

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

**STUDIUM BIOCHEMICKÉHO PROFILU VLIVU  
LAKTOFERINU NA MODELU ISOPRENALINOVÉHO  
POŠKOZENÍ MYOKARDU**  
**(rigórozní práce)**

Vedoucí diplomové práce:  
Vedoucí katedry:

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.  
Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Květen, 2007

Eva Vykrutová

Děkuji panu doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při sestavování mé diplomové práce a panu Mgr. Přemyslu Mladěnkovi za spolupráci při experimentu. Pro tuto práci byly čerpány prostředky z grantu GA UK 94/2006/C/Faf. Děkuji paní laborantce Pavlíně Jabůrkové za trpělivost a pomoc při zpracovávání praktické části diplomové práce. Děkuji také všem ostatním členům katedry biologických a lékařských věd a katedry farmakologie a toxikologie, kteří se podíleli přímo na experimentu nebo vytvářeli příjemnou pracovní atmosféru.

<b>OBSAH.....</b>	3
<b>ZKRATKY.....</b>	5
<b>1. ÚVOD .....</b>	7
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	9
<b>2.1 INFARKT MYOKARDU (IM) .....</b>	10
<b>2.1.1 Definice IM.....</b>	10
<b>2.1.2 Biochemické projevy infarktu myokardu.....</b>	11
Biochemické markery.....	12
<b>2.1.3 Akutní infarkt myokardu a ischemická choroba srdeční.....</b>	19
<b>2.2 ZVÍŘECÍ MODELY .....</b>	21
<b>2.2.1 Potkan.....</b>	21
<b>2.2.2 Králík.....</b>	23
<b>2.3 REPERFÚZNÍ PARADOX .....</b>	24
<b>2.3.1 Vznik ROS .....</b>	24
<b>2.3.2 Poškození navozené reaktivními formami kyslíku .....</b>	25
<b>2.3.3 Obranné mechanismy vůči oxidačnímu stresu .....</b>	26
<b>2.3.4 Antioxidanty .....</b>	28
<b>2.3.5 Chelatační terapie.....</b>	28
1. Laktoferin (Lf).....	29
2. Deferoxamin (Desferal®; DFO).....	32
3. Deferipron (Ferriprox®).....	35
4. Dexrazoxan (ICRF 187, Cardioxane®).....	37
5. Deferasirox (Exjade®) .....	40
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	42
<b>3.1 METODICKÁ ČÁST .....</b>	43
<b>3.1.1 Provedení studie.....</b>	43
<b>3.1.2 Zvířata.....</b>	44
<b>3.1.3 Chemikálie a přístroje .....</b>	45
<b>3.1.4 Histologické zpracování .....</b>	45
Histologická barvení pro světelnou mikroskopii .....	48
Úprava materiálu pro elektronovou mikroskopii .....	54

<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>55</b>
Biochemický profil vlivu laktoperinu na modelu ISO poškození myokardu .....	56
4.1 Vliv Lf na hladinu troponinu T u ISO poškození myokardu .....	57
4.2 Vliv laktoperinu na hladinu TBARS u ISO poškození myokardu .....	59
4.3 Histologické zhodnocení .....	61
<b>5. DISKUZE .....</b>	<b>65</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>70</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>72</b>

## ZKRATKY

AIM	akutní infarkt myokardu
AK	aminokyselina
apoLf	apolaktoferin
AST	aspartátaminotransferasa
ATP	adenosintrifosfát
CK	kreatinkinasa
CK-MB	MB izoenzym kreatinkinasy
cTnT	srdeční troponin T
DFO	deferoxamin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GSH-Px	glutathionperoxidasa
HDBH	hydroxybutyrátdehydrogenasa
HIF	hypoxií indukované transkripční faktory
H-E	hematoxylin-eosin barvení
holoLf	hololaktoferin
i. p.	intraperitoneální aplikace
i.v.	intravenózní aplikace
ICHS	ischemická choroba srdeční
IM	infarkt myokardu
ISO	isoprenalin
Lf	laktoferin
LD	laktátdehydrogenasa
MDA	malonyldialdehyd
MRI	magnetická rezonance
p.o.	perorální podání
PMN	polymorfonukleární leukocyty
RIA	radioimunoanalytické stanovení
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
s.c.	subkutánní aplikace
TBA	thiobarbiturová kyselina

TBARS	látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou
Tf	transferin
TnT	troponin T
TnI	troponin I
W-G	barvení Weigertův železitý hematoxilin – Van Giesonův pikrofuchsin
zv.	zvětšení

# **1. ÚVOD**

Laktoferin je v lidském organismu přirozeně se vyskytující glykoprotein. V organismu vykazuje velké spektrum účinků a ovlivňuje množství procesů, jeho role je pravděpodobně komplexní. V současné době je studován především vzhledem k jeho imunomodulačnímu a antibakteriálnímu působení. Je také známo, že má silné železo chelatační vlastnosti. Díky této vlastnosti brání vzniku reaktivních kyslíkových radikálů.

Reakce při nichž vznikají volné kyslíkové radikály jsou katalyzovány volnými ionty železa, které jsou zvýšeně uvolňovány při ischemicko-reperfuzním poškození. K tomuto poškození dochází následkem ischémie myokardu, která je nejčastěji vyvolána okluzí koronární tepny v důsledku aterosklerózy. Vzhledem k vysoké incidenci kardiovaskulárních onemocnění v Evropě i v České republice, probíhá výzkum látek, které by mohly mít protektivní účinky na myokard. Reperfuznímu poškození myokardu může být zabráněno nebo může být alespoň zmírněno látkami, které mají schopnost chelatovat železo. Tento protektivní účinek už byl prokázán např. u deferoxaminu.

Tato rigorózní práce navazuje na diplomovou práci: Studium vlivu chelátora železa laktoferinu na model akutního infarktu myokardu (2006). Cílem naší současné studie je objasnit vliv laktoferinu na isoprenalinové poškození myokardu za pomocí biochemických markerů a histologického zhodnocení.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## **2.1 INFARKT MYOKARDU (IM)**

### ***2.1.1 Definice IM***

Infarkt myokardu (IM) je nejzávažnější formou ischemické choroby srdeční (ICHS). Je to akutní ložisková ischemická nekróza srdečního svalu vzniklá na podkladě náhlého uzávěru či progresivního extrémního zúžení věnčité tepny zásobující příslušnou oblast. Trvá-li ischemie minimálně 30 minut, dochází k nekróze tkáně tzv. infarktu. Obnova prokřvení postižené tkáně (reperfuze) je naprosto nezbytná pro zachování životnosti srdeční tkáně. Avšak obnovení krevního toku koronární artérií vede k produkci toxicích reaktivních forem kyslíku (volné kyslíkové radikály, reactive oxygen species - ROS), převážně OH<sup>-</sup>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Tento efekt je označován jako reperfuzní paradox. Tomuto procesu může být zabráněno nebo může být zmírněn přítomností antioxidantů (Masopust 2003).

### **Akutní hypoxie**

Kardiomyocyt je velmi citlivý na nedostatek kyslíku. Hlavním důsledkem ischémie je velmi rychlá změna (během několika sekund) na anaerobní metabolismus, končící potenciálně toxicí kyselinou mléčnou, snižuje se rapidně zásoba energetických fosfátů (kreatinfosfát, ATP). Neschopnost kontraktility se objeví během 60 s. Změny v ultrastrukturě se objeví do několika minut (nabobtnání mitochondrií i celé buňky, deplete glycogenu). Tyto změny jsou z počátku reverzibilní, ale po 20 – 40 minutách trvající ischémie dojde k irreverzibilní nekróze postupně všech kardiomyocytů.

Nekróza vede k vyplavení biochemických markerů (myoglobin, glycogenfosforylaza BB, vazebný protein mastných kyselin, troponin T, troponin I, kreatinkinasa-isoenzym MB, lehké i těžké řetězce myosinu, další enzymy - LD1, AST, CK). Nejprve jsou vyplaveny markery uložené volně v sarkoplasmě (myoglobin, část troponinu T), pak teprve vázané na buněčné struktury (větší část troponinu T a I, řetězce myosinu) (Masopust 2003).

## **2.1.2 Biochemické projevy infarktu myokardu**

Přechodné zvýšení aktivity biochemických markerů v séru v prvních hodinách a dnech po vzniku infarktu (u troponinu, LDH a HBDH přetrvává déle) při vyloučení jiné příčiny znamená průkaz akutního infarktu myokardu. Podle přesnosti a klinické využitelnosti: troponin (I nebo T), MB-izoenzym kreatinfosfokinasy (CK-MB) s celkovou kreatinfosfokinasou (CK), myoglobin, hydroxybutyrátdehydrogenasa (HBDH), aspartát-aminotransferasa (AST), izoenzymy laktátdehydrogenasy (LDH), aj. Nejpřesnějšími biochemickými markery infarktu jsou **troponin (T nebo I)**, **CK-MB** a **myoglobin**. Současné zvýšení troponinu i CK/CK-MB znamená zcela jistě infarkt myokardu. Zvýšení samotného troponinu (zpravidla nevelké) při normální hodnotě CK/CK-MB se nazývá minimální myokardiální léze (mikroinfarkt). Zvýšení CK-MB při normálním troponinu je zpravidla falešně pozitivní laboratorní hodnota (nebo je způsobeno jiným onemocněním) (Widimský et al. 2002).

Kromě specifických (látky z nekrotického myokardu) existují i nespecifické biochemické projevy infarktu myokardu (podle nich ale nelze infarkt diagnostikovat): přechodná hyperglykémie, zvýšení sedimentace, leukocytóza, aj.

Pro definitivní diagnózu akutního infarktu myokardu je nezbytné alespoň jednou dokumentovat zvýšení troponinu T nebo I nad normální hodnotu (není nutné dokumentovat zvýšení a pokles, elevace trvá 10 dní), alternativně lze vyšetřit CK-MB mass assay. Hodnoty troponinu stoupají velmi časně a jeho zvýšená hodnota může přetrvávat i 7 - 10 dní po nekróze myokardu. Pokud není dostupné stanovení troponinu, je doporučováno stanovení CK-MB mass. Hodnoty CK-MB musí stoupat a klesat. Celková CK má význam jen ve spojení s CK-MB: zvýšení CK-MB při infarktu tvoří více než 7% podíl z celkové hodnoty CK. Troponin se nepoužívá k diagnóze časné recidivy infarktu (v prvních 10-14 dnech). Pro tento účel je vhodnější CK-MB nebo myoglobin, které se po první atace infarktu rychleji vracejí k normě a proto lze detektovat jejich event. opětovný nárůst.

## Biochemické markery

### 1. Enzymy

#### S-Kreatinkinasa (CK)

Kreatinkinasa je enzym, který stanovujeme v séru při podezření na poškození myokardu. CK však není pro srdeční sval specifická: Zatímco myokard obsahuje 11, 3  $\mu$ kat/g, kosterní sval 53, 3  $\mu$ kat/g, mozková tkáň 3  $\mu$ kat/g a trávící ústrojí 2, 33  $\mu$ kat/g; mnohem menší obsah je v plicích (0, 21  $\mu$ kat/g), v děloze a ledvině (0, 15  $\mu$ kat/g, v játrech (0, 03  $\mu$ kat/g)).

#### Isoenzym (CK-MB)

Kreatinkinasa má tři typy isoenzymů tvořených dvěma typy podjednotek označovaných jako podjednotka M (od "muscle") a podjednotka B (od "brain"). Jednotlivé isoenzymy jsou tvořeny vždy dimerem z podjednotek M nebo B. Pro myokard je typický hybridní isoenzym CK-MB. Jeho poměrné zastoupení v myokardu je ze všech orgánů největší (42% MB, 58% MM). CK-MB je však obsažen též v kosterním svalstvu, i když v podstatně menším množství (3, 5%). Celkové množství CK-MB v kosterním svalstvu vzhledem k podílu svalové hmoty na celé hmotnosti organismu však přesahuje jeho množství v myokardu. Proto při difúzní rhabdomyolýze je zvýšení CK-MB z kosterního svalstva v krevním oběhu rovněž značné. V tom případě pro rozlišení původu z myokardu slouží index CK/CK-MB, který je při poškození myokardu vyšší než 0, 1 (10%). CK-MB je dále obsažen v trávícím ústrojí, v děloze a aortě.

Vyšetření CK-MB se provádí při podezření na infarkt myokardu (klinický obraz), není-li však výsledek EKG jednoznačný a zvýšení CK v séru hraniční a kvocient CK/AST kolem 10.

Pro rozlišení příčiny zvýšené aktivity CK-MB se používá stanovení podílu CK-MB na celkové aktivitě CK; při poškození myokardu je tento podíl 0, 06-0, 30

(6-30%) na rozdíl od vyplavení z poškozeného kosterního svalstva, kde je obvykle pod 0,06 (pod 6%).

Při IM aktivita CK-MB stoupá už po 4-6 h, maxima je dosaženo dříve než u celkové CK (za 10-20 h); normalizace u nekomplikovaných případů (pod 6 %) obvykle do 2 dnů. Přetravávání a zejména další maxima svědčí pro reinfarkty.

### S-Aspartátaminotransferasa (AST)

V myokardu je AST v relativně vysoké koncentraci; vyjádříme-li poměr katalytické koncentrace v tkáni vůči katalytické koncentraci v krevním séru, pak pro myokard je to 8 000 , pro játra 7 000, plíce 500, erytrocyty 50. V krevní plazmě převažuje cytoplazmatické AST, ale mitochondriální isoenzym může při nekróze buněk velmi rychle stoupat. Při poškození myokardu nastupuje zvýšení AST v krevním séru za 4 -6 hodin po začátku ataky, dochází k 2 – 25násobnému zvýšení hladiny, maxima dosahuje za 24 - 48 hodin a k normalizaci dochází za 3-6 dní. Při IM dosahuje AST maximum za 16 - 48 h. Reinfarkt rovněž vede k dalšímu vzestupu S-AST.

### Kvocient CK/AST (Szasz)

Kosterní sval má 5 krát vyšší aktivitu CK než myokard: naproti tomu aktivita AST v myokardu a kosterním svalu je přibližně stejná. Tato skutečnost umožňuje při současném stanovení CK a AST v séru zachytit infarkt myokardu s pravděpodobností 90%. Při IM je CK/AST 5 – 6 (< 10).

### S-Laktátdehydrogenasa (LD)

LD je cytosolový enzym, který se vyskytuje v řadě orgánů (ledvina, myokard, kosterní svalstvo, pankreas, játra, plíce a další). Na celkové aktivitě v plazmě se podílí pět isoenzymů (LD<sub>1</sub> až LD<sub>5</sub>) tvořených vždy čtyřmi podjednotkami (tetramer) dvou typů: H (od *heart*) a M (od *muscle*). Pro myokard je charakteristický isoenzym LD<sub>1</sub> (H<sub>4</sub>) a isoenzym LD<sub>2</sub> (H<sub>3</sub>M<sub>1</sub>). Poločas eliminace LD<sub>1</sub> z plazmy je 10 ± 2 hodiny.

