

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

# **Biologická úloha laktoferinu**

Vedoucí bakalářské práce :

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Vedoucí katedry :

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové 2008

Veronika Filipová

Děkuji panu Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při psaní této bakalářské práce. Děkuji také panu Mgr. Přemyslu Mladěnkovi za provedení experimentu, možnost účasti při experimentu a poskytnutí informací nezbytných k sepsání této práce. Dále děkuji paní laborantce Pavlíně Jabůrkové a ostatním laborantkám za pomoc při zpracování histologické části bakalářské 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.

"Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány."

*Jilipona'*

<b>OBSAH</b> .....	3
<b>ZKRATKY</b> .....	5
<b>ABSTRAKT</b> .....	6
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>1. ÚVOD</b> .....	8
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	10
2.1 LAKTOFERIN .....	11
2.1.1 Výskyt .....	11
2.1.2 Struktura .....	11
2.1.3 Význam železa (Fe) pro organismus.....	13
2.1.4 Biologická funkce laktoferinu.....	15
2.2 ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ.....	17
2.2.1 Ischemická choroba srdeční .....	17
2.2.2 Infarkt myokardu .....	17
2.2.3 Reperfúze a reperfúzní paradox.....	18
2.2.4 Katecholaminy a ISO .....	18
2.2.5 Laboratorní vyšetření IM .....	19
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	22
3.1 EXPERIMENT.....	23
3.1.1 Zvířata .....	23
3.1.2 Chemikálie a přístroje .....	23
3.1.3 Provedení experimentu.....	24
3.2 HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ VZORKU .....	25
3.2.1 Chemikálie, přístroje a nástroje při histologickém zpracování .....	25

3.2.2 Fixace .....	27
3.2.3 Krájení .....	30
3.2.4 Barvení .....	30
3.2.5 Zamontování do kanadského balzámu .....	33
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>34</b>
4.1 VLIV Lf NA KONCENTRACI SRDEČNÍHO TROPONINU T.....	35
4.2 HISTOLOGICKÉ ZHODNOCENÍ EXPERIMENTU .....	36
<b>5. DISKUSE .....</b>	<b>39</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>42</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>44</b>

## ZKRATKY

ALT	alaninaminotransferasa
AST	aspartátaminotransferasa
CD14	receptor pro LPS
CK	kreatinkinasa
i. g.	intrastrická aplikace
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL	interleukin
IM	infarkt myokardu
ISO	isoprenalin
LD	laktátdehydrogenasa
Lf	laktoferin
LA	laktoferin
LPS	lipopolysacharid
p.o.	perorální podání
s.c.	subkutáně
TfR	transferinový receptor
TNF $\alpha$	tumor nekrotisující faktor $\alpha$
TnI	troponin I
TnT	troponin T

## ABSTRAKT

Laktoferin je glykoprotein o molekulové hmotnosti 80 kDa se schopností vázat železo a jiné kovy. Tomuto glykoproteinu je připisována řada biologických funkcí, které jsou prozatím ve stádiu studií. Vyskytuje se v mléce a v řadě dalších sekretů jako např. slzy, nosní sekret, sliny, střevní hlen a další. Též je obsažen v sekundárních granulích neutrofilů. Molekula laktoferinu je rozdělena na podjednotky N a C. Každá podjednotka má 2 domény N1+N2 a C1+C2. A v každé podjednotce je vazebné místo pro železo.

V experimentu jsme se zabývali studiem vlivu laktoferinu na poškození srdce po infarktu myokardu. K experimentu jsme použili 10 samců potkanů o iniciální hmotnosti 170-192 g, kterým byl laktoferin podáván pomocí gastrické sondy. Dále byl polovině z nich podán isoprenalin pro navození stavu podobnému infarktu myokardu. Krev byla odebrána a změřena koncentrace srdečního troponinu T. Tkáně byly ihned fixovány a dále zpracovány pro histologické pozorování. Koncentrace troponinu byla vynesena do grafu a histologické řezy pozorovány mikroskopicky.

Z výsledků je zřejmé, že hodnoty srdečního troponinu T při podání isoprenalinu a laktoferinu nejsou příliš odlišné od hodnot u zvