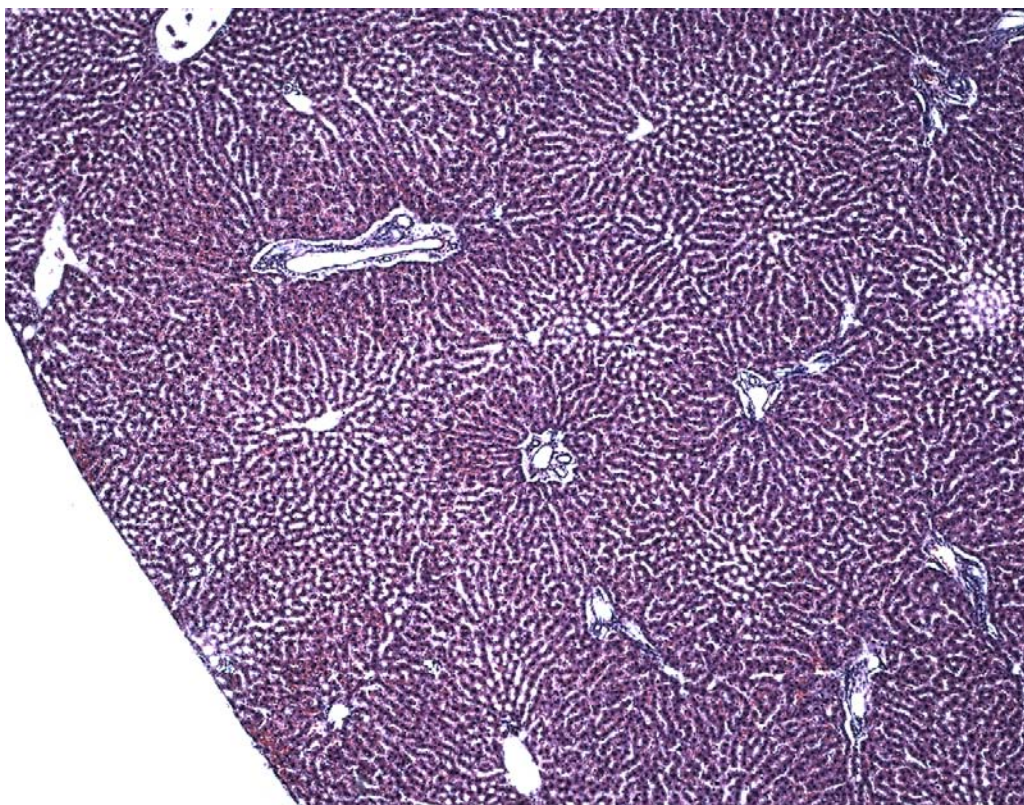
### **LA1 (opakované podání Lf v dávce 3x 20mg/kg)**

Při menším zvětšení jsme v korové části ledvin pozorovali viditelné překrvení kapilár glomerulů. Zúžení štěrbinu nacházející se pod epitelem Bowmanova pouzdra bylo podobné jako u LA7 (obr.15). Na detailu je dobře viditelné utlačení štěrbinu pod epitelem Bowmanova pouzdra (obr.16).

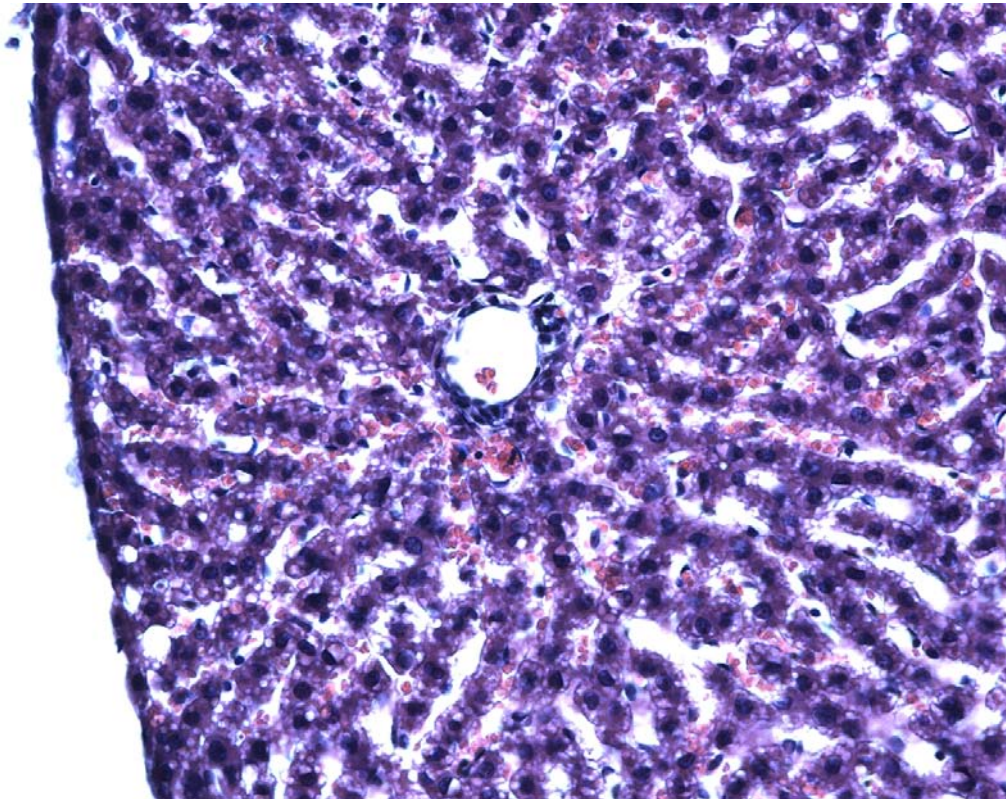
V tubulárním systému jsme pozorovali mírné zduření epiteliální výstelky proximálních tubulů s tendencí rozpadu apikálního úseku. V distálních tubulech byla mírná vakuolizace (obr.17). Vakuolizace je lépe patrná u preparátů barvených technikou Weigert- van Gieson (obr.18).



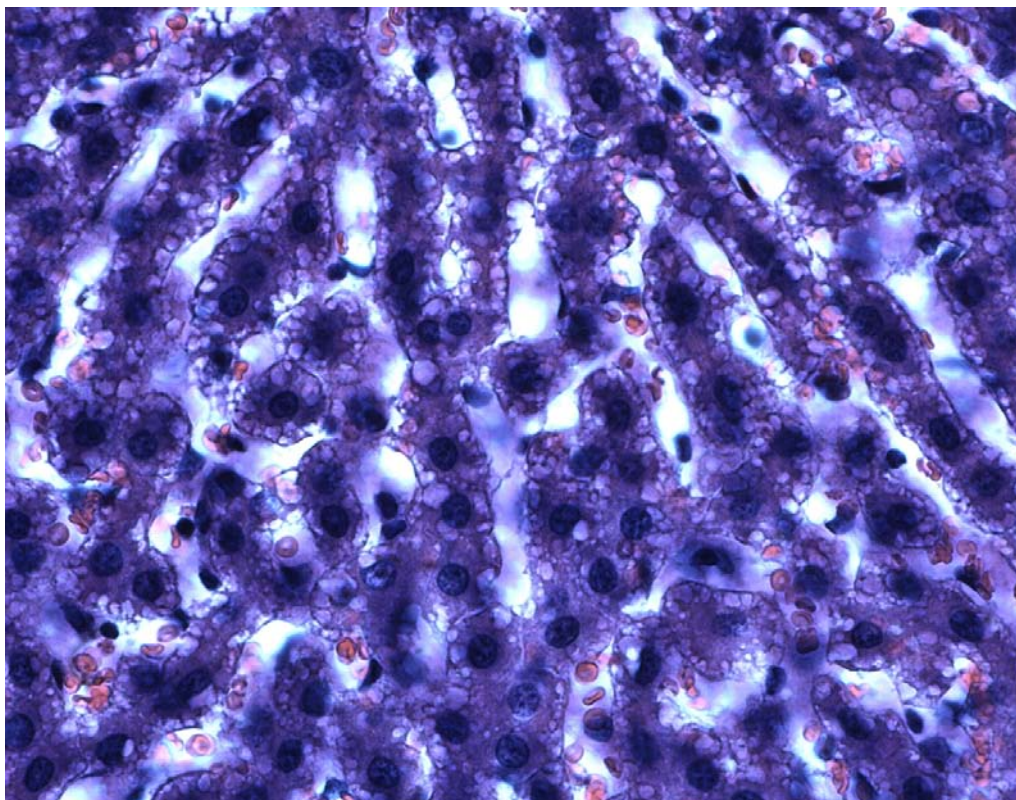
Obr.3 – KONTROLA - fyziologická játra - barvení H-E, zv. 400x



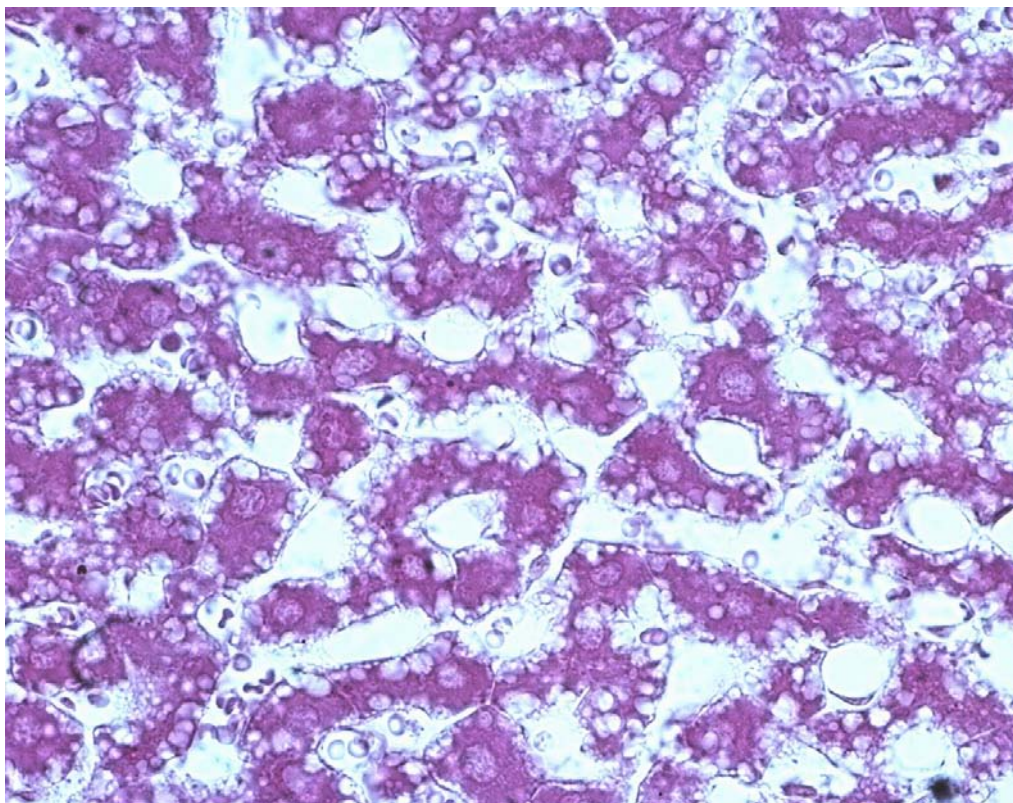
Obr.4 – LA7 – játra (přehledný průřez) - barvení H-E, zv. 40x



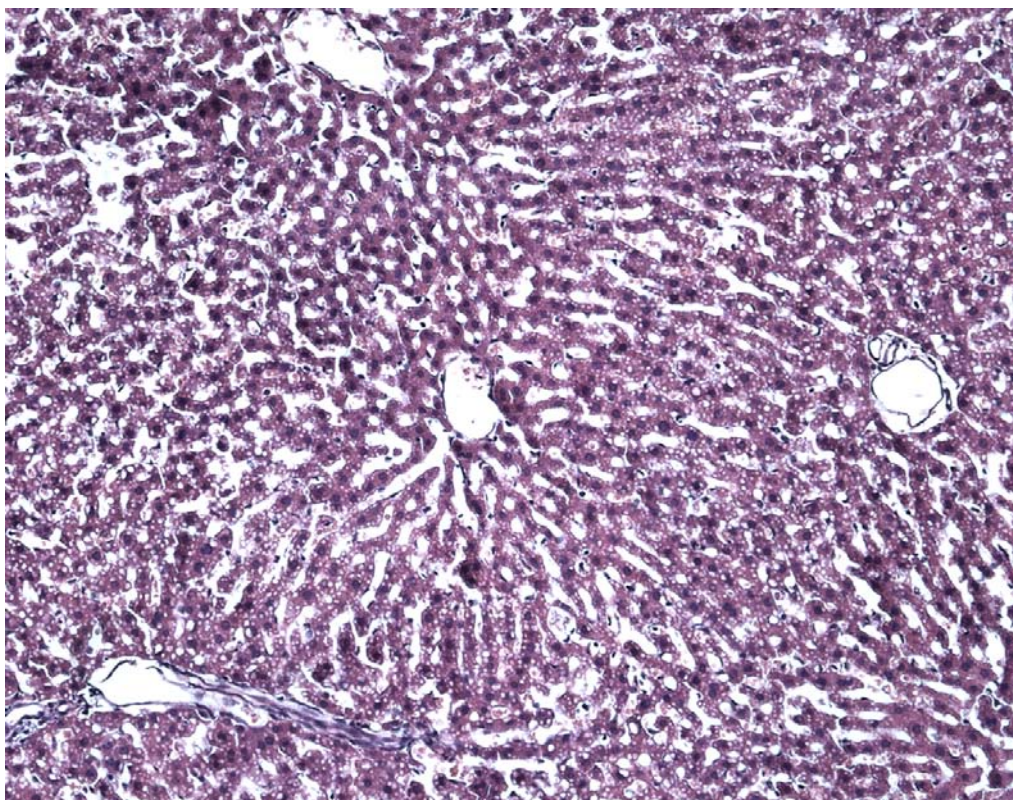
Obr.5 – LA7 – játra (větší zvětšení) – barvení H-E, zv. 200x



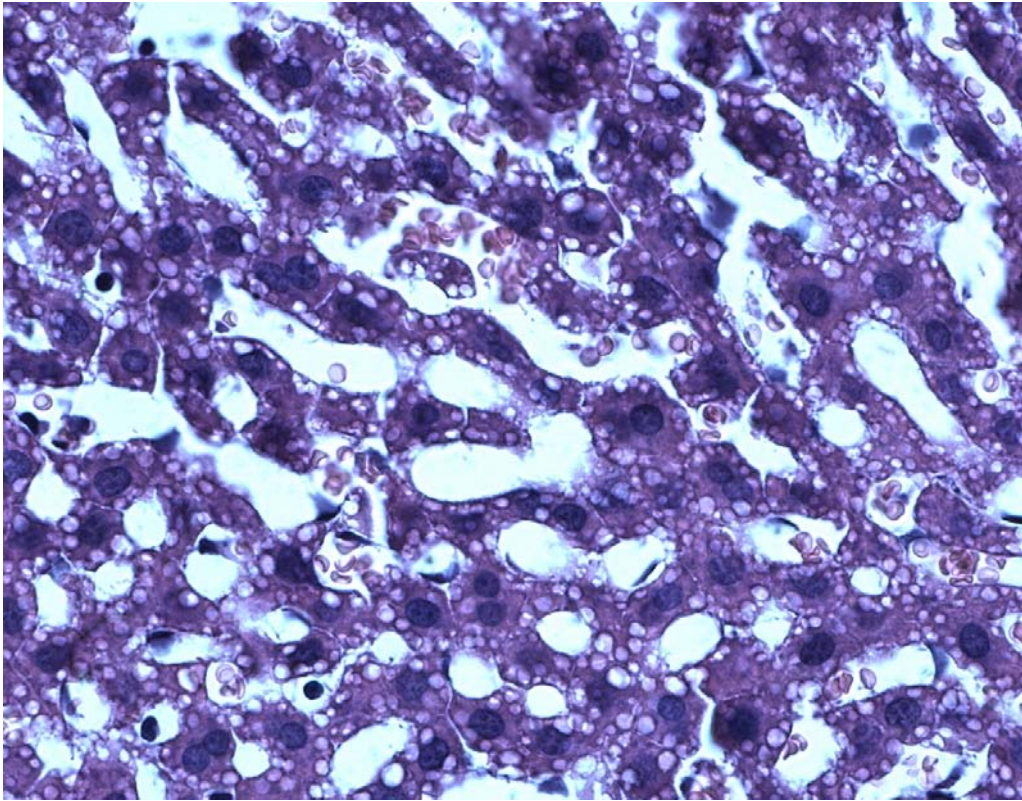
Obr.6 – LA7 – játra (detailní zobrazení) – barvení H-E, zv. 400x



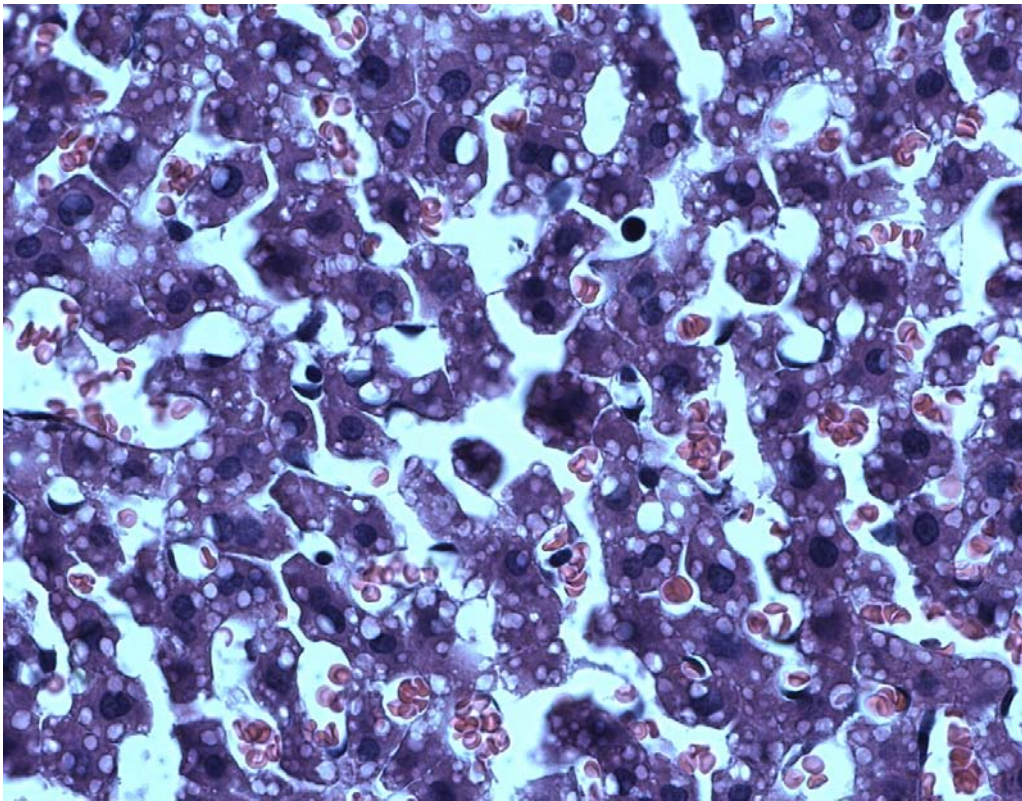
Obr.7 – LA7 – játra (depozita glykogenu) - barvení PAS, zv.400x



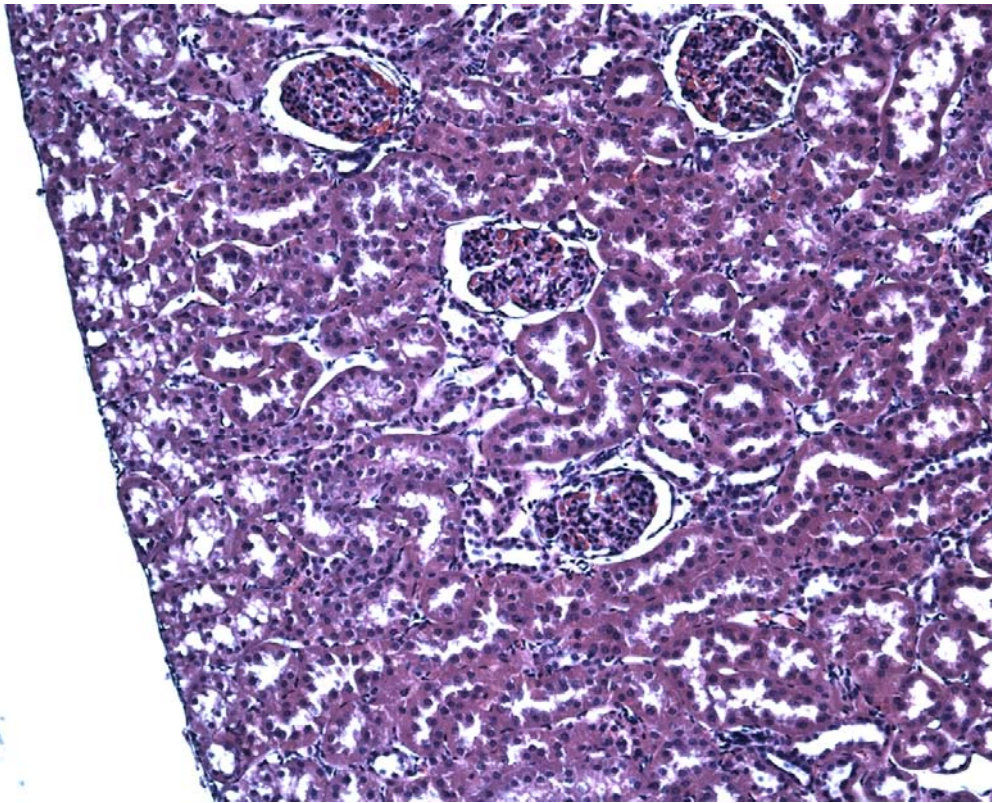
Obr.8 – LA1 – játra (přehledný průřez) – barvení H-E, zv. 100x



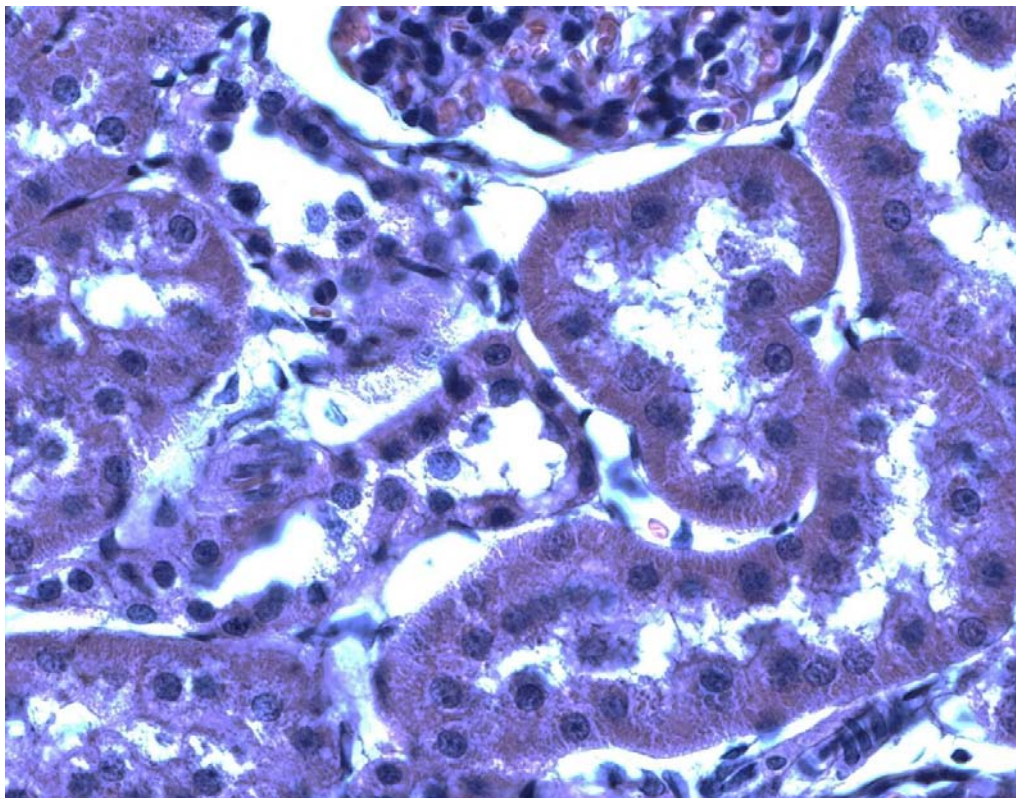
Obr.9 – LA1 – játra (detailní zobrazení) – barvení H-E, zv. 400x



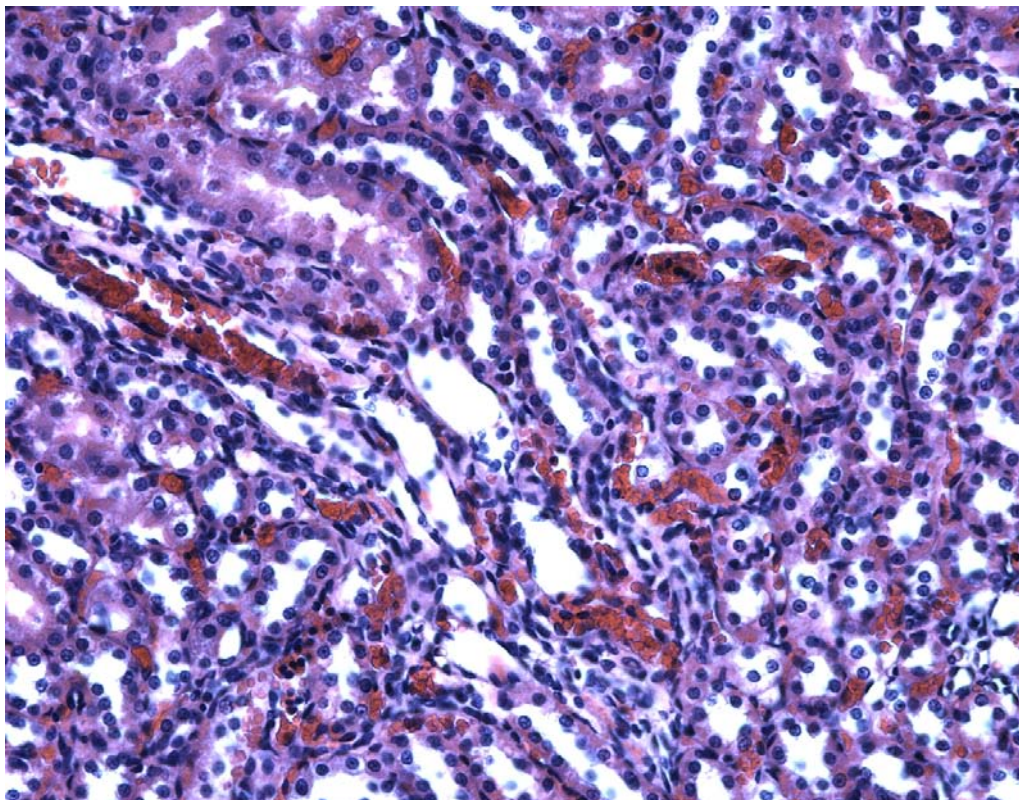
Obr.10 – LA1 – játra (detailní zobrazení) – barvení H-E, zv. 400x



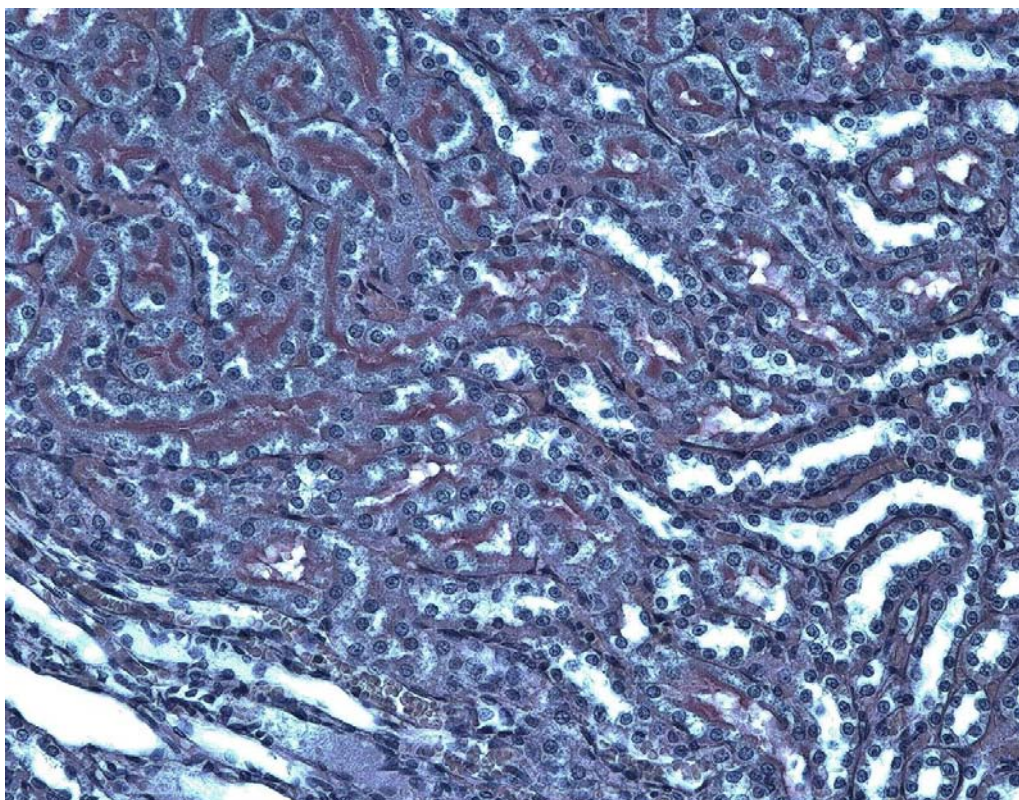
Obr.11 – LA7 – ledvina (přehled kortikální části) – barvení H-E, zv. 100x



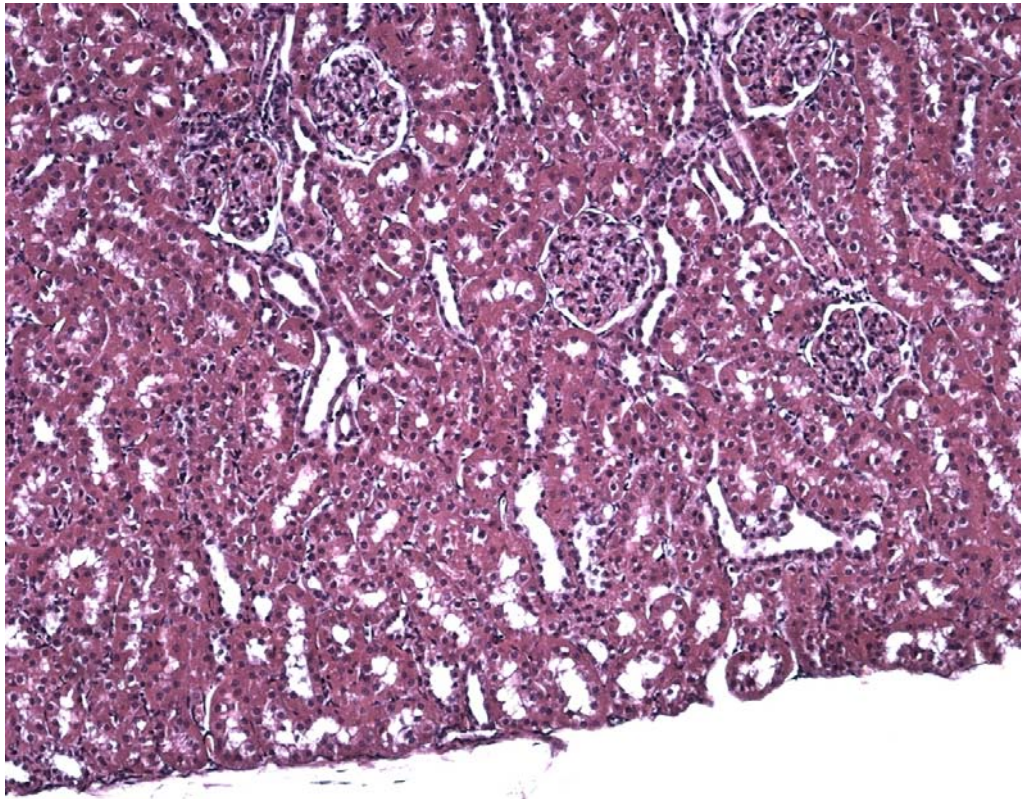
Obr.12 – LA7 – ledvina (detail tubulárního systému) – barvení H-E, zv. 400x



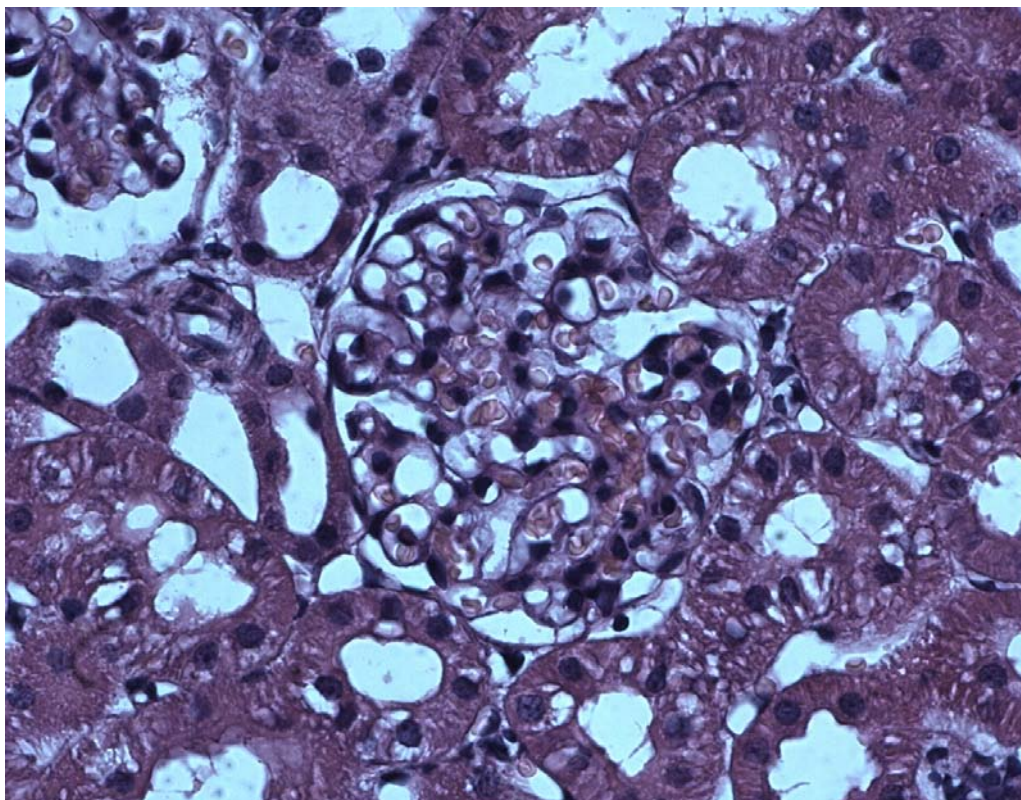
Obr.13 – LA7 – ledvina (hranice korové a dřeňové části) – barvení H-E, zv. 200x



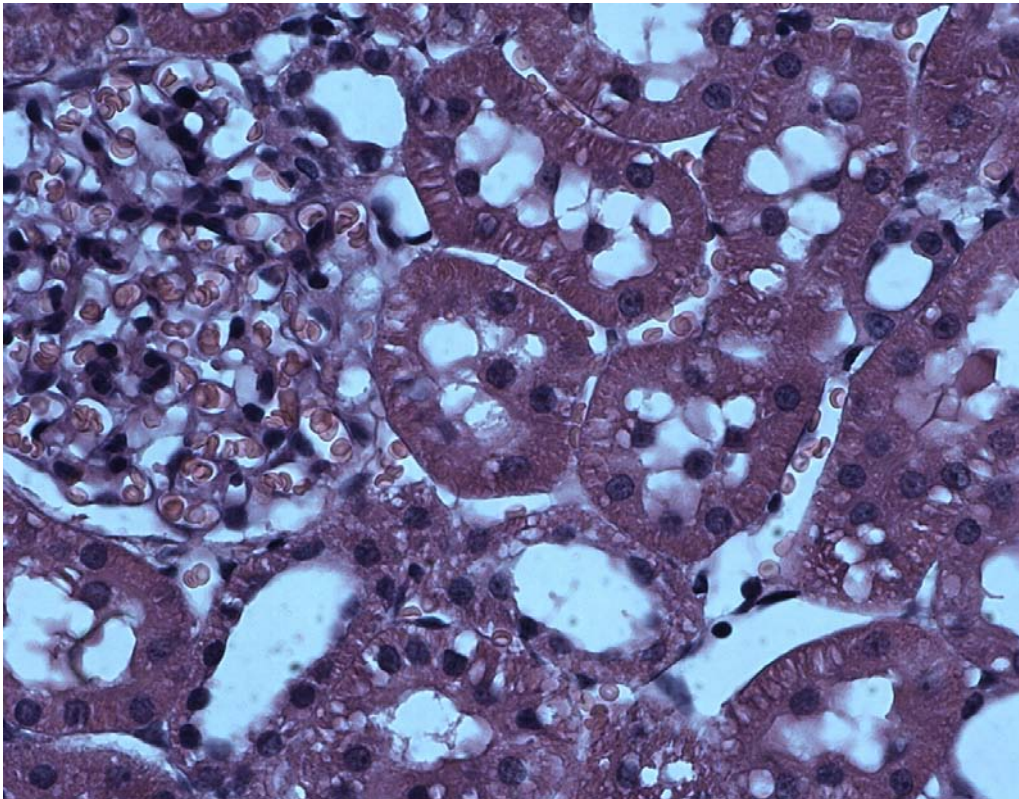
Obr.14 – LA7 – ledvina (depozita glykogenu, kortikální část) – barvení PAS, zv. 200x



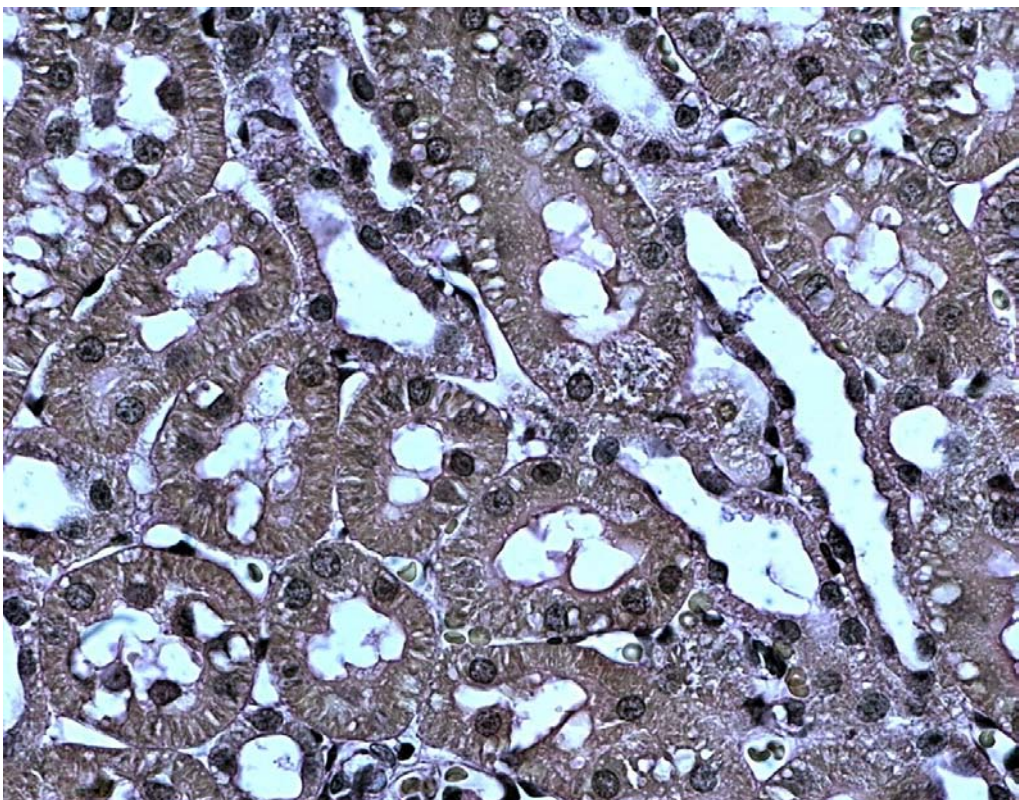
Obr.15 – LA1 – ledvina (přehled kortikální části) – barvení H-E, zv. 100x



Obr.16 – LA1 – ledvina (detail Bowmanova pouzdra) – barvení H-E, zv. 400x



Obr.17 – LA1 – ledvina (detail tubulárního systému) – barvení H-E, zv. 400x



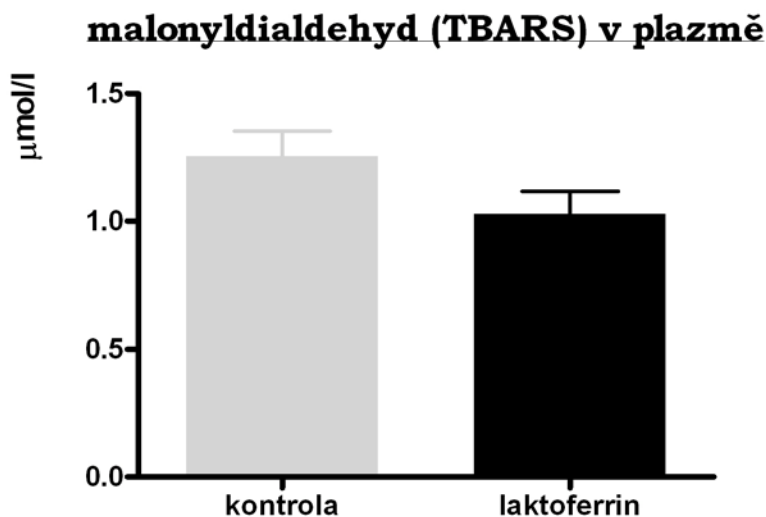
Obr.18 – LA1 – ledvina (vakuolizace v tubulech) – barvení W-G, zv. 400x

## 5.2. Zhodnocení vybraných parametrů

### Malonyldialdehyd

Malonyldialdehyd je ukazatel zvýšené peroxidace lipidů v plazmě.

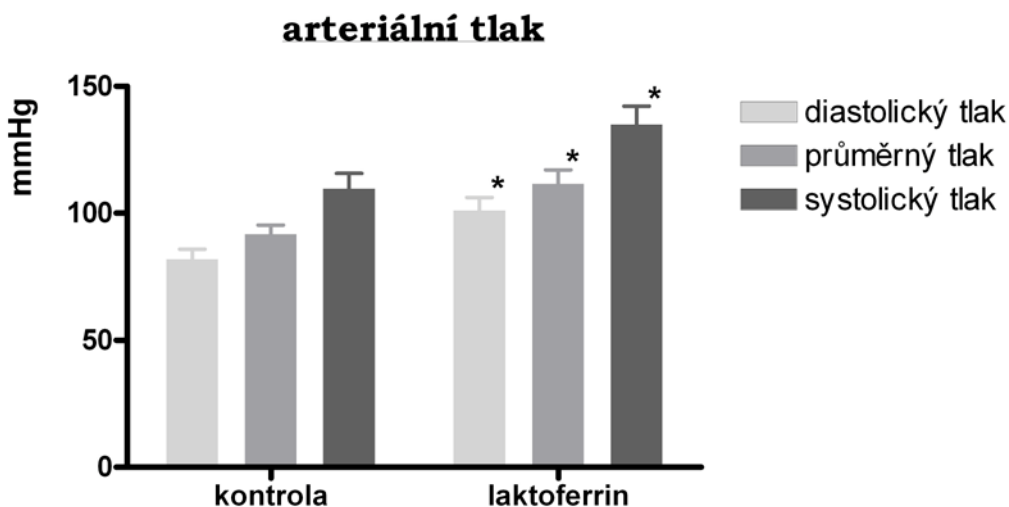
Obr.19 – graf hodnot malonyldialdehydu v plazmě u kontroly a po podání Lf



Skupina zvířat, kterým byl i.v. podán Lf (v dávce 50 mg/kg) vykazovala nižší hodnoty koncentrace malonyldialdehydu v plazmě než kontrolní skupina, které byl i.v. aplikován fyziologický roztok.

### Hodnoty arteriálního krevního tlaku

Obr.20 – graf hodnot arteriálního krevního tlaku u kontroly a po podání Lf



Došlo ke statisticky významnému nárůstu hodnot krevního tlaku u skupiny zvířat, kterým byl i.v. podán Lf oproti kontrolní skupině.

## **6. DISKUSE**

Laktoferin je protein, který se fyziologicky vyskytuje v mnoha tkáních, orgánech i tekutinách lidského těla. Ačkoliv je intenzivně studován, není jeho funkce v organismu zcela objasněná. (6)

Lf má 260x vyšší afinitu k železu než transferin. Většina jeho účinků je spojována se schopností vázat železo. Železo se uplatňuje jako katalyzátor reakcí, při kterých vznikají reaktivní kyslíkové radikály. Tím, že je Lf schopen chelatovat trojmocné železo, zamezí tvorbě reaktivních radikálů a následnému poškození organismu. Jsou však popsány i účinky na železe nezávislé. V současné době je Lf studován vzhledem k jeho imunomodulačnímu a antibakteriálnímu působení. (6,20)

V naší práci jsme se zaměřili na studium biologického účinku Lf. Sledovali jsme vliv na histologii jater a ledvin u potkanů, kterým byl Lf podán i.v. . Fyziologicky se Lf dostává do těla p.o., proto je volba i.v. podání atypická. Zvolili jsme ji kvůli detailnějšímu prostudování biologické aktivity. Tato oblast není zatím v literatuře podrobněji popsána.

Pro studium biologického účinku jsme zvolili dva modely podávání Lf. U prvního modelu byl Lf podán jednorázově v dávce 50 mg/kg (LA7). Druhému byl Lf podáván opakovaně po tři dny (20 mg/kg po 24 hod) (LA1). Po ukončení pokusu jsme orgány podrobili histopatologickému vyšetření.

Výrazné nálezy jsme pozorovali v jaterní tkáni. Některé patologie se vyskytovaly shodně u obou sledovaných modelů. Jednalo se o rozšířené jaterní sinusoidy, výskyt dvojjaderných buněk, zmnožení chromatinu v jádře a aktivaci Kupfferových buněk. Zmnožení chromatinu bylo patrně způsobeno zvýšenou proteosyntetickou aktivitou. D. Legrand et al. uvádí, že Lf je schopen působit jako signální molekula v buňce. Jeho vazba na povrch buňky spouští diferenciaci, proliferaci a aktivaci (10). Aktivace makrofágů mohla být způsobena imunitní reakcí organismu. Bílkovinná struktura Lf má antigenní charakter. Je známo, že po i.v. aplikaci je převážné množství Lf (92.8 +/- 9.5 %) do 5 min vychytáváno játry (14). D. Legrand et al. uvádí, že Lf sám může aktivovat makrofágy (10). Tato fakta vysvětlují masivní aktivaci makrofágů v játrech. U modelu LA7 jsme pozorovali výraznou pěnivost cytoplazmy hepatocytů na periférii buněk způsobenou zřejmě osmotickými vlivy. Podobný nález avšak v menším měřítku se

vyskytoval i u modelu LA1. To ukazuje, že vícedávkový interval podávání Lf je v tomto ohledu šetrnější.

Při histologickém zhodnocení struktury ledvin jsme rovněž odhalili některé patologické nálezy. U obou sledovaných modelů jsme shodně pozorovali překrvené glomeruly a zúžení prostoru mezi glomerulem a Bowmanovým pouzdem. Tyto nálezy by se mohly podílet na zhoršení činnosti ledvin a vést např. k hematurii. Nápadně eosinofilní cytoplazma v distálních tubulech kortikálních nefronů u LA7 může být rovněž důsledkem aktivace imunitního systému. Překrvení na hranici korové a dřevové části vzniklo pravděpodobně při odběru a fixaci.

Srovnání koncentrace malonyldialdehydu v plazmě u kontrolní skupiny a u jedinců, kterým byl podáván Lf ukázalo, že Lf je schopen snižovat lipidovou peroxidaci. Toto snížení však není statisticky významné a je ve vztahu ke zdravému jedinci. Nielsen et al. uvádí ve svém článku, že Lf je díky schopnosti chelátovat železo schopen potlačit lipidovou peroxidaci u potravin obsahujících vysoce nenasycené mastné kyseliny (22). Ke zvýšení krevního tlaku u skupiny, které byl podáván Lf došlo z neznámého důvodu. Domníváme se že to bylo způsobeno zvýšenou cévní rezistencí. Samotný Lf je po i.v. podání odbourán do 2 minut, proto se na tomto procesu nemohl významně podílet.

V naší studii jsme podávali Lf pouze i.v. v nefyziologických dávkách a v krátkém dávkovacím intervalu. Zjištění výrazných patologických nálezů by mohlo být podnětem pro další studium vlivu Lf na histologickou strukturu a funkci jednotlivých orgánů. Již dříve bylo zjištěno, že dlouhodobé p.o. podávání Lf hraje důležitou roli v ovlivnění imunity a může preventivně působit při vzniku tumoru a metastáz (8,9). Proto by bylo vhodné studium vlivu Lf podávaného p.o. .

## **7. ZÁVĚR**

V teoretické části diplomové práce jsme zpracovali současné vědecké poznatky o struktuře, vlastnostech, účincích a využití laktoferinu. Dále jsme shromáždili údaje o vzniku reaktivních kyslíkových radikálů, jejich negativním působení na organismus a uplatnění železa při jejich vzniku.