Při IM dochází ke zvýšení S-LD 2 – 8krát. Nastupuje za 6 - 12 h po atace, maxima dosahuje za 24-60 h; návrat do normálních hladin proběhne za 7-5 dní. Stanovení LD je vhodné pro rozpoznání IM po 5 dnech, kdy zvýšená aktivita CK a AST je už normalizována. Reinfarkt má za následek rovněž vzestup LD (později než CK a AST). Náhlá srdeční nedostatečnost se projeví též vzestupem LD.

#### S-Hydroxybutyrátdehydrogenasa (HBD)

HBD je totožná s isoenzymy LD<sub>1</sub> a LD<sub>2</sub>. V plazmě zdravých jedinců převažuje frakce LD<sub>2</sub>; u infarktu myokardu však stoupá rychleji LD<sub>1</sub>, která je pro myokard specifičtější (LD<sub>1</sub>>LD<sub>2</sub>).

Při IM začíná vzestup HBD 6 - 12 h po začátku záchvatu, vrcholí ze všech enzymů nejpozději (za 30-72 h), ale i déle přetrvává (normalizace za 10-21 dní).

## **2. Neenzymové testy**

### **S-Myoglobin (S-Mb)**

Pomocí citlivých metodik (RIA , imunonefelometrie, imunoturbidimetrie, latexový test) lze prokázat i nízké koncentrace svalového myoglobinu uvolněného do krevního oběhu. Zvýšení ukazuje na menší nebo větší rhabdomyolyzu. Stanovení myoglobinu v séru není sice specifické pro poškození myokardu, ale je to marker, jehož patologické zvýšení se objevuje už za 2 hod po atace.

Myoglobin je hemoprotein o molekulové hmotnosti 17 800 přítomný jak v myokardu tak v kosterním svalstvu, lokalizovaný v cytoplasmě. Proto se při poškození svalové buňky dostává rychle do intersticia a odtud do krevní cirkulace. Patologické zvýšení se objevuje mezi 2. - 4. hodinou po atace, vrcholí mezi 8. - 10. hod a k normě se vrací za 14. - 18. hod

Zvýšené hodnoty se objevují za 1,5 - 4 hod (průměr: 3 hod) po začátku ataky AIM. Maxima dosahuje za 3 - 5 hod (průměrně za 4 hod).

Nástup zvýšení je rychlejší než u CK nebo CK-MB), dochází k 100 – 3000násobnému zvýšení hladiny, vrcholí 12 hod před maximem aktivity CK-MB; u nekomplikovaných případů rychle odeznívá.

### **CK-MB<sub>mass</sub> (=hmotnost)**

Jde o stanovení CK-MB jako protein; tedy katalyticky aktivní i katalyticky inaktivní formy enzymu. Proto má toto stanovení větší specifitu i větší senzitivitu pro poškození myokardu než stanovení katalytické koncentrace. CK-MB<sub>mass</sub> se zvyšuje u AMI o 1-2 hodiny dříve než je tomu při měření aktivity.

### Troponin T

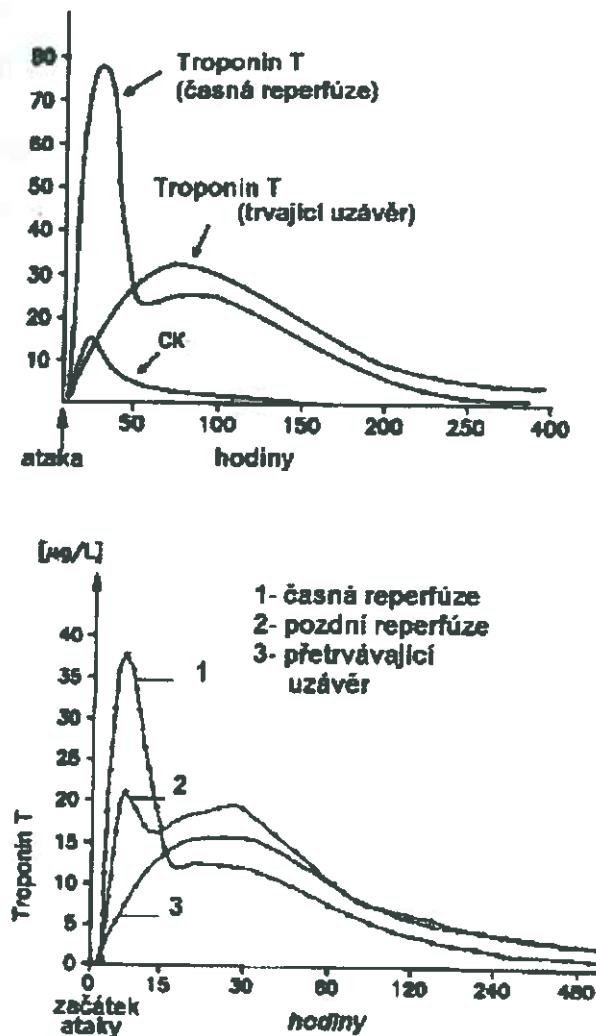
Troponiny jsou malé proteinové molekuly, které jsou nezbytné pro regulaci skeletální a kardiální svalové kontrakce. Troponin T (TnT) o molekulové hmotnosti 39 000 zprostředkuje vazbu troponinového komplexu s molekulami tropomyosinu (Masopust 1998). Existují určité rozdíly v molekule mezi TnT z myokardu a TnT z kosterních svalů, což umožňuje specifické imunochemické stanovení pouze TnT z myokardu (Babuin et al. 2005). V myokardu se nalézá část "volného" troponinu v sarkoplasmě, která se při poškození myokardu rychle vyplavuje do krevní cirkulace (za 3 - 6 hod), což je použitelné pro časnou diagnostiku AIM nebo jiného akutního poškození myokardu, druhá větší část (95%) je vázána na kontraktinové proteiny; tato se vyplavuje později (během 4 dnů po atace) a slouží pro diagnostiku AIM i po několika dnech, kdy ostatní biochemické markery se už normalizovaly (diagnostika tzv. němého infarktu). Toto bifazické vyplavení umožňuje též posouzení úspěšnosti reperfúze. Přetrvávající uvolňování strukturálně vázaného TnT z myokardu do cirkulace (t. j. 10 dní i více a dosahující hodnot až 40 µg/l) je způsobeno vyplavováním z nekrrotického ložiska a odpovídá postupujícímu "čištění" poškozeného myokardu a je součástí normálního hojícího se procesu.

Fyziologické hodnoty cTnT v krevní cirkulaci jsou velmi nízké (0,00002 µg/l), takže jsou daleko pod mezí detekovatelnosti současných metod. Znamená to, že každé měřitelné zvýšení cTnT je patologické a znamená poškození (nekrózu myokardu). Hodnota "cut-off" pro diagnózu akutního infarktu myokardu je v současné době udávána mnohem níže než dříve, pro stanovení cTnT je to hodnota 0,03 g/l.

### AIM s reperfúzí a AIM bez reperfúze

U pacientů s časnou reperfuzí (do 3, 5 hod po začátku ataky) je maximální vzestup TnT v séru za 14 hod, u pozdní reperfuze (po 3, 5 hod) je mnohem později, stejně jako u přetrvávajícího uzávěru. Hodnota indexu 1/38 (maximální hodnota/hodnota za 38 hod po atace) převyšující 1, 42 a hodnota indexu 14/38 převyšující 1, 09 svědčí pro úspěšnou reperfuzi (s pravděpodobností 95%) do 5, 8 hod po začátku ataky. Pro reperfuzi 5-8 hod resp. pro přetrvávající obstrukci mluví hodnoty pod 0, 99, resp. pod 0, 84.

Obr. č. 1 – časový průběh uvolnění troponinu T při AIM (Masopust 1998)



### Troponin I

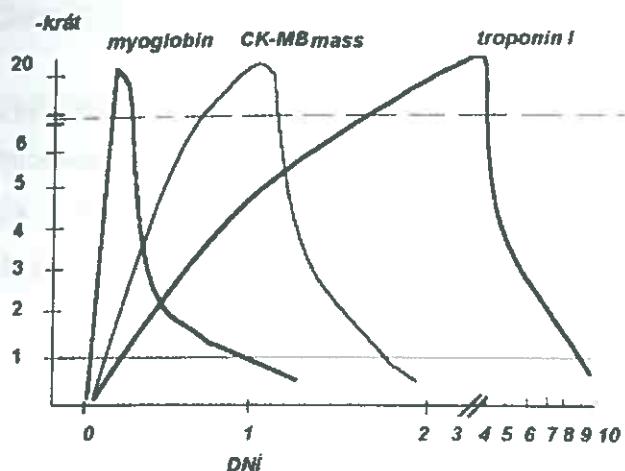
Je pokládán za specifitější než TnT pro poškození myokardu. (Není tvořen fetálními buňkami kosterního svalstva jako TnT). Nebylo nalezeno zvýšení u polymyositidy/dermatomyositidy ani u akutní rhabdomyolyzy, renálního selhání, dále ani u polytraumat (pokud nebyl zasažen myokard), ani u sportovců po extrémní tělesné zátěži. Díky vysoké odlišnosti této isoformy od jiných, (až ze 45%) v sekvenci aminokyselin, je možné vysoce specifické vyšetření pomocí monoklonálních protilátek. Jeho koncentrace v myokardu je asi 13krát vyšší (na gram tkáně) než CK-MB. Má též cytoplasmatickou frakci - asi 3-5% celkového množství, což jsou 4 mg/g vlnké tkáně. V krevní plasmě se vyskytuje v komplexu s TnC. Volná frakce TnI je velmi adhezivní a přilne snadno na povrch skla i umělé hmoty.

Na rozdíl od TnT nedochází u TnI k druhému maximu po několika dnech. Jinak je průběh u AMI podobný průběhu TnT, pouze vrchoł dosahuje o něco dříve (mezi 9 - 17, 6 hod, medián=15, 5 hod), také vrcholová hodnota po úspěšné reperfuzi nastupuje dříve (Masopust 1998).

### **2.1.3 Akutní infarkt myokardu a ischemická choroba srdeční**

V současné době biochemickým markerem AIM je naměřené zvýšení troponin T (případně I) (viz výše), které je pro poškození myokardu specifické, a dále stanovení myoglobinu, které sice není specifické, ale časnější než cTnT.

Obr.č.2 : Typický průběh hladin myoglobinu, CK-MB<sub>mass</sub> a troponinu I u AIM (Masopust 1998)



V současné době je nahrazováno stanovení katalytické koncentrace "srdečních" enzymů stanovením hmotnostní koncentrace proteinu CK-MB (CK-MB<sub>mass</sub>) a specifického myokardiálního troponinu T nebo I. a myoglobinu (nebo lépe glycogenfosforylase BB).

Stanovení S-myoglobinu je vhodné jednak pro časnou diagnózu (vzestup začíná za 1, 5-3 hod) jednak pro monitorování terapie trombolytiky. Reperfuz se projeví časným vyplavením látek z nekrotického ložiska (v průměru maximum 4, 8 hodiny po začátku symptomů), na rozdíl od pozdějšího maxima (obvykle 13 hodin) při neúspěšné reperfuzi.

#### **Odhad rozsahu infarktu myokardu (velikosti nekrotického ložiska) výpočtem z hodnot S-CK (nebo S-CK-MB)**

Odhad rozsahu velikosti nekrotického ložiska srdečního svalu lze provést pomocí matematické rovnice na základě sériových stanovení katalytické koncentrace myokardiálních nitrobuněčných enzymů, které jsou vyplavovány do krevního oběhu (především CK nebo lépe CK-MB).

Vychází se z předpokladu, že změny katalytické koncentrace těchto enzymů v krvi, sledované v časových intervalech po začátku záchvatu, závisejí jednak na rychlosti jejich uvolňování z postiženého myokardu, jednak na rychlosti jejich odstraňování z krevního oběhu. Předpokládá se, že matematická funkce eliminace myokardiálních enzymů z krevního oběhu má monoexponenciální charakter (i když se objevily i studie s tzv. "gama-exponenciálním" modelem - Danner et al. ).

**Velikost nekrotického ložiska myokardu (IS)** se vyjadřuje jako "gramekvivalent CK", to je množství tkáně, z které se vyplavilo takové množství CK, které odpovídá 1 g myokardu postiženého homogenní nekrózou (Masopust 1998).

## **2.2 ZVÍŘECÍ MODELY**

Vzhledem ke stoupající incidenci a mortalitě kardiovaskulárních onemocnění probíhá na celém světě velké množství studií, které se zabývají tímto fenoménem. V současnosti jsou používány různé zvířecí modely, přičemž každý druh má svá specifika. Nejčastěji používaným pokusným zvířetem je potkan.

### **2.2.1 Potkan**

Tento model je hojně využíván při farmakologických studiích díky relativně malému ekonomickému zatížení a rychlé produkci nových zvířat.

Ve srovnání s lidským srdcem tu jsou ale určité rozdíly v funkcích myokardu.

- a) potkaní myokard má velmi krátký akční potenciál s normální lack a plateau fází
- b) Odstranění  $\text{Ca}^{2+}$  z cytosolu je predominantně zajišťováno aktivitou kalciové pumpy sarkoplasmatického retikula, zatímco aktivita  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníku je mnohem méně důležitá.
- c) V normálním potkaním srdečním převládají isoformy těžko – řetězcového  $\alpha$ -myosinu a posun do  $\beta$ -myosinových isoform s hemodynamickými a hormonálními změnami (Hasenfuss 1998).

### **Isoprenalinový model IM**

Tento model je relativně málo nákladný, umožňuje využití velkého množství vzorků v krátkém čase, velikost nekrosy myokardu je závislá na podané dávce isoprenalinu.

Při IM u člověka dochází k velmi podobnému stavu jako po exogenním podání katecholaminů, kdy také dochází ke zřetelnému poškození funkcí kardiovaskulárního systému. Isoprenalin je syntetický katecholamin, který představuje vhodný model pro studium IM a také látek působících proti ROS navozenému ischemicko-reperfuznímu poškození, jelikož katecholaminy se samy o sobě podílejí na vzniku ROS. Nabízí přístup k histopatologickému

vyšetření, hodnocení funkčních parametrů, ale i měření biochemických parametrů (zejména troponinů).

Modelovým zvířatům je podán isoprenalin s.c. v dávce 25 – 100 mg/kg. Za 24 h po aplikaci se měří funkční parametry. V celkové anestezii se provádí měření srdečního výdeje a odvozených parametrů, transpulmonární měření změn teploty krve a získané údaje slouží k vytvoření termodiluční křivky.

Po podání isoprenalinu dochází k výraznému snížení srdečního výdeje a tepového objemu. Naopak srdeční frekvence se rychle zvyšuje. Dochází rovněž k poklesu srdečního výkonu. Roste parametr srdeční spotřeby kyslíku myokardem. Je zřetelné i uvolnění biologických markerů infarktu, tak jako je tomu u člověka. Především signifikantní uvolnění troponinu T svědčí o poškození vlivem ischémie. Současně dochází k výraznému nárůstu obsahu kalcia v buňkách myokardu, ke kterému dochází v důsledku porušení intracelulární homeostázy vápníku po podání isoprenalinu (Mladěnka et al. 2007).

### **Model koronární ligatury**

Velmi užívaným modelem je částečné uzavření koronární arterie a následná ischemizace. Jestliže není levá koronární artérie zcela uzavřena, dochází k srdečnímu selhání následkem chronické ischémie. Kompletní uzavření levé koronární artérie vede k infarktu myokardu v různém měřítku. Poškození funkce levé předsíně je spojeno se ztrátou myokardu. Selhání je dáno dilatací levé předsíně, redukcí systolické funkce a zvýšením plnícího tlaku. Progrese levé ventrikulární dysfunkce je spojena s podobnou neurohumorální aktivací, jako probíhá u pacientů s chronickým srdečním selháním. Po 4, 8 a 16 týdne následujících po provedení ligatury koronární artérie se snižuje hladina SR-Ca<sup>2+</sup>-ATPasa na úrovni mRNA i proteinu současně se zhoršením městnaného srdečního selhání. Ligatura levé descendentní koronární arterie poskytuje uniformní velký infarkt s nízkou mortalitou. Dobře využitelná, rychlá a jednoduchá metoda je elektrokatetrizace levé descendentní arterie.

## **2.2.2 Králík**

Králičí model je sice finančně náročnější, ale skýtá mnoho podobností s lidským srdcem.

- a) u dospělých zvířat převažuje těžko-řetězcový  $\beta$ -myosin
- b) sarkoplasmatické retikulum přispívá ze 70% a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměník ze 30% k eliminaci vápníku.

### **Kardiomyopatie způsobená doxorubicinem**

Doxorubicin způsobuje akutní i chronickou kardiotoxicitu a je používán u různých zvířecích druhů. Postižení nastává různými mechanismy včetně produkce volných radikálů, lipidové peroxidace, inhibice syntézy mRNA a proteinů.

### **Spontánní infarkt u imbredních králíků**

Selektivním chovem a křížením jedinců s hereditární hyperlipidemií a jedinců se sklonem k ateroskleróze jsou získány modelová zvířata s vysokou incidencí fatálního infarktu myokardu (Hasenfuss 1998).

## 2.3 REPERFÚZNÍ PARADOX

Během ischémie myokardu jsou reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species - ROS) přítomny jen v malém množství, při obnovení krevního toku koronárním řečištěm však dochází k mnohonásobnému zvýšení jejich počtu. Postischemické zvýšení ROS vzniká neúplnou redukcí kyslíku v mitochondriích a tvorbou superoxidového iontu při reakci xanthinoxidasy, bohatě přítomné ve vaskulárním endotelu a především pak volné kyslíkové radikály uvolněné z polymorfonukleárních leukocytů, které přicestovaly na místo poškození. Není-li reperfuze obnovena, pokračující ischémie poškozuje buňky pravděpodobně jiným mechanismem než tvorbou reaktivních forem kyslíku (Masopust 2003).

### 2.3.1 Vznik ROS

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

Superoxidový radikál vzniká buď přímo při oxidaci v mitochondriích nebo při reakcích katalyzovaných xanthinoxidasou, cytochromem P-450 ev. jinými oxidasami. Vzniklý superoxid může být inaktivován spontánně nebo mnohem rychleji účinkem superoxiddismutasy za vzniku  $H_2O_2$ .

Hydrogenperoxid se tvoří buď dismutací  $O_2^-$  nebo přímo oxidasami v peroxisomech, obsahujících katalasu, která jej ihned rozkládá. Hydroxylové radikály vznikají hydrolýzou vody při ionizační radiaci nebo při interakci přechodných kovů (kupř. Fe, Cu) při **Fentonově** nebo při **Haber - Weissově reakci** (Masopust 2003).

### **2.3.2 Poškození navozené reaktivními formami kyslíku**

ROS jsou extrémně reaktivní, dochází k poškození většiny buněčných struktur. Mezi nejvýznamnější cíle ataku volných radikálů patří proteiny, DNA a membránové lipidy. Nenasycené mastné kyseliny jsou lipoperoxidovány, přičemž vnikají mj. kancerogenní aldehydy (např. malondialdehyd (MDA), 4-hydroxynonenal aj.), hydroperoxidy, lipofusciny aj. Lipoperoxidaci podléhají i bílkoviny, dochází k poškození dusíkatých bazí DNA s možností mutací. Glykooxidace vede k tvorbě tzv. AGE látek (advanced glycosylation end-products), vytváří se křížové vazby s bílkovinami, které těžce poškozují jejich funkci. Výsledkem je zvýšená membránová propustnost, poruchy mikrocirkulace, které vedou ke zvýšené filtraci proteinů a následnému intersticiálnímu edému (Kudla 2001).

#### **Lipidová peroxidace**

Peroxidace membránových lipidů narušuje uspořádání soudržné lipidové dvojvrstvy a strukturní organizace. Během ataku ROS dochází ke zkracování a zmenšování struktury kyselin. Ukázalo se, že účast kovů jako katalyzátorů je při peroxidaci nezbytná. Iniciace lipidové peroxidace indukované hydroxylovým radikálem je v nepřítomnosti kovů nemožná. Přítomností kovů (železo, měď) může být urychlena a usnadněna fáze iniciace (Kondrová et al. 2006).

#### **Poškození DNA**

Reaktivní druhy kyslíku mohou způsobit změny ve struktuře DNA, narušení proteinové kostry, poškození deoxyribosa-fosfátové kostry stejně jako vznik specifických chemických modifikací purinových a pyrimidinových bazí.

Oxidační modifikace bazí se mohou projevit jako mutace, oxidace deoxyribosové části může indukovat uvolnění baze nebo řetězcové zlomy DNA. Hydroxylový radikál způsobuje jak modifikace bazí, tak řetězcové zlomy (Kevin 2005).

### **Poškození proteinů**

Oxidace aminokyselin v proteinech vede k nevratným fyziologickým změnám v proteinech samotných. Převážně jde o fragmentaci, agregaci (denaturace) a zvýšení citlivosti k proteolytickému štěpení (vlivem konformačních změn) (Grinna 1977). Citlivost proteinů vůči oxidaci je ovlivňována také přítomností iontů kovů schopných katalyzovat reakci Fentonova typu (Baldwin et al. 1984)).

### **2.3.3 Obranné mechanismy vůči oxidačnímu stresu**

Kyslíkové radikály jsou velmi reaktivní chemické sloučeniny, schopné indukovat oxidativní modifikaci dalších molekul. Jsou vytvářeny v malých množstvích během normálního metabolismu buněk a jsou normálně inaktivovány endogenními zametacími systémy („scavengers“). Za fyziologických podmínek jsou buňky chráněny vůči železem indukovanému oxidativnímu poškození transportními proteiny jako je transferin a lakoferin (Lf) a železo uskladňujícími proteiny jako feritin a hemosiderin, které oddělují železo ve formách, jež minimalizují převod elektronů z železa na molekulární kyslík. Svou činností tyto proteiny předcházejí tvorbě nových reaktivních forem (Ambrosio 2002).

### **Antioxidační systém**

Fyziologicky existuje v organismu systém antioxidační ochrany. Velikost poškození organismu tedy závisí na rovnováze mezi množstvím kyslíkových radikálů a schopností systému antioxidační ochrany kyslíkové radikály vychytávat a stabilizovat. Systém antioxidační ochrany je tvořen jednak specifickými enzymy, z nichž nejdůležitější jsou superoxiddismutasa (SOD), glutathionperoxidasa (GSH-Px), katalasa. Mezi neenzymatické látky systému antioxidační ochrany počítáme alfa-tokoferol, kyselinu L-askorbovou, glutathion, Co-Q10, beta-karoten, flavonoidy, kyselinu močovou, ceruloplasmin, albumin a další.

Tento systém zahrnuje enzymy, jejichž aktivita závisí hlavně na stopových množstvích minerálů (Mn, Cu, Zn a Se), jako je SOD, glutathionperoxidasa a katalasa.

Dále zahrnuje vitaminy C a E a karotenoidy a je spjata s prevencí tvorby sekundárních radikálů v řetězových reakcích jako je lipidová peroxidace (iniciována a vedena primárními radikály).

Další ochrannou cestou je enzymatická prevence formace sekundárních radikálů z koncových derivátů a umožňující odstranění těchto molekul z prostředí, v němž reakce katalyzované kovy mohou způsobit další oxidativní poškození.

Adaptace může být také zahrnuta v antioxidačním mechanismu. ROS také fungují jako signál umožňující indukci syntézy a transportu příslušných antioxidantů na jeho místo působení.

Nejlépe charakterizovanou antioxidační protiváhou ROS je enzymatická cesta přes katalasu, glutathionperoxidasu, glutathionreduktasu, SOD, hemoxygenasu, thioredoxin s thioredoxinreduktasou (dvě poslední katalyzují tvorbu antioxidantů jako je ubiquinon, kyselina lipoová a askorbová). Jsou zároveň cennými markery v antioxidační odpovědi.

Neenzymatické mechanismy jsou představovány intracelulárními antioxidanty (vitamin C a E,  $\beta$ -karoten, koenzym Q - tj. ubiquinon, kyselina lipoová a močová a také glutathion a metallothioneiny).

Mezi nejvýznamnější intracelulární antioxidanty patří SOD, katalasa, glutathion a glutathionperoxidasa. Extracelulární zametači jsou pak představováni vitaminem C a E, karotenoidy, kyselinou močovou a plazmatickými bílkovinami, které fungují jako chelátory kovů – Fe (Ft, Tf a myoglobin) a Cu (albumin, ceruloplazmin a metallothionein) (Mimíč-Oka et al. 1999)

#### **2.3.4 Antioxidanty**

V současné době je v klinické praxi používána a dále probíhá studium přírodních a syntetických antioxidačních léčiv a suplementů, které mohou být využity jako profylaxe i jako terapie.

Rostoucí zájem se opírá o malé antioxidační molekuly, jako je koenzym Q, vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol), vitamin C (kyselina askorbová), vitamin A a karotenoidy, melatonin a aminoindoly. Současně probíhá studium mnoha rostlinných antioxidantů jako jsou flavonoidy a polyfenoly,  $\alpha$ -lipoová kyselina. Syntetickými antioxidanty jsou mimo jiné deriváty přírodních antioxidantů (analogu  $\alpha$ -tokoferolu), fenolické antioxidanty, 21-aminosteroidy a lazaroidy, sloučeniny obsahující sulfhydrylové seskupení (thiazolidin, dithiolethiony) a nízkomolekulární napodobeniny SOD.

Antioxidační terapie je studována především v souvislosti s onemocněním srdce, aterosklerózou a zánětem. Nicméně definitivní průkaz pozitivních výsledků této terapie u pacientů stále chybí (Mimic-Oka et al. 1999).

#### **2.3.5 Chelatační terapie**

Možnou cestou v prevenci poškození myokardu ROS se jeví chelatační terapie. Chelátory vážou železo, které je pak v komplexu převážně trojmocné  $Fe^{3+}$  a tedy oxidoredukčně málo aktivní. Chelatace železa blokuje Fentonovu reakci, tím že snižuje přístup železa pro tvorbu ROS. Chelátory železa pomáhají dlouhodobému přežívání u pacientů s přetížením organismu železem a redukují incidenci kardiální dysfunkce. Ačkoli chelatační léčba zlepšuje přežívání, ti pacienti jsou stále v riziku rozvoje pozdní železem-indukované kardiomyopatii. Jeden z nejúspěšnějších přístupů v prevenci poškození volnými radikály ale stále představuje chelatace kovů (Andrews 1999).

## **1. Laktoferin (Lf)**

Laktoferin je v lidském organismu přirozeně se vyskytující glykoprotein. Patří do stejné skupiny glykoproteinů jako transferin, který je transportní formou železa. V organismu vykazuje velké spektrum účinků a ovlivňuje množství procesů, jeho role ale ještě není zcela přesně definována. V současné době je studován především vzhledem k jeho imunomodulačnímu a antibakteriálnímu působení.



Obr.č.3: Struktura Lf (<http://www.tufts.edu/sackler/immunology/images/Lactoferrin.jpg> ke dni 10.4.2007)

Lf je monomerický železo vázající glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 80 kDa. Spolu s transferinem (Tf) a ovotransferinem patří do rodiny „transferinů“ (přibližně ze 60 % se shoduje se sérovým Tf). Vazebné místo pro železo umožňuje vazbu dvou molekul železa, která je pevná, ale reversibilní. U Lf probíhá uvolňování železa v normálním stavu při pH kolem 3, zatímco Tf a izolovaná N - podjednotka Lf uvolňuje železo už při pH 5,5. (Duffy et al. 2001). V přirozeném stavu je Lf z 15 až 20 % nasycen železem a má lososově růžovou barvu, jejíž intenzita je závislá na stupni nasycení železem.

Lf, který obsahuje méně jak 5 % železa je označován jako apolaktoferin. Naopak Lf plně nasycený železem je hololaktoferin. Afinita Lf k železu je vysoká, asi

260krát vyšší než afinita sérového Tf a na rozdíl od Tf je schopen udržet železo i při nižším pH. 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> nebo kyselé molekuly jako je heparin, DNA a různé povrchové molekuly (Sanches et al. 1992).

Lf se fyziologicky vyskytuje v mnoha tkáních, orgánech a tekutinách lidského těla. Predominantně se vyskytuje v sekretech exokrinních žláz, které jsou lokalizovány ve vstupních branách do trávicího, respiračního a reproduktivního systému. Lf byl ale také nalezen v ledvinách, žlučníku, pankreatu, gastrointestinálním traktu a játrech. V polymorfonuklearních leukocytech je protein skladován ve speciálních (sekundárních) granulích, kde zůstává do doby buněčné aktivace. Po kontaktu s cizím antigenem tyto buňky degranulují a uvolňují velké množství antibakteriálních a antivirových peptidů, mezi které patří i Lf. Tento proces je hlavním zdrojem Lf v plasmě. Hladina Lf v plasmě je při fyziologickém stavu velmi nízká (1 µg/ml), ale při některých patologických stavech, např. při zánětu, prudce stoupá a dosahuje koncentrace až 200 µg/ml. Po degranulaci je Lf odstraněn z cirkulace různými mechanismy, převážně pomocí buněk monocyto-makrofagového systému. Tyto buňky mají receptory s vysokou afinitou k Lf a dopravují vázané železo do Ft, což je spojeno s destrukcí Lf. Lf proniká do buňky z okolního prostředí a je transportován do jádra buňky, kde se specificky váže k určitým strukturám DNA. Tím dochází ke spuštění transkripce reporterových genů (Abrink et al. 2000).