Provedli jsme experiment, při němž jsme podávali i.v. Lf ve dvou dávkových schématech. Jednorázově a opakovaně po tři dny. Odebrané orgány byly podrobeny histopatologickému vyšetření. Výsledky jsme zdokumentovali a vyhodnotili. Po i.v. podání laktoferinu u potkana došlo k výraznému poškození histologické struktury jater i ledvin. Současně byla provedena studie vlivu Lf na koncentraci malonyldialdehydu a na hodnoty krevního tlaku. U jedinců, kterým byl podáván Lf došlo k poklesu koncentrace malonyldialdehydu v plazmě a k vzestupu hodnot krevního tlaku.

Tato práce by mohla být využita při dalším studiu biologické aktivity Lf. Zejména by bylo vhodné stanovit jeho účinky při dlouhodobém p.o. podávání v různých dávkovacích intervalech

## SUMMARY

Lactoferrin is an 80-kDa iron-binding glykoprotein. It shares a high degree of homology at amino acid sequence level and also the three dimensional conformation level with transferrin. Both proteins are classified in the family of iron-binding glykoproteins, named transferrin family. Affinity of Lf to iron is about 260times higher than that of transferrin. (1) Lf is present physiologically in exocrine secretions, eg. tears, saliva, milk, sinovial fluid, seminal fluid and in the secondary granules of neutrophils. (6) The precise function of Lf in organism is considered to be very complex and is still a hot subject of scientific disputation. Lf was documented to act as antimicrobial, antiinflammatory and antitumoral agent. (15,17) Another of its properties is ability to inhibit hydroxyl radical formation via Fenton reaction. (20) Because of good technological properties and its physiological occurrence Lf can be used as a therapeutical agent.(6)

In our experiment we studied the influence of Lf on macroscopical and histological features in liver and kidney of the sewer-rat. We used two-dose model of i.v. Lf ( 50mg/kg in one dose and 3x 20 mg/kg in three days). The tissues of both models were used for histopatological analysis. We observed significant pathological changes in kidney and liver after i.v. application of Lf. Second experiment we made in cooperation with the Chair of pharmacology and toxikology. We studied the influence of Lf on concentration of malonyldialdehyd ( marker of lipid peroxidation ) in plasma and on arterial blood pressure. We observed increase of the arterial blood pressure and decrease of the concentration of malonyldialdehyd after i.v. application of Lf.

The results of our work can be usefull for the study of biological activity of Lf. There are only little information about the influence of i.v. Lf on histological structure of tissues in literature. Our experiment was under the grant GA UK 94/2006/C/Faf.

## **8. LITERATURA**

1. BAKER H. M, BAKER E.N.: Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *BioMetals* 2004; 17: 209-216
2. KANYSHKOVA T.G., BABINA S.E., SEMENOV D.V., ISAEVA N., VLASSOV A. V., NEUSTROF K.N., BUNEVA V.N., NEVINSKY G.: Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin. *Eur. J.Biochem.* 2003; 270: 3353-3361
3. ABDALLAH F. B., EL HAGE CHANINE J. M. : Transferrins: iron release from lactoferrin. *J. Mol. Biol.* 2000; 303: 255-266
4. VOGEL J.H., SCHIBLI J.D., JING W., LOHMEIER-VOGEL E.M., EPAND R.F., EPAND R.M.: Towards a structure- function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine- containing peptides. *Biochem. Cell Biol.* 2002; 80: 49-63
5. NAGASAKO Y., SAITO H., TAMURA Y., SHIMAMURA S., TOMITA M. : Iron binding properties of bovin lactoferrin in iron rich solution. *J Dairy Sci* 1993; 76: 1876-1881
6. STEIJNS J.M.,VAN HOOIJDONK A.C.M. : Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition* 2000; 84 Suppl 1: S11-S17
7. MASON D.Y., TAILOR C.R.: Distribution of transferrin, ferritin and lactoferrin in human tissues. *Journal of Clinical Pathology* 1978; 31: 316-327
8. TERAGUCHI S., WAKABAYASHI H., KUWATA H., YAMAUCHI K., TAMURA Y.: Protection against infections by oral lactoferrin: Evaluation in animal models. *BioMetals* 2004; 17: 231-234
9. BROCK J.H. : The physiology of lactoferrin. *Biochem. Cell Biol.* 2002; 80:1-6

10. LEGRAND D., ELASS E., CARPENTIER M., MAZURIER J.: Lactoferrin: A modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005; 62: 2549-2559
11. IYER S., LÖNNERDAL B.: Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *European Journal of Clinical Nutrition* 1993; 47: 232-241
12. LOPEZ V., SUZUKI Y. A., LÖNNERDAL B.: Ontogenic changes in lactoferrin receptor and DMT1 in mouse small intestine: implications for iron absorption during early life. *Biochem. Cell Biol.* 2006; 84: 337-344
13. KITAGAWA H., YOSHIZAWA Y., YOKOYAMA T., TAKEUCHI T., TALUKDER M.J.R., SHIMIZU H., ANDO K., HARADA E.: Absorption of bovine lactoferrin from the intestinal lumen into the systemic circulation via the portal vein and the mesenteric lymphatics in growing pigs. *J.Vet.Met.Sci.* 2003; 65 (5): 567-572
14. ZIERE G.J., VAN DIJK M.C.M., BIJSTERBOSH M.K., VAN BERKEL T.J.C.: Lactoferrin uptake by the rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 1992 June; Vol. 267, No. 16: 11229-11235
15. VALENTI P., BERLUTTI F., CONTE M.P., LONGHI C., SEGANTI L.: Lactoferrin functions. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: S127-129
16. SINGH P. K.: Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. *BioMetals* 2004; 17: 267-270
17. LEGRAND D., ELASS E., PIERCE A., MAZURIER J.: Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *BioMetals* 2004; 17: 225-229

18. CONNEELY O. M.: Antiinflammatory activities of lactoferrin. Journal of the American College of Nutrition 2001; Vol. 20, No. 5: S389-S395
19. CROUCH S.P.M., SLATER K. J., FLETCHER J.: Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. Blood 1992; Vol. 80, No.1: 235-240
20. HUTCHENS T.W. ET AL.: Lactoferrin: structure and function. Plenum Press, New York 1994; 143-156
21. GRINNA L.S.: Age related changes in the lipids of the microsomal and the mitochondrial membranes of rat liver and kidney. Mech.Ageing Dev. 1977; 6: 197-205
22. NIELSEN N.S., PETERSEN A., MEIER A.S., TIMM-HEINRICH M., JACOBSEN CH.: Effects of lactoferrin, phytic acid and EDTA on oxidation in two food emulsions enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids. J. Agric. Food Chem. 2004; 52: 7690-7699
23. PÁCAL L., KAŇKOVÁ K.: Novější poznatky o metabolismu člověka a jeho poruchách. Časopis lékařů českých 2004; 1: 9-14
24. TROJAN S. A KOL.: Lékařská fyziologie, Grada, Praha, 1999, 105-109
25. ZIMECKI M., SPIEGEL K., WLASZCYK A., KUBLER A., KRUZEL M. L.: Lactoferrin increase the output of neutrophil precursors and attenuates the spontaneous production of TNF- $\alpha$  and IL-6 by peripheral blood cells. Arch immunol Ther Exp (Warsz.) 1999; 47 (2): 113-118