Lf se po p.o. podání vstřebává ze střevního epitelu, tento transport je umožněn pravděpodobně receptorem zprostředkovánou endocytozou. U novorozenců a čerstvě narozených mláďat probíhá transport především v prvních dnech po narození, byla u nich prokázána přítomnost enterohepatální cirkulace. Po i.v. podání Lf u potkanů dochází k rychlému snižování jeho koncentrace v plasmě. Tento proces je silně závislý na dávce podaného Lf. Farmakokinetické parametry ukazují na receptorem zprostředkováný transportní mechanismus (Troots et al. 2001, Sanches et al. 1992). Po i.p. podání Lf u potkanů v dávce 40 mg/kg je maximální koncentrace Lf v plasmě dosažena za 2 – 4 hodiny po aplikaci. Za 24 hodin je jeho hladina už nedetectovatelná. Po podání druhé

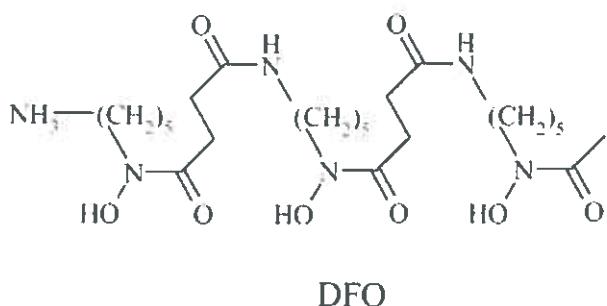
dávky roste koncentrace v plasmě daleko rychleji než při podání první dávky (Troots et al. 2001).

Při pilotních studích Lf se sice kardioprotektivní účinek nepotvrdil, ale při následných studiích s podáváním v delším časovém intervalu se ukázala možnost jeho pozitivního působení (Vykrutová 2006).

Lf vykazuje účinky antibakteriální, antivirové, antifugální, antiparazitické, antitumorové, imunomodulační; ovlivňuje zánět a hypersenzitivní reakce, enzymatickou aktivitu, reguluje transkripci genů a je také přirozeným antioxidantem (Brock et al. 20002, Kruzel et al. 2002, Fujita et al. 2004, Furmanski et al. 1989)

Lf má silné železo-chelatační vlastnosti. Má 260x vyšší afinitu k železu než transferin. Chelatuje trojmocné železo a tak působí proti tvorbě kyslíkových radikálů. Předpokládáme, že lakoferin bude bránit vzniku volných radikálů u ischemicko-reperfuzního poškození ale i v tkáních s vysokým metabolickým obratem (plíce, ledvina, játra). Účinek lakoferinu u těchto patologických stavů *in vivo* ještě nebyl detailněji studován.

## 2. Deferoxamin (Desferal®; DFO)



Obr.č.4 : Struktura deferoxaminu (Tam et al. 2003)

Deferoxamin je silný specifický chelátor železa a jiných kovů. Je již několik let používán v klinické praxi. Je to lék volby při chelatační terapii thalasemie. Dále se používá u pacientů s některými typy anemii, kteří dostávají často transfúze, což vede k nadbytku železa v organizmu nebo pacientů s těžkým onemocněním ledvin, u kterých se pravidelně provádí dialýza, která má za následek nadměrné hromadění hliníku v organizmu (Tam et al. 2003).

DFO je chelatační činidlo, které vytváří chelatační komplexy převážně s trojmocným železem a trojmocným hliníkem: konstanty tvorby komplexů jsou 1031 a 1025. Afinita DFO k bivalentním iontům jako je např.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  a  $\text{Ca}^{2+}$  je podstatně nižší (konstanty komplexů 1014 a méně). K chelataci dochází na molární bazi 1:1, takže 1 g DFO může teoreticky vázat 85 mg trojmocného železa.

Vzhledem ke svým chelatačním vlastnostem je DFO schopen vychytávat železo buď volné, nebo vázané ve ferritinu a hemosiderinu buněk, a tak vytvářet komplex feroxaminu (FO). Vyloučení železa FO močí odráží především obrat plazmatického železa, zatímco železo vyloučené stolicí je odrazem intrahepatální chelatace železa. Vychytávání železa z ferritinu nebo hemosiderinu je nízké v klinické koncentraci odpovídá DFO. DFO však

nevychytává železo z transferinu nebo z hemoglobinu a z ostatních hemin obsahujících sloučenin.

DFO podporuje vylučování železa a aluminia močí a stolicí, a tak snižuje patologická ložiska železa a aluminia v orgánech.

Po intramuskulární anebo subkutánní aplikaci je desferoxamin (DFO) rychle vstřebáván. Z gastrointestinálního traktu je při neporušené mukose vstřebáván špatně. Po perorální aplikaci 1 g DFO je jeho absolutní biologická dostupnost nižší než 2 %. Pokud je DFO podán v dialyzační tekutině, je během peritoneální dialýzyabsorbován.

U zdravých dobrovolníků dosahovala koncentrace v plazmě nejvyšších hodnot 15,5 mmol/l (8,7 µg/ml) za 30 minut po intramuskulární aplikaci 10 mg/kg DFO. Za hodinu po aplikaci byla maximální koncentrace feroxaminu (FO) 3,7 mmol/L (2,3µg/ml). Po intravenózní infuzi 2 g (29 mg/kg) DFO zdravým dobrovolníkům bylo za dvě hodiny dosaženo rovnovážného stavu koncentrace DFO 30,5 µmol/l; distribuce DFO je velmi rychlá a průměrný distribuční poločas je 0,4 hodiny. Na proteiny séra se váže méně než 10 % DFO.

V organismu je DFO metabolizován transaminací a oxidací, beta-oxidací, dekarboxylací a N-hydroxylací. V moči pacientů se zvýšeným výskytem železa byly nalezeny čtyři metabolity DFO.

Protože je p.o. málo aktivní a je velmi rychle vylučován ledvinami, musí být pacient udržován v konstantní infuzní terapii, která zahrnuje kontinuální intravenózní a subkutánní infusi nebo časté intramuskulární podání, které je obtížně snesitelné pro pacienta – může způsobovat bolest nebo induraci v místě vpichu. Nejčastěji se podává 4 – 7 dnů subkutánní infusí v 8 – 12 hodinových periodách.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří právě lokální reakce. Velmi často se vyskytuje bolestivost v místě injekce, prosáknutí, zduření, zarudnutí, pálení, svědění a vyrážka; vzácně se vyskytují puchýřky, místní otoky a zánět. Místní

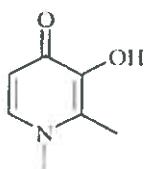
reakce jsou často doprovázeny i celkovou reakcí jako jsou bolesti kloubů, svalů, bolestí hlavy, kopřivkou, nevolností, teplotou, méně často zvracením, bolestí břicha nebo astmatickým záhvatem (SPC Desferal® AISLP 2007).

Vazbou do komplexu s DFO brání volnému železu účastnit se na Fentonově reakci, která produkuje toxický OH<sup>-</sup> radikál z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a tak dochází ke snížení radikálového poškození.

Byl studován i jiný mechanismus, kterým DFO může zvyšovat dlouhotrvající ischemickou toleranci srdce. Při fyziologické adaptaci k hypoxii dochází ke změnám v buněčném metabolismu, tvorbě nových cév, produkci matrix, replikaci myocytů a dalším dějům. Důležitou roli v tomto procesu hraje HIF (hypoxia-inducible transcription factors), což jsou transkripční faktory regulující buněčnou odpověď na nedostatek kyslíku. Při podání DFO 2 hodiny před ischemickou atakou dochází k redukcii ischemického poškození a také k zvýšení hladiny HIF-2alpha mRNA. DFO aktivuje v kardiomyocytech stejnou sérii procesů, která nastává při adaptačních změnách nastolených působením bradykininu nebo acetylcholinu. Pomocí akaktivace NOS-guanylylcylkasa-PKG kaskády dochází k otevření MitoK<sub>ATP</sub> kanálů a to následně vede k tvorbě ROS v mitochondriích a dále alkalizaci matrix. ROS působí jako difusibilní druhý posel spouštějící nástup adaptačních změn. Paradoxně se tak chelátor železa s antioxidačním účinkem podílí na vzniku ROS, které jsou v tomto případě významným členem v protekci myokardu (Philipp et al. 2005).

Oba mechanismy zmenšují tkáňové poškození při ischémii a reperfúzi. Je však nutné zjistit, zda by léčba jednodávkovým podáním DFO poskytla dostatečnou kardioprotekci in vivo a zda je převládajícím mechanismem aktivace HIF systému či intervence přes kyslíkové radikály a Fentonovu reakci.

### **3. Deferipron (*Ferriprox*<sup>®</sup>)**



Deferiprone

Obr.č.5: Struktura deferipronu (Tam et al. 2003)

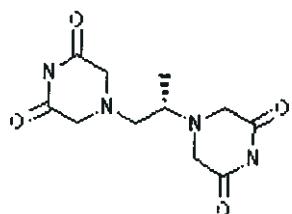
Další v současnosti i v klinické praxi používaným chelátorem železa je deferipron - (1,2-dimethyl-3-hydroxypyridin-4-on). Účinky této p.o. aktivní látky jsou při stavech přetížení organismu železem, myelodysplasii a thalasemii major srovnatelné s účinkem DFO, přičemž redukce hladiny Fe v myokardu u pacientů s thalasemii, byla potvrzena novými MRI metodami. Účinnost v odstraňování železa z myokardu je na podobné úrovni jako u DFO.

Patří do skupiny dvojmocných hydroxypyridinon chelátorů železa, obsahuje dva vicinální kyslíkové atomy, které selektivně chelatují trojmocné kovové kationy. Deferipron je syntetický analog mimosinu – chelátoru železa izolovaného z luštěniny Mimosa pudica (Hoffbrand 2003) .

Deferipron je po p.o. podání velmi rychle absorbován a maximálních plasmatických hladin dosahuje po 45 až 60 minutách po ingesci. Potrava částečně snižuje jeho absorpci. Tvoří cheláty na bázi 3:1 chelátor/železo, ty jsou vylučovány močí. Více než 90% léčiva je eliminováno z plasmy během 5 až 6 hodin po podání. Deferipron je inaktivován především ve II. fázi metabolismu, více než 85% podané dávky je vyloučeno močí jako nechelatující o-glukuronid, který je také vylučován močí. Dochází k glukuronidaci hydroxylové skupiny nezbytné pro chelataci kovu, proto jsou nové sloučeniny navrhovány tak, aby se zabránilo o-glukuronidaci a zvýšila efektivita léčby. V současné době je pro léčbu nezbytná poměrně vysoká dávka 75 mg/kg 3krát denně.

Deferipron je lékem druhé volby při stavech přetížení organismu železem. Užívá se také u pacientů, kteří nemohou být léčeni DFO nebo nevykazují uspokojující odpověď na terapii touto látkou (SPC Ferriprox AISLP 2007).

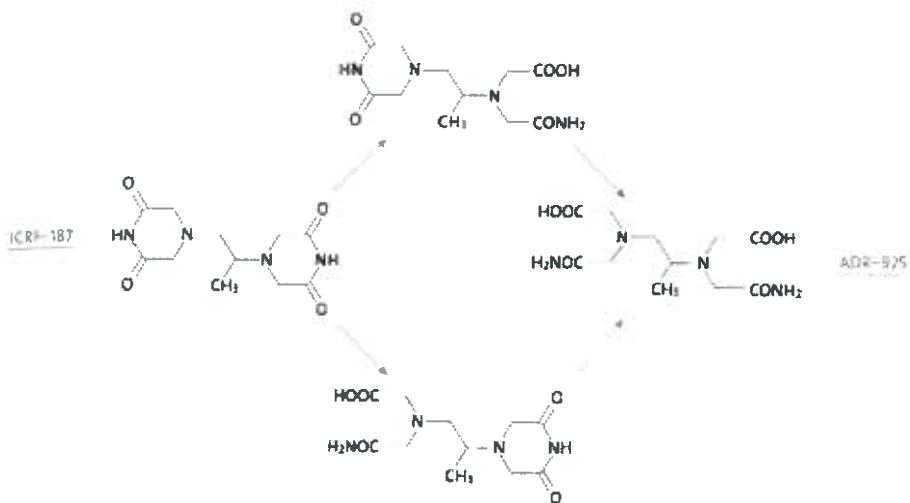
#### 4. Dexrazoxan (ICRF 187, Cardioxane®)



Obr.č.6: Struktura dexrazoxanu (<http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/cgibin/getCard.cgi?CARD=APRD00090.txt> ke dni 23.3.2007)

Dexrazoxan je klinicky využíván při prevenci kardiotoxicity způsobené podáváním antracyklinů při léčbě karcinomů. Antracykliny (doxorubicin, daunorubicin a epirubicin) vykazují na dávce závislou kardiotoxicitu díky rozvoji vzniku železo-dependentních volných kyslíkových radikálů, které poškozují relativně nechráněné buňky myokardu. Tyto látky se podílí na oxidačních a redukčních reakcích: řada NADPH-dependentních buněčných reduktas je schopna redukovat doxorubicin na volné radikály semichinonu, které reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku vysoce reaktivních cytotoxických sloučenin, jako jsou například superoxid, hydroxylové radikály a peroxid vodíku. Především ale doxorubín tvoří cheláty s železem a napomáhá tak k rozvoji hydroxylových radikálů při Haber-Weissově reakci. Následně dochází ke kyslíkem zprostředkované lipidové peroxidaci, irreverzibilní destrukci kardiomyocytů a poškození srdečního svalu (Kruger et al. 2006).

Dexrazoxan, analog EDTA (bisdioxopiperazinový derivát), je hydrolyzován v buňkách myokardu na produkt s otevřenými cykly ICRF - 198. Dexrazoxan (ICRF-187) i hydrolyzovaný produkt (ICRF 198) jsou schopny tvořit cheláty s ionty železa. Vychytáváním iontů železa se zabrání, aby komplexy  $\text{Fe}^{3+}$ -antracykliny vstoupily do oxidoredukčního cyklu a vytvořily reaktivní kyslíkové radikály. Jelikož kardiotoxicita a protinádorová účinnost antracyklinů jsou zprostředkovány rozdílným mechanismem, dexrazoxan neovlivňuje protinádorový účinek antracyklinů, ani nechrání před jejich jiným než kardiotoxickým nežádoucím účinkem (Ramu et al. 2006).



Obr.č. 7: Hydrolýza dexrazoxanu ( [http://www.onkodin.de/zms /contente6/e38842/e42492/e42583/index\\_ger.html](http://www.onkodin.de/zms/contente6/e38842/e42492/e42583/index_ger.html) ke dni 23.3.2007)

Farmakokinetika dexrazoxanu odpovídá otevřenému dvoukompartmentovému modelu s poločasy 15 minut a 140 minut. Distribuční objem je 1,1 l /kg. Tkáňová distribuce je rychlá, nejvyšší koncentrace nezměněné látky i produktu hydrolyzy byla zjištěna v játrech a ledvinách. Neproniká do likvoru v klinicky významném rozsahu. Vazba na plazmatické bílkoviny je minimální (méně než 2%). Asi 40% dexrazoxanu se vylučuje ledvinami v nezměněné podobě, ostatní ve formě metabolitů. U pacientů s nižší clearance kreatininu může být snížena i clearance dexrazoxanu.

Jednotlivá i.v. dávka 600 mg/kg u potkanů a myší při předklinickém zkoušení látky nezpůsobila mortalitu ani signifikantní toxicitu.

Při opakování podávání byly primárními cílovými orgány ty, ve kterých dochází k rychlému buněčnému dělení: kostní dřeň, lymfatická tkáň, testes a intestinální trakt.

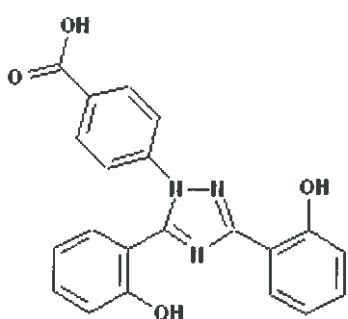
Dávkovací schéma je důležitým faktorem pro snížení poškození tkání; jednotlivá vysoká dávka je lépe tolerována než stejná dávka rozdělená na celodenní dílčí dávky.

Při pokusech na myších byl zaznamenán mutagenní účinek dexrazoxanu. Nelze vyloučit, že by dexrazoxan mohl mít karcinogenní nebo teratogenní účinky. Při podávání dexrazoxanu v doporučovaných kardioprotektivních dávkách nebyl zaznamenán vzestup incidence nebo závažnosti klinických příznaků toxicity standardních chemoterapeutických režimů s antracykliny, s výjimkou mírného potencování leukopenie a trombocytopenie. V místě vpichu se může objevit lokální podráždění a bolestivost.

Při dávkách 4 - 5x vyšších než jsou terapeutické ( $4500\text{mg}/\text{m}^2$ , max. tolerovatelná dávka) se může projevit přechodná leukopenie nebo trombocytopenie mírného nebo středního stupně, nausea, vomitus, alopecie nebo přechodné zvýšení hodnot jaterních enzymů. Při dávkách blízkých maximální tolerované dávce se může objevit malátnost, mírná horečka, vzestup clearance železa a zinku, anemie, abnormální krevní srážlivost, přechodné zvýšení sérových triglyceridů a amyláz a přechodný pokles sérové hladiny kalcia (SPC Cardioxane<sup>®</sup> AISLP 2007).

Byla provedena studie, která se zabývala potencionálním protektivním účinkem dexrazoxanu ischemicko-reperfuzním poškození myokardu. Dexrazoxan signifikantně zlepšil hemodynamické funkce při podání 25 min po celkové ischémii. Také byl zkoumán jeho potencionální terapeutický efekt při dalších patologických situacích. Na zvířecích modelech byl prokázán protektivní účinek a snížení acetaminofenem indukovaného poškození jater a srdce způsobené isoproterenolem (Kruger et al. 2006).

## 5. Deferasirox (Exjade®)



Obr.č.8: Struktura deferasiroxu (<http://www.medsafe.govt.nz/Profs/ Datasheet/e/exjadetabpic1.gif> ke dni 10.4.2007)

Defesirox je další ze skupiny chelátorů železa, které se užívají v praxi. Je vysoce selektivní k trojmocnému železu a podporuje jeho vylučování převážně do stolice. Používá se při léčbě chronického přetížení organismu železem a u pacientů s thalasemií major, kde je deferoxamin kontraindikován nebo je nevhodný.

Je to trojvazné chelatační činidlo, které váže železo s vysokou afinitou v poměru 2:1. Deferasirox má malou afinitu k zinku a mědi, a nepůsobí proto trvalý pokles hladin těchto kovů v séru.

Deferasirox je absorbován po p.o. podání a maximální koncentrace v plasmě dosahuje přibližně za 1,5 – 4 hodiny po podání. Je silně vázán na plazmatické bílkoviny (99%), téměř výlučně na sérový albumin a má malý distribuční objem. Hlavní metabolickou cestou je glukuronidace s následným vylučováním do žluči. Pravděpodobně dochází ve střevě k dekonjugaci glukuronidů a následné reabsorpci (enterohepatální cyklus). Deferasirox a jeho metabolity jsou primárně vylučovány stolicí (84% dávky). Vylučování deferasiroxu ledvinami je minimální (8%) dávky.

Po dlouhodobé léčbě deferasiroxem dochází ke snížení koncentrace železa v játrech a poklesu hladin sérového feritinu. Omezené klinické údaje získané při

použití MRI naznačují, že při léčbě deferasiroxem v dávkách 10 – 30 mg/kg/den po dobu jednoho roku může také dojít ke snížení hladiny železa v srdci.

Nejčastějšími nežádoucími účinky během chronické léčby touto látkou byly u dospělých a dětí poruchy zažívání, přibližně u 26% pacientů (především nauzea, zvracení, průjem nebo bolesti břicha). Kožní vyrážka se vyskytla u 7% pacientů. Tyto nežádoucí účinky jsou závislé na dávce, jsou převážně mírné až středně závažné a obvykle přechodného charakteru (SPC Exjade® AISLP 2007).

### **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## **3.1 METODICKÁ ČÁST**

### ***3.1.1 Provedení studie***

Modelová zvířata byla náhodně rozdělena do 4 skupin, každá z nich obsahovala 7 zvířat. Hmotnosti zvířat se pohybovala v rozmezí 360 +- 10 g.

- Kontrolní skupině (**CONTROL**) jsme podali fyziologický roztok 1 mg/kg s. c.
- 2. sk. (**ISO**) jsme podali isoprenalin ve vodném roztoku 100 mg/kg s. c.
- 3. sk. (**LA**) jsme podali lakoferin 50 mg/kg i.v.
- 4. sk. (**LA+ISO**) jsme podali lakoferin 50 mg/kg i.v.  
a isoprenalin 100 mg/kg s. c.

Fyziologický roztok i Lf v dávce 50 mg/kg jsme aplikovali do postranní ocasní žíly pomocí kanylky a Valu-Setu. Pro usnadnění aplikace Lf byly žíly dilatovány nahříváním ocasu horkou vodou. Lf jsme podali 5 minut před podáním isoprenalinu. Měření probíhala za 24 hodin po aplikaci Lf nebo isoprenalinu, resp. obou. Před usmrcením zvířete 1M KCl byla odebrána krev do heparinizované zkumavky.

#### **Isoprenalinový model**

Pro studium infarktu myokardu jsme vybrali isoprenalinový model. Podání nekrogenních dávek isoprenalinu navozuje u potkanů nejdříve absolutní ischémii, která je následována stavem podobným IM s manifestovanými morfologickými a funkčními změnami. Potkanům jsme podali isoprenalin s.c. v dávce 100 mg/kg podle původní studie Blasig et al., 1985. Pokus provedl Mgr. Přemysl Mladěnka.

### **Biochemická analýza**

Krevní vzorky jsme okamžitě po odběru transportovali do Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové, kde byla provedena jejich analýza.

**Srdeční troponin T (cTnT)** byl stanoven pomocí elektroimunoluminiscenční imunoeseje (Elecsys 2010, Roche diagnostic) za použití specifických monoklonálních protilátek proti cTnT.

**TBARS** (thiobarbituric acid reactive substances; látky reaktivní s kyselinou barbiturovou) byly stanoveny spektrofotometricky (Beckman DU 640, Palo Alto, USA) za tvorby barevných aduktů vzniklých reakcí produktů lipidové peroxidace (MDA) s kyselinou thiobarbiturovou.

Získané hodnoty týkající se podání Lf a ISO konkrétním potkanům sloužily k indexaci a grafickému znázornění vztahu podání isoprenalinu, lakoferinu nebo lakoferinu a isoprenalinu na biochemické ukazatele srdečního poškození (viz. Výsledky).

### **Statistická analýza**

Skupiny byly porovnány nepárovým T-testem. Za hladinu statistické významnosti bylo považováno  $P < 0.05$ .

### **3.1.2 Zvířata**

K experimentům byli použiti samci potkanů kmene Wistar (BioTest s.r.o., Česká republika) o průměrné hmotnosti 350 g. Zvířata byla chována ve viváriu Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze se zajištěnou ventilací vzduchu pro otevřené chovy, 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 v Hradci Králové Univerzity Karlovy v Praze.

### **3.1.3 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)

Isoprenalin (Zentiva a.s, Česká republika)

Laktoferin (SVUS, Hradec Králové)

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

kanylky

Valu-Set, PE katetry

tlakový snímač BPR-02

Cardiosys® (Experimentria Ltd, Maďarsko)

software Cardiosys V 1.1.

mikropipety

### **3.1.4 Histologické zpracování**

Tkáň odebranou pro histologické vyšetření jsme nejprve fixovali a označili číslem, pod nímž je vzorek evidován. Následně jsme vzorek odvodnili, projasnili, prosytily parafínem a zalili vzorek do parafínu. Dále jsme připravili histologické řezy, které jsme dále upravovali. Po odparafinování preparátů jsme přistoupili k histologickému barvení. Obarvené preparáty jsme zamontovali do kanadského balzámu. Po zaschnutí byly vzorky připraveny pro analýzu světelnou mikroskopii.

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

aceton (LACH – NER s.r.o. NERATOVICE)

alciánová modř (SIGMA – ALDRICH)

kyselý fuchsin (Fisher Scientific)

eosin G (MERCK)

ethanol 96% (Lihovar Chrudim a.s.)

ethyleneglykol (Lachema Brno)

formol konc. (PENTA – CHRUDIM)

glycerol (ALMA)

glutaraldehyd (Lachema Brno)  
hematoxylin (Lachema Brno)  
chlorid železitý ( Lachema Brno)  
jodičnan sodný (Lachema Brno)  
kanadský balzám (Lachema Brno)  
kyselina fosfomolybdenová (LACH – NER s.r.o. NERATOVICE)  
kyselina octová (LACH – NER s.r.o. NERATOVICE)  
kyselina pikrová (Polskie Odczynniki Chemiczne)  
kyselina octová ledová (LACH – NER s.r.o. NERATOVICE)  
oranž G (Fisher Scientific)  
parafín (PARAMIX – HOLICE)  
Ponceau RR (Loba-Chemie, Wien, Austria)  
síran hlinitý (PENTA – CHRUDIM)  
světlá zeleň (Fluka AG, Switzerland)  
uranylacetát ((MERCK)  
xylen (Kulich Hradec Králové)

pH metr (pH 538 WTW)  
míchačka (MM1, Laboratorní přístroje Praha)  
laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce apod.)  
kvety  
podložní a krycí sklíčka  
sáňkový mikrotom (Leitz-Wetzlar, Reichert)  
rotační mikrotom (MPS-2)  
světelný mikroskop (Hund Wetzlar V 300)  
mikroskop Olympus AX-70 (Olympus Ltd., Japan)  
digitální kamera Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA)  
software LUCIA verze 4.71 (Laboratory Imaging Prague ČR)

## **Zpracování materiálu pro histologickou analýzu**

Fixace je rychlé vysrážení (denaturace) bílkovin, protoplasmy buněk a tkání fixačními prostředky. K fixaci jsme použili Bouinovu tekutinu. Minimální doba fixace je 24 hodin – záleží na velikosti vzorku. Po skončení fixace jsme vzorek dále zpracovávali. Tato procedura sestává z odvodnění, projasnění, prosycení parafínem a následuje vlastní zalití vzorku do parafínu. Při projasnění jde o odstranění ethanolu z tkáně. Při prosycování nesmí teplota parafínu překročit 58°C.

### Bouinova fixační tekutina

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

K neutralizaci formolu se používá práškového CaCO<sub>3</sub> nebo MgCO<sub>3</sub>. 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.

### Zpracování vzorku z fixace Bouinovou tekutinou

80 % ethanol 1 hod

aceton 3 x během 24 hodin

benzen 3 x po 10 min

parafín 2 x během 24 hodin

zalití do parafínu

K vlastnímu zalití tkáně do parafínu se používá zkvalitněný a přefiltrovaný parafín. Ten se získá tak, že k přetavenému parafínu přidáme 3 – 5 gramů

včelího vosku na 100 gramů parafínu. Zalévání se provádí v kovových rozebíratelných komůrkách, do nichž se umístí zpracovávaný materiál. Když je parafín tuhý, bloček se ořízne tak, aby vrstva parafínu kolem vzorku byla široká 3 – 5 milimetrů a uloží se do označeného sáčku.

Před krájením se bloček přitmelí k dřevěnému špalíčku. Krájení se provádí na sáňkovém mikrotomu (Reichert). Nejprve se bloček musí nahrubo prokrájet k vlastní tkáni. Pak se nařídí hlavice mikrometrického šroubu na žádanou tloušťku řezů a krájí se tenké řezy o tloušťce 5 – 7 mikrometrů. Parafínové řezy se opatrně přenášejí do kapky destilované vody na podložním sklíčku. To je předem nutno potřít směsí bílku s glycerolem, aby se řez na sklíčko přilepil a později během barvení ze sklíčka neodplaval.

#### Směs glycerolu s bílkem

K vaječnému bílku přidáme stejné množství glycerolu, ušleháme a přefiltrujeme. K filtrátu přidáme malý kousek kafru za účelem konzervace.

Řez se na podložním sklíčku napne pomocí preparačních jehel a sklíčko se položí na elektrickou plotnu, která je zahřátá na 40°C. Když se řez narovná, sejme se z plotny a přebytečná destilovaná voda se nechá odkapat nebo se odsaje filtračním papírem. Podložní sklíčko se označí pomocí diamantu číslem zpracovávaného vzorku a uloží se do termostatu vyhřátého na 38°C až 40°C.

Histologické řezy se dále barví. Pokud prohlížíme preparát v optickém mikroskopu, jednotlivé složky tkáně se takřka neliší lomivostí světla. Při barvení využíváme toho, že různé součásti buněk a tkání vážou různá barviva, takže je v mikroskopu zřetelně rozlišíme. Základním barvením preparátu je hematoxylin & eosin.

#### Zamontování do kanadského balzámu

Obarvené preparáty jsme vyzvedli z kvety s xylenem, rádně a naposledy otřeli sklíčko v okolí preparátů. Poté jsme preparáty přikryli krycím sklíčkem, na němž byla kapka kanadského balzámu a nechali několik dní zaschnout.

## HISTOLOGICKÁ BARVENÍ PRO SVĚTEL. MIKROSKOPII

### 1. HEMATOXYLIN A EOSIN

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

**barvení:** hematoxylin ..... 6 - 8 min  
pramenitá voda ..... 10 min (modření)  
otření sklíček  
eosin ..... 2 min  
destilovaná voda – opláchnutí

**odvodnění:** 2x 96 % ethanol – opláchnutí  
ethanol – xylen (2:1)....3 min  
ethanol – xylen (1:2)....3 min

**projasnění:** 3x xylen ..... 3 min  
otření sklíček

**zamontování do kanadského balzámu**

#### Roztoky:

##### **Hematoxylin Hill**

hematoxylin	4,0 g
vodě	
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 destilované

**Výsledek barvení:** Jádra buněk, kolagenní vazivo růžově, svalstvo červeně.

## **2. ZELENÝ TRICHROM (MASSONOVY TRICHROMY)**

**Roztoky:**

**Roztok kyselého alkoholu:** kyselina octová .....10 ml  
96% ethanol .....990 ml

**Roztok kyselého fuchsinu – ponceau:** roztok A .....1 díl  
roztok B .....2 díly

**Roztok A:** barvivo jsme rozpustili ve vařící vodě a až po vychladnutí jsme přidali kyselinu octovou.

kyselý fuchsin .....2 g  
destilovaná voda .....200 ml  
kyselina octová .....2 ml

**Roztok B:** postup jako u roztoku A

ponceau 2R .....2 g  
destilovaná voda .....200 ml  
kyselina octová .....2 ml

**Roztok oranže G a kyseliny fosfomolybdenové:**

destilovaná voda .....200 ml  
kyselina fosfomolybdenová ....10 g  
oranž G .....4 g

**Roztok metylenové zeleně:**

destilovaná voda .....100 ml  
metylenová zeleň .....0,2 g  
kyselina octová .....0,5 ml

**Barvení:** hematoxylin.....4 min  
destilovaná voda – opláchnutí  
diferenciace v kyselém alkoholu za kontroly mikroskopem  
pramenitá voda .....5 min  
destilovaná voda – opláchnutí  
kyselý fuchsin-ponceau...4 min  
1% kyselina octová – opláchnutí

diferenciace roztokem oranže G a kyseliny fosfomolybdenové za kontroly v mikroskopu (až kolagenní vazivo zůstane téměř bezbarvé)

1% kyselina octová – opláchnutí

metylenová zeleň .....2,5 min

1% kyselina octová – 3x opláchnutí

**Odvodnění:** 96% ethanol.....3 min

ethanol – xylen (2:1) ....3 min

ethanol – xylen (1:2) ....3 min

**Projasnění:** 3x xylen .....3 min

otření sklíček

### **Zamontování do kanadského balzámu**

**Výsledek barvení:** kolagenní vlákna zbarvena zeleně

### **3. WEIGERTŮV ŽELEZITÝ HEMATOXILIN – VAN GIESONŮV PIKROFUCHSIN**

**odparafinování:** 3x xylen ..... 5 min  
96 % ethanol..... 5 min  
70 % ethanol ..... 5 min  
destilovaná voda ..... 5 min

**barvení:** Weigertův hematoxylin..... 15 – 20 min

pramenitá voda ..... 5 min  
destilovaná voda.....opláchnutí  
pikrofuchsin..... 5 – 10 min  
destilovaná voda.....opláchnutí (rychle)  
ethanol 70% .....opláchnutí (rychle)  
ethanol 80%.....opláchnutí (rychle)  
ethanol 96%.....opláchnutí  
ethanol 96%.....opláchnutí  
ethanol – xylen 2:1.....opláchnutí  
ethanol – xylen 1:2.....opláchnutí  
3x xylen .....3 min

#### **Roztoky:**

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

###### **roztok A**

ethanol 96%.....100,0 ml  
hemtoxylin .....1,0 m

###### **roztok B**

destilovaná voda .....95,0 ml  
chlorid železitý.....0,6g  
HCl.....0,75 ml

**Roztok A : Roztok B = 1:1**

##### **Pikrofuchsin:**

za studena nasycený roztok kyseliny pikrové.....100,0 ml  
2% roztok kyselého fuchsinu.....6,0 ml  
před použitím jsme okyselili 1 kapkou 2% kyseliny octové na 10 ml

##### **výsledek barvení:**

Jádra se barví černohnědě, kolagenní vazivo červeně, svalstvo žlutě (Vacek 1998).

#### **4. ALCIÁNOVÁ MODŘ**

##### **Roztoky:**

**Roztok alciánové modři:** alciánová modř.....1g  
destilovaná voda .....99 ml  
kyselina octová.....1 ml

**Barvení:** Barvení alciánovou modří probíhalo podobně jako barvení hematoxilinem-eosinem, jen s tím rozdílem, že po odparafinování jsme nejprve roztoky přebarvili alciánovou modří (15 minut) a pak jsme obarvili jádra hematoxylinem (8 minut). Po propírání a modrání v pramenité vodě jsme dobarvili 1% vodným roztokem eosinu a nakonec jsme vzorky odvodnili a projasnili.

**Výsledek barvení:** Jádra buněk a chrupavky modře, kolagenní vazivo růžově.

## ÚPRAVA MATERIÁLU PRO ELEKTRONOVOU MIKROSKOPII

**První fixace:** 3% roztok glutaraldehydu .....20 min (lednice)  
vypírání Millonigovým fosforečnanovým pufrem třikrát 15 min  
(lednice)

**Druhá fixace :** 2% roztok kyseliny osmičelé .....2 hod (lednice)  
vypírání Millonigovým pufrem čtyřikrát 15 min (lednice)

### **Odvodnění alkoholovou řadou:**

ethanol 25% vychlazený.....15 min  
ethanol 50% vychlazený.....15 min  
ethanol 75% vychlazený s obsahem uranylacetátu 1%.....15min  
ethanol 96% s obsahem uranylacetátu 1% při pokoj. teplotě.....15min  
ethanol 100% s obsahem uranylacetátu 1% při pokoj. teplotě.....15min  
ethanol 100% při pokoj. teplotě 2 x 15 min

Během odvodňování jsme připravili epoxidovou pryskyřici. Použili jsme směs epon-durkupan, která je složena z Eponu, Durkupanu modrého, červeného, žlutého a zeleného v určitém poměru. Příprava probíhala při vlhkosti do 40%.

### **Prosycování:**

směs č.I. 100% aceton : epon-durkupan = 2 : 1 .....1 hod  
směs č. II. 100% aceton : epon-durkupan = 1 :2 .....1 hod  
směs epon-durkupan .....24 hod  
Zalití směsi epon-durkupan do želatinových tobolek - polymerizace (60°C) 3 dny

Vzorky jsme krájeli na ultramikrotomu. Polosilné řezy (cca 1µm) jsme barvili barvícím roztokem, poté jsme je opláchlí redestilovanou vodou . Řezy jsme dále montovali do pryskyřice.

## **4. VÝSLEDKY**

## ***Biochemický profil vlivu lakoferinu na model isoprenalinového poškození myokardu***

Na čtyřech skupinách laboratorních zvířat jsme provedli studii vlivu lakoferinu na biochemické markery poškození myokardu při podání isoprenalinu. Podání nekrogenních dávek isoprenalinu navozuje u potkanů stav velmi podobný infarktu myokardu. Nejprve dochází k absolutní ischemii, dále pak k manifestaci morfologických a funkčních změn.

Ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové jsme ze vzorků odebrané krve získali hodnoty troponinu T a TBARS. Troponin je v současné době považován za jeden z hlavních a nejpřesnějších biomarkerů IM. TBARS (látky reagující s kyselinou thiobarbiturovou) vznikají reakcí malondialdehydu s kyselinou thiobarbiturovou a jsou výsledkem reakce ROS s nenasycenými mastnými kyselinami.

Získané hodnoty nám umožnily grafické znázornění vztahu podání isoprenalinu, lakoferinu nebo lakoferinu a isoprenalinu v porovnání s kontrolou.

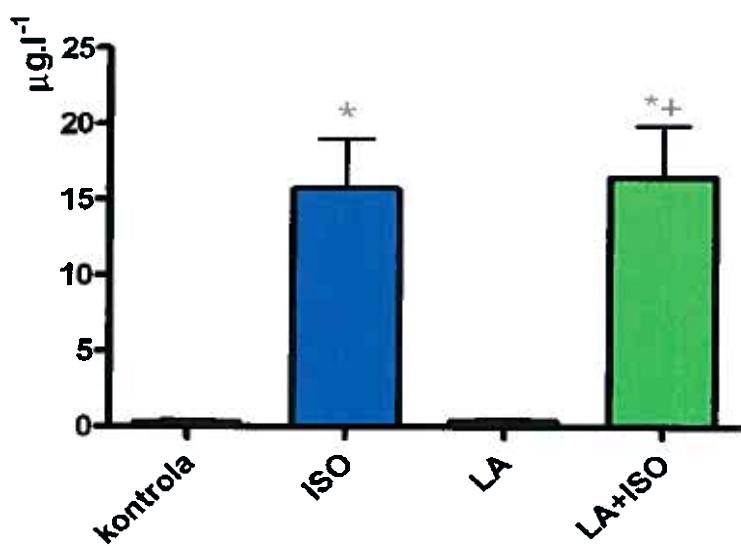
Provedli jsme také histologické zhodnocení vzorku myokardu z levé i pravé komory, vzorky jsme odebírali z oblasti od síní ke hrotu.

- Vliv lakoferinu na hladinu troponinu T u isoprenalinového poškození myokardu
- Vliv lakoferinu na hladinu TBARS u isoprenalinového poškození myokardu
- Histologické zhodnocení

## 4.1 Vliv Lf na hladinu troponinu T

Troponin T (cTnT) zprostředkuje vazbu troponinového komplexu s molekulami tropomyosinu a je nezbytný pro regulaci skeletální a kardiální svalové kontrakce. Při poškození myokardu se troponin rychle vyplavuje do krevní cirkulace, což je použitelné pro časnou diagnostiku AMI nebo jiného akutního poškození myokardu.

Graf č.1: Troponin T



\* znamená vs. kontrola  $p<0,05$     + vs. laktferin  $p<0,05$

Fyziologické hodnoty cTnT v krevní cirkulaci jsou tak nízké, že každé měřitelné zvýšení cTnT je patologické a znamená poškození (nekrózu myokardu).

Je patrné, že u kontrolní skupiny a skupiny kde byl podán pouze Lf (50 mg/kg) nedošlo k žádnému poškození myokardu. Hladiny cTnT jsou nulové.

Podání isoprenalinu v nekrogenních dávkách (100 mg/kg s.c.) způsobilo výrazné zvýšení hladiny cTnT v plasmě v porovnání s kontrolní skupinou. Hodnoty se blížily 16  $\mu\text{g/l}$ . Dochází k ischemizaci a silnému poškození myokardu.

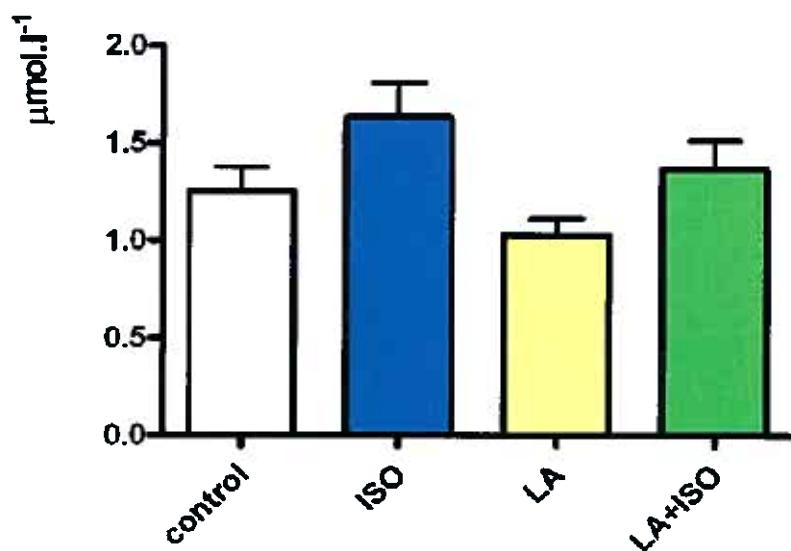
Při současném podání isoprenalinu a Lf došlo k vyplavení cTnT. Hodnoty jsou podobné jako u skupiny, kde byl podán isoprenalin samotný. Podání Lf tedy neovlivnilo poškození myokardu, nedošlo k protekci před ischemickým působením isoprenalinu.

## 4.2 Vliv laktoferinu na hladinu TBARS

TBARS (thiobarbituric acid reactive substances, látky reaktivní s kyselinou barbiturovou) jsou látky, které nám umožňují hodnocení reperfuzního poškození. Při působení ROS dochází mimo jiné k lipidové peroxidaci, přičemž vnikají kancerogenní aldehydy např. malondialdehyd (MDA), 4-hydroxynonenal aj. Jedna molekula malondialdehydu, sekundárního lipidického oxidačního produktu, reaguje se dvěma molekulami kyseliny thiobarbiturové.

Jednou z nejužívanějších metod k hodnocení schopnosti látek eliminovat lipidovou peroxidaci je metoda TBA-MDA. Je založena na stanovení malondialdehydu (MDA) na základě jeho barevné reakce s kyselinou thiobarbiturovou (TBA), měří se absorbance při 532 nm. Spektrofotometrické stanovení aduktu TBA-MDA je jednoduché a citlivé (Paulová et.al 2004).

Graf č.2: TBARS



Hladina TBARS se v porovnání s kontrolní skupinou mírně zvýšila po podání isoprenalinu. Došlo k peroxidací lipidů a vzniku MDA následkem ischemicko-reperfuzního poškození myokardu.

Ve skupině, kde byl podán Lf samostatně, došlo ke snížení hladiny TBARS v porovnání s kontrolní skupinou. To vyplývá z jeho antioxidačních a chelatačních účinků, dochází ke snížení tvorby ROS a následně k menšímu ischemicko-reperfúznímu poškození.

Při současném podání s isoprenalinem Lf zabránil vzestupu TBARS (i když bez statistické významnosti). Hodnoty TBARS jsou nižší než u skupiny ISO, kde byl podán pouze isoprenalin. Lf by mohl mít protektivní účinek při ischemicko-reperfúzním poškození myokardu.

### **4.3 Histologické zhodnocení**

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 pomocí softwaru LUCIA verze 4.71 (Laboratory Imaging Prague, ČR).

Pomocí příčných i podélných řezů celým vypreparovaným myokardem jsme ověřovali histologické změny, které nastaly po experimentálním podání lakoferinu a následně isoprenalinu a vyvolaly ve struktuře myokardu obraz podobný nálezu při akutní ischemizaci.

V návaznosti na pilotní studii byl opakovaně prokázán trend ischemického poškození na celé struktuře myokardu (obr.č. 1). Změny v čase odběru po 24 hod od expozice isoprenalinu neměly znatelné charakteristické znaky pozdních změn akutního infarktu myokardu – tj. ložiska kompletního rozpadu buněk svalu i intersticia s demarkační linií leukocytárního valu, jaká jsou v takovýchto časových intervalech obvykle přítomná.

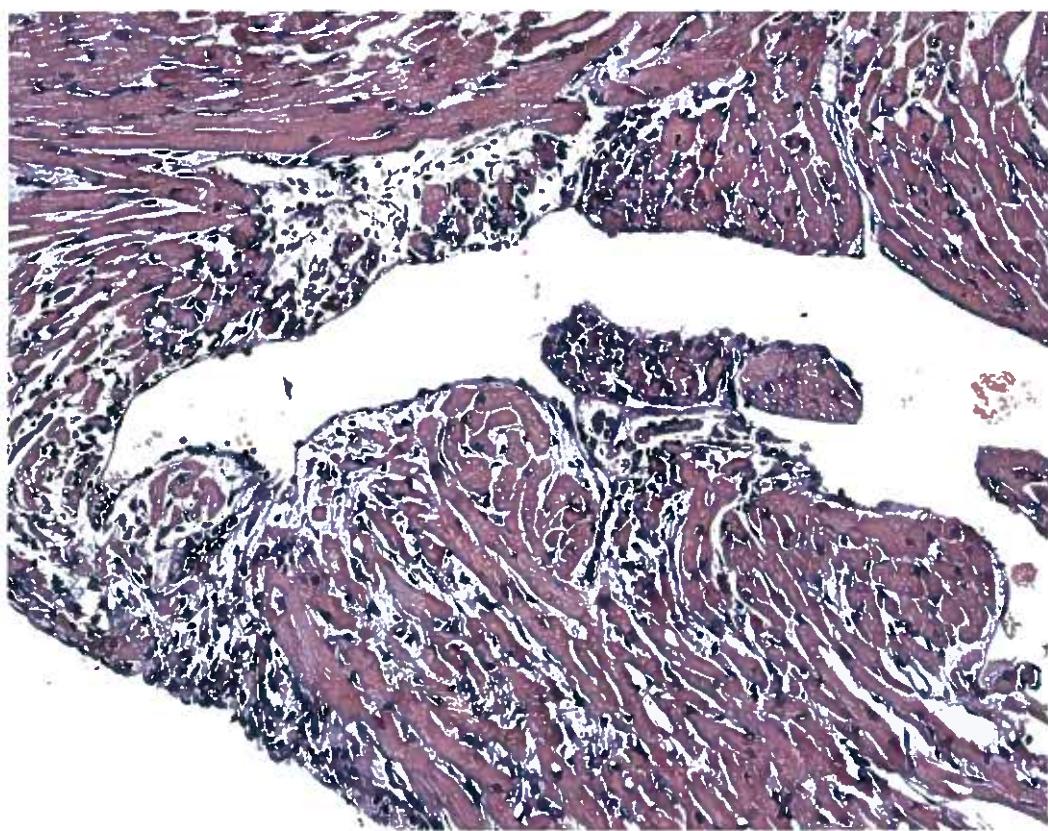
Po podání isoprenalinu jsme se často setkali se změnami, které měly difúzní, nikoli ložiskový charakter. Zvláště v subepikardiální a subendokardiálních oblastech jsme pozorovali plášťový charakter změn, větší množství polymorfonukleárního infiltrátu a trombotizace (Obr.č.2, 3).

Příčné pruhování je v některých kardiomyocytech zachováno, v některých však již nebylo pozorovatelné (Obr. č.4). Na tzv. polosilných řezech byla přesvědčivě prokázana myolýza a různé stupně nekrotického stadia jader. Na některých úsecích byla patrná i forma hrubšího granulárního rozpadu takto postižených buněk. Jádra v takovýchto oblastech se rozpadla karyolýzou nebo karyorexi. Na určitých úsecích hranice nekrotické a zachovalé tkáně byly pozorovatelné i pruřezy dystroficky změněnými kardiomyocyty s výrazným hydropickým vakuolizováním cytoplazmy.

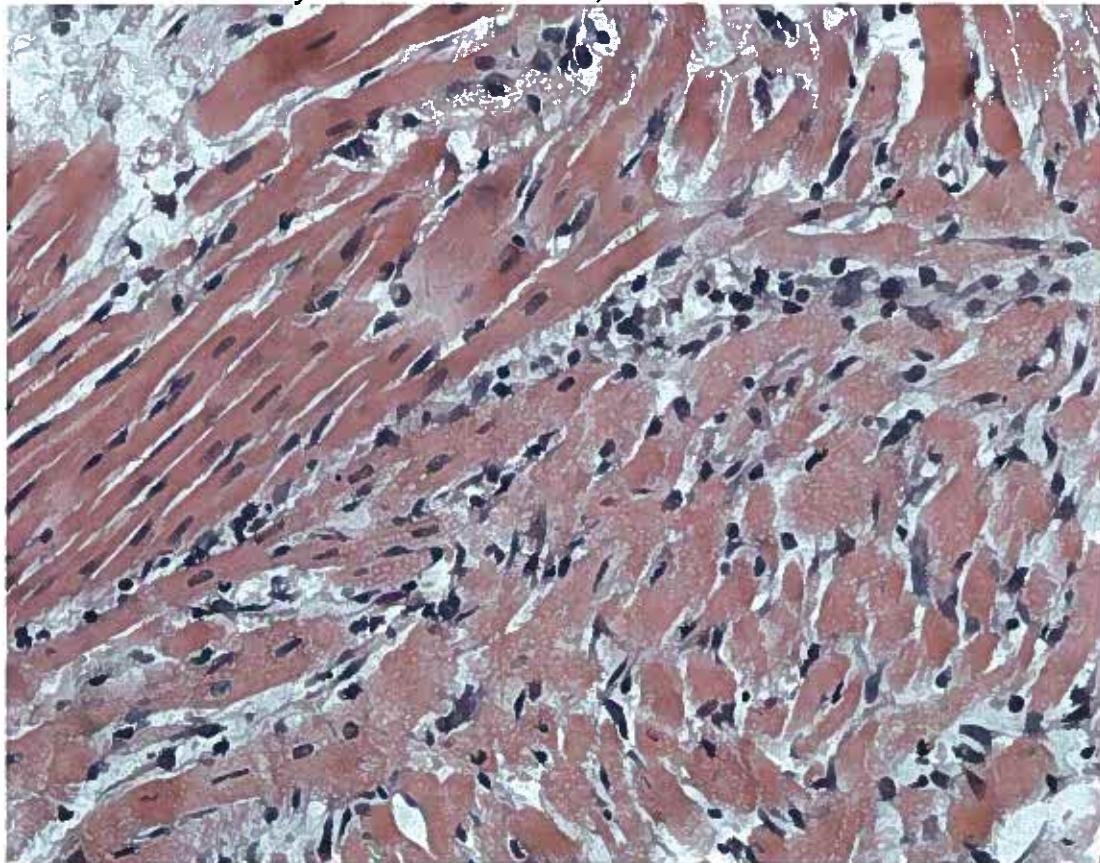
Opět se ukázaly změny zánětlivého infiltrátu v cévách (zvýšená aktivace imunokompetentních buněk a exprese adhezivních molekul) i mimo cévy v příslušných okrscích (obr. č. 2). Na rozdíl od pilotní studie byly nalezeny také časté tromby, což ukazuje na endotelovou dysfunkci (obr č. 3).

Při podání laktoferinu se u některých preparátů prokázala nižší intenzita změn myokardu, než při podání samotného isoprenalinu. Poškození kardiomyocytů se objevovalo v menší míře a byla více zachována jejich integrita. Změny byly ale velmi nehomogenní a často se jednotlivé vzorky lišily v míře poškození. Proto je jejich hodnocení velmi složité.

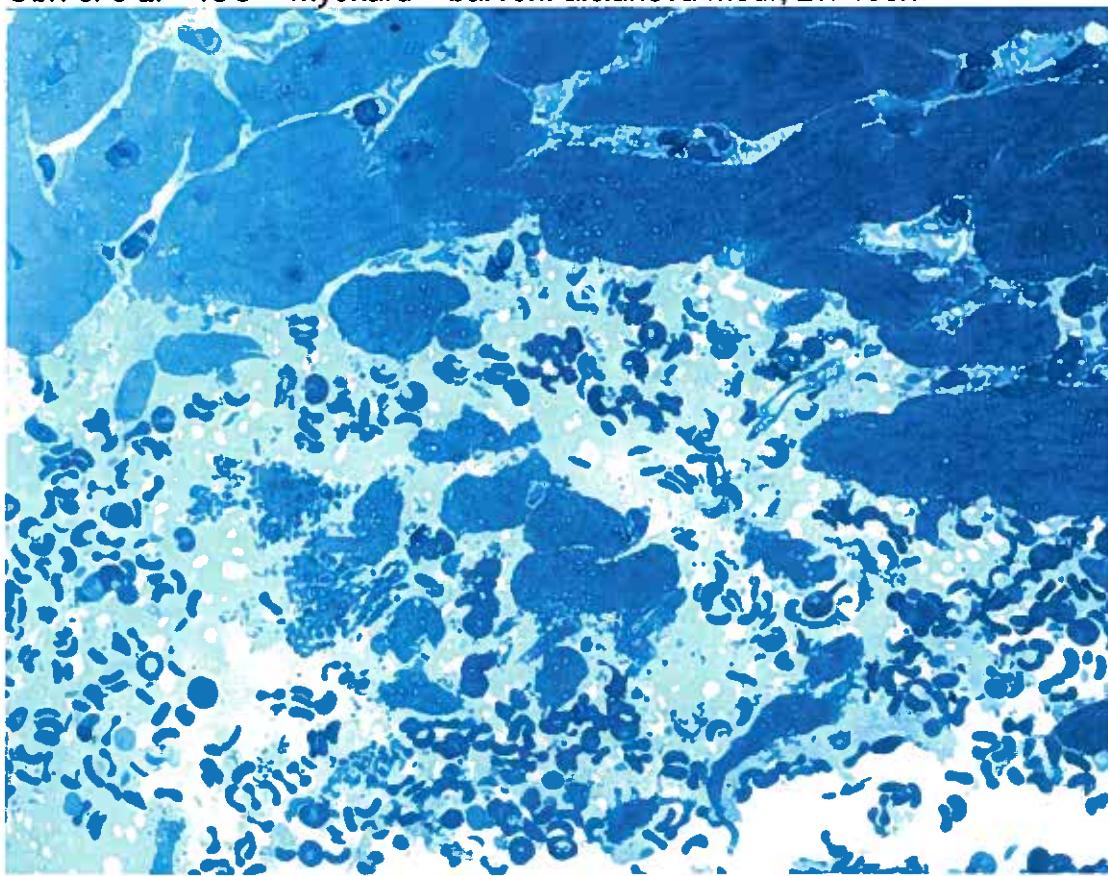
Obr. č. 1 Lf + ISO – myokard – barvení H-E, zvětšení 100x



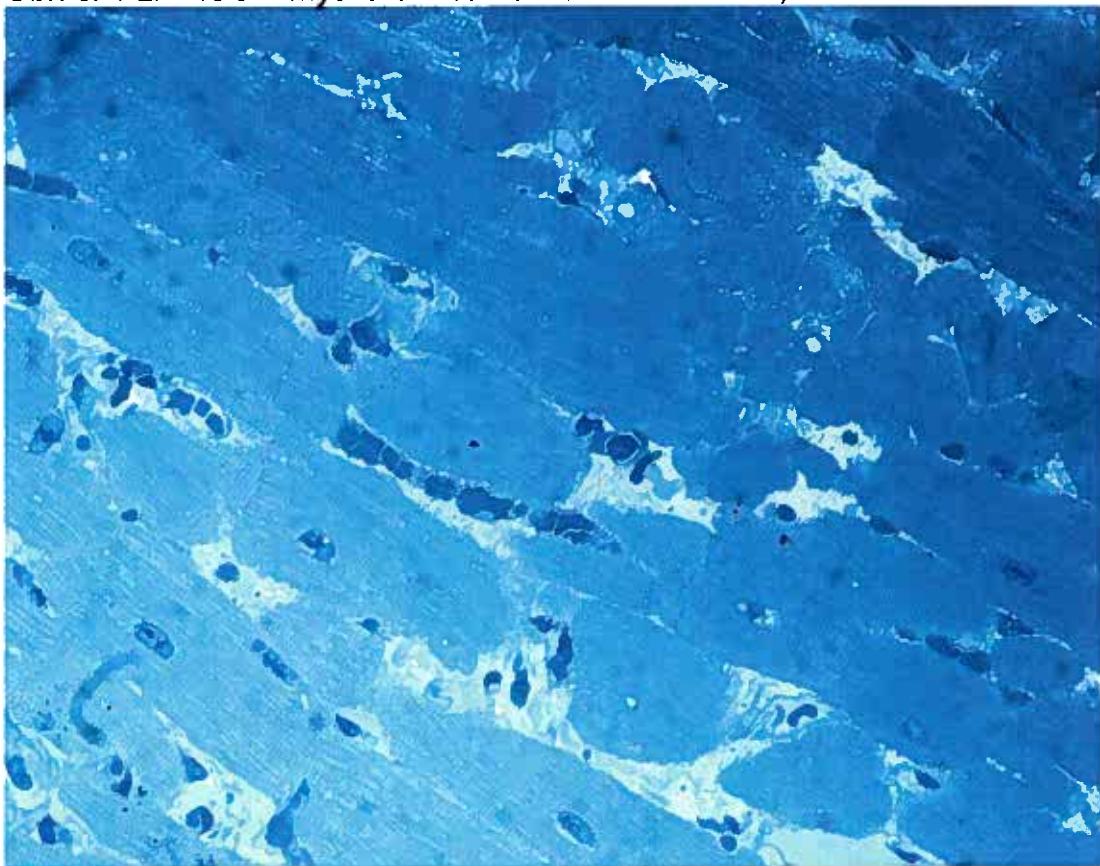
Obr.č. 2 Lf + ISO – myokard – barvení H-E, zv. 100x



Obr. č. 3 Lf + ISO – myokard – barvení alciánová modř, zv. 400x



Obr. č. 4 Lf + ISO – myokard – barvení alciánová modř, zv. 400x



## **5. DISKUZE**

Laktoferin je železo vázající glykoprotein, který se fyziologicky vyskytuje v lidském organismu. Je obsažen v sekretech exokrinních žláz - v slzách, slinách, mléce, synoviální a seminální tekutině (Steijns et al. 2000). V plasmě se vyskytuje především při zánětlivé odpovědi a pochází z polymorfonukleárních neutrofilů (Abrink et al. 2000). V lidském těle má mnoho funkcí, ale jeho role bude pravděpodobně komplexní. V současné době je studován především v souvislosti s jeho antibakteriálními a imunomodulačnímu účinky. V četných studiích byly popsány jeho antibakteriální – bakteriostatický i baktericidní, antivirový, antifugální, antiparazitický, antitumorový a antioxidační účinky. Byla popsána i jeho enzymatická aktivita, role v ovlivnění hypersenzitivní reakce a regulaci transkripce některých genů (Brock et al. 20002, Kruzel et al. 2002, Fujita et al. 2004, Furmanski et al. 1989)

Lf však také působí jako chelátor železa. Jeho schopnost vázat železo je dokonce až 260x vyšší než je tomu u transferinu, který je transportní formou železa v lidském těle (Sanches et al. 1992) Díky této vlastnosti vyvazuje trojmocné železo, které je jedním z hlavních katalyzátorů Haber-Weissovy a Fentonovy reakce. Při těchto reakcích dochází k tvorbě nadměrného množství reaktivních kyslíkových radikálů (Baldwin et al. 1984)

V současné době probíhá studium mnoha látek, které by mohly mít protektivní účinky vůči působení ROS. V klinické praxi se používají chelátory železa a jiných přechodných prvků (např. deferoxamin, deferipron, dexrazoxan, deferasirox) při onemocněních, které jsou spojeny s přetížením organismu železem, myelodysplasii, thalasemii major nebo při prevenci kardiotoxicity způsobené podáváním antracyklinů (Tam et al. 2003, Hoffbrand et al. 2003, Philipp et al. 2006) Bohužel, vzhledem k ekonomické náročnosti a často i krátkému biologickému poločasu, nelze tyto látky podávat preventivně k protekci před oxidačním působením ROS.

Protože u IM dochází k velmi podobnému stavu jako po exogenním podání katecholaminů, vybrali jsme isoprenalinový model jako vhodný příklad pro

studium protektivních účinků lakoferinu. Dochází k podobnému, i když ne zcela identickému poškození myokardu jako při AIM. V současné době je jedním z hlavních markerů IM hladina cTnT (troponin T) (Zimmerman et al. 1999, Rottbaurer et al. 1996, Murthy et al. 1996). Troponin T je velmi citlivým markerem myokardiánho poškození, umožňuje také rozlišení, zda došlo k reperfuzi, nebo k ní nedošlo (Babuin et al. 2003, Gibbons et al. 2004). Fyziologické hodnoty cTnT v krevní cirkulaci jsou tak nízké, že každé měřitelné zvýšení cTnT je patologické a znamená poškození (nekrózu myokardu) (Masopust 2003). U kontrolní skupiny a skupiny, kde byl podán pouze Lf jsme nezaznamenali žádné měřitelné hodnoty cTnT, nedošlo k ischemickému poškození myokardu. Po aplikaci isoprenalinu jsme zaznamenali významné zvýšení cTnT, které potvrzuje poškození myokardu. Při současném podání isoprenalinu a Lf došlo k vyplavení cTnT, přičemž hodnoty jsou podobné jako u skupiny, kde byl podán isoprenalin samotný. Podání Lf tedy bohužel neovlivnilo poškození myokardu, nedošlo k protekci před ischemickým působením isoprenalinu.

Při ischemicko-reperfuzním poškození myokardu dochází k narušení struktury i funkce u všech typů molekul. Jedním z nejzávažnějších projevů je lipidová peroxidace. Při studiu látek s antiradikálovými účinky se proto řada metod zaměřuje přímo na testování inhibičních účinků na lipidovou peroxidaci. Látky potlačující lipidovou peroxidaci mohou eliminovat jak iniciační kyslíkové radikály (OH<sup>-</sup>), tak sekundárně vznikající radikálové meziprodukty (peroxyl, alkoxyl) a mohou také působit jako látky chelatující ionty přechodných kovů. Malondialdehyd (MDA) je konečným produktem lipoperoxidace a je nejrozšířenějším ukazatelem těchto reakcí (Paulová et al. 2004). V naší studii jsme použili hodnoty MDA (resp. TBARS) jako ukazatele ischemicko-reperfuzního poškození.

V současné době existuje několik pohledů na hladinu TBARS při ischemickém poškození myokardu. Některé studie uvádějí, že hladina TBARS nesouvisí s ischemicko-reperfuzním poškozením (Olsson et al. 2002). Avšak při studii účinků podání isoprenalinu na myokard, bylo ověřeno signifikantní zvýšení hladiny TBARS v plasmě po podání ISO (Tappia et al. 2001). Ukázalo se, že

v prvních 30 minutách po vyvolání ischémie hladina TBARS zůstává nezměněna, následně přibližně 3 hodiny stoupá, zatímco za 24 hodin po atace hladina opět klesá k původním hodnotám (Roth et al. 1985). V naší studii jsme TBARS měřili za 24 hod po vyvolání ischémie podáním isoprenalinu. Došlo k mírnému zvýšení hladiny TBARS v plasmě.

Protože jsme vycházeli z antioxidačních a chelatačních účinků Lf, předpokládali jsme snížení tvorby ROS a následně i menší ischemicko-reperfúzní poškození. Ve skupině, kde byl podán Lf samostatně, došlo ke snížení hladiny TBARS v porovnání s kontrolní skupinou. Při současném podání s isoprenalinem Lf zabránil vzestupu TBARS (i když bez statistické významnosti). Hodnoty TBARS jsou nižší než u skupiny ISO, kde byl podán pouze isoprenalin. I když hodnoty nedosahují statistické významnosti, je zřetelný pozitivní trend v působení Lf. Vzhledem k tomu, že je výzkum působení Lf na ischemicko-reperfúzní poškození myokardu teprve na začátku, nemůžeme spolehlivě vyvrátit, ale bohužel ani potvrdit protektivní účinky Lf na myokard.

Při histologickém zhodnocení jsme navázali na pilotní studii. Opakovaně byl prokázán trend ischemického poškození na celém srdci. Změny po expozici isoprenalinu neměly na úrovni světelné mikroskopie charakteristické znaky jaké jsou obvyklé u AIM na myokardu přítomné. Zaznamenali jsme difúzní, nikoli ložiskový charakter poškození myokardu. U vzorků zvířat, kterým byl podán lakoferin, se u některých preparátů objevilo méně významné poškození myokardu, než při podání samotného isoprenalinu. U kardiomyocytů jsme často zaznamenali zachovanou integritu. Změny byly ale velmi nehomogenní a často se jednotlivé vzorky lišily v míře poškození. Proto bylo hodnocení velmi složité. V obrazové dokumentaci jsme zachytili nejcharakterističtější změny, které se objevovaly po podání isoprenalinu a lakoferinu.

V naší studii jsme pomocí biochemických markerů zjišťovali působení Lf na ischemicko-reperfuzní poškození myokardu, které bylo vyvoláno podáním isoprenalinu. Navázali jsme tak na pilotní studii, která nám umožnila poznat základní parametry podávaní Lf. V pilotní studii jsme provedli měření srdečního výdeje a odvozených parametrů s využitím Stewart-Hamiltonovy termodiluční

metody. Při i.v. podání Lf se neprokázal předpokládaný zřetelně protektivní účinek. V pilotní studii jsme využili jen mého počtu (tři a následně pět) modelových zvířat. V současné studii jsme proto použili čtyři skupiny, z nichž každá obsahovala sedm zvířat.

Použili jsme biochemické markery – troponin T a TBARS jako ukazatele ischemicko-reperfuzního poškození myokardu. U troponinu T se pozitivní trend v působení Lf bohužel nepodařilo prokázat. U TBARS jsme zaznamenali snížení hodnot (i když bez statistické významnosti) v porovnání s kontrolní skupinou. Při dalších studiích působení Lf by bylo vhodné sledování účinků při dlouhodobém podávaní Lf v různých dávkovacích schématech. Mohli bychom tak získat komplexnější pohled a prokázat nebo vyvrátit naše předpoklady o protektivním působení Lf.

## **6. ZÁVĚR**

V této rigorózní práci jsme se za pomocí biochemických markerů a histologického zhodnocení snažili objasnit vliv lakoferinu na isoprenalinové poškození myokardu. V teoretické části jsme se zaměřili na použití různých markerů akutního infarktu myokardu a působení chelátorů železa, které jsou v současné době používány v klinické praxi.

Pro studium protektivních účinků lakoferinu jsme vybrali isoprenalinový model, protože u AIM dochází k velmi podobnému stavu jako po exogenním podání katecholaminů. Dochází k podobnému, i když ne zcela identickému poškození myokardu jako při AIM. Ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové jsme ze vzorků odebrané krve získali hodnoty troponinu T a TBARS.

Histopatologické zhodnocení zahrnovalo odběr vybraných úseků myokardu, zpracování konvenční histologickou technikou pro světelnou mikroskopii včetně zpracování tzv. polosilných řezů a vlastní barvení pro vyhodnocení nálezů světelnou mikroskopii. Obarvené preparáty jsme pozorovali pod světelným mikroskopem. Následně jsme provedli jejich fotodokumentaci a nálezy prezentovali v obrazové dokumentaci.

Využili jsme biochemické markery troponin T a TBARS pro studium biochemického profilu vlivu Lf na model isoprenalinového poškození myokardu.

Tato studie byla umožněna díky grantu GA UK 98/2005/C/FaF. Tato práce by dále mohla být využita při dalším studiu protektivního účinku lakoferinu při poškození myokardu.

## **7. LITERATURA**

- Abrink M., Larsson E., Gobl A., Hellman L. : Expression of lactoferrin in the kidney : Implications for innate immunity and iron metabolism.Kidney Int. 2000 May; 57(5):2004-10
- AISLP 2007: SPC přípravků Cardioxane®, Desferal®, Exjade®, Ferriprox® RNDr. Bohuslav Škop, CSc
- Al-Refaie F. N., De Silva C. E., Wonke B., Hofibrand A. V.: Changes in transferrin saturation after treatment with the oral iron chelator deferiprone in patients with iron overload.Clin Pathol 1995;48:110-114
- Ambrosio, G., Tritto, I.: Myocardial reperfusion injury. Eur Heart J. Supp., 2002; 4 B: 28-30.
- Andrews, N. C.: Disorders of Iron Metabolism, The New England Journal of Medicine, Medical Progress, 1999,1986-1995
- Babuin L., Jaffe A. S.: Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. CMAJ 2005;173 (10):1191-202
- Baldwin D.A., Jenny E.R., Aisen P.: The effect of human serum transferrin and milk lactoferrin on hydroxyl radical formation from superoxide and hydrogen peroxide. 1984 Jul; J Biol Chem (259):21, 13391-4
- Duffy S.J., Biegelsen E.S., Holbrook M., Russell J. D., Gokce N., Keaney J. F., Vita J. A.:Iron Chelation Improves Endothelial Function in Patients With Coronary Artery Disease. Circ 2001;103:2799-2804
- Duffy, S. J., Biegelsen, E. S., Holbrook, M., Russell, J. D., Gokce, N., Keaney, J. F., Vita, J. A.: Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease. Circulation, 2001, 103:2799-2804
- Fujita K-I., Matsuda E., Sekine K., Iigo M., Tsuda H.: Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethane-treated rats. Carcinog. 2004; (25) 10: 1961-6
- Furmanski P., Li Z., Fortuna M.B., Swamy V.B., Ramachandra M. : Multiple molecular forms of human lactoferrin. J Exp Med 1989, Jan; 170:415-429
- Gibbons R.J., Valeti U.S., Araoz A., Jaffe A.S.: The quantification of infarct size. JACC 2004;44:1533-42

- 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
- Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1998;39:60-76.
- Hoffbrand A.V., Cohen A., Hershko C.: Role of deferiprone in chelation therapy for transfusional iron overload. *Blood* 2003; 102:17-23
- Kalinowskil D. S. , Richardson D. R.: The Evolution of Iron Chelators for the Treatment of Iron Overload Disease and Cancer. *Pharmacol Rev* 2005; 57:547–583
- Kevin L. G, Novalija E., Stowe D. F., PhD: Reactive Oxygen Species as Mediators of Cardiac Injury and Protection: The Relevance to Anesthesia Practice. *Anesth Analg* 2005;101:1275–87
- Kondrová E., Ozgová Š., Gut I.: Přirozené fenolické látky jako antioxidanty a prooxidanty a mechanismy jejich působení. *České pracovní lékařství* 2006; č.4,195-200
- Kruger A., Wojnowski L.: Cardiotoxicity of Anthracyclines –an Unsolved Problem. *Dtsch Arztebl* 2006; 103(37): A 2393–7.
- Kruzel M.L., Zimecki M. : Lactoferrin and immunologic disonance: clinical implication. *Immun Therap Exper.* 2002; 50, 399-410
- Kudla M.: Ischemické a reperfuzní poškození štěpu tenkého střeva. *Bulletin HPB chirurgie* 2001, No. 1, <http://www.hpb.cz/index.php?pld=01-1> ke dni 20.4.2007
- Masopust J.: Klinická biochemie - požadování a hodnocení biochemických vyšetření. Karolinum - nakl. UK Praha 1998, Část I. a II.
- Masopust J.: Patobiochemie buňky. Karolinum – nakl. UK Praha 2003
- Mimić-Oka J., Simić D. V, Simić T. P.: Free radicals in cardiovascular diseases. *Medicine and Biology* 1999;Vol.6, No 1,11 – 22
- Mladěnka P., Hrdina R., Bobrovová Z., Semecký V., Vávrová J., Holečková M., Palička V., Nachtigal P.: Calcium overload corresponds to other markers of myocardial injury and may be predicted from cardiac troponin T.2007
- Murthy V.V., Karmen A.: Troponin-T as a serum marker for myocardial infarction. *JCLA* 1998; Vol 11, 125-128

- Nagasako Y., Saito H., Tamura Z., Shimamura S., Tomita M.: Iron binding properties of bovin lactoferrin in iron rich solution. J Dairy 1993; 76:1876-1881
- Olsson, K. A., et al. : No increase of plasma malondialdehyde after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. Scand Cardiovasc J 2002;36(4): 237-40.
- Paulová H., Bochořáková H., Táborská E.: Metody stanovení antioxidační aktivity přírodních látek in vitro. Chemické listy Česká společnost chemická. 2004 ;vol. 98, no. 4, s. 174-179.
- Philipp S., Cui L., Ludolph B., Kelm M., Schultz R., Cohen M.V., Downey J.M.: Desferoxamine and ethyl-3,4-dihydroxybenzoate protect myocardium by activating NOS and generating mitochondrial ROS. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;290:H450-H457
- Ramu E., Korach A., Houminer E., Schneider A., Elami A., Scgwallb H.: Dexrazoxane prevents myocardial ischemia/ reperfuzion-induced oxidative stress in the rat heart. Card Drugs Ther 2006;20:343-348
- Roth, E., et al. :Lipid peroxidation and scavenger mechanism in experimentally induced heart infarcts. Basic Res Cardiol 1985; 80(5): 530-6.
- Rottbauer W., Greten T., Muller-BardorffM., Remppis A., Zehelein J., Grunig E., Katus HA.: Troponin T: a diagnostic marker for myocardial infarction and minor cardiac cell damage.Eur Heart J. 1996 Dec;17 Suppl F:3-8.
- Rundquis B., Elam M., Bergmann-Sverrisdottir Y., Eisenhofer G., Friberg P.: Increased Cardiac Adrenergic Drive Precedes Generalized Sympathetic Activation in Human Heart Failure. Circ 1997;95:169-175.
- Sanches L., Lujan L., Oria R., Castillo H., Perez D., Ena C. M., Calvo M.: Synthesis of lactoferrin and transport of transferrin in the lactating mammary gland of sheep. J Dairy Sci 1992; 75:1257-1262
- Tam F.T., Leung-Toung R., Li W., Wang Y., Karimian K. Spino M.: Iron chelator research: Past, present and future. Curr Med Chem, 2003; 10: 983-995

- Tappia, P. S., et al.. "Role of oxidative stress in catecholamine-induced changes in cardiac sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> transport." Arch Biochem Biophys 2001;387(1): 85-92
- Troots F. J., Steijns J., Saris W.H.M.; Brummer R.J.M. : Gastric digestion of bovine lactoferrin *in vivo* in adults. J. Nutr. 2001; 131:2101-2104
- Vacek Z.: Histologie a histologická technika., Avicenum1998, str.286 – 359
- Vykrutová E.: Studium vlivu chelátora železa lakoferinu na model akutního infarktu myokardu (diplomová práce) 2006
- Widimský Petr Prof. MUDr., DrSc., Janoušek Stanislav Doc. MUDr., CSc., Vojáček J., Prof. MUDr DrSc.: Doporučení pro diagnostiku a léčbu akutního infarktu myokardu (Q-typ // s elevacemi ST // s raménkovým blokem) Česká kardiologická společnost: <http://www.kardio-cz.cz/index.php?&desktop=clanky&action=view&id=213> ke dni 20.4. 2007
- Zimmerman J, et al. Diagnostic Marker Cooperative Study for the diagnosis of myocardial infarction. Circulation, 1999;99:1671- 7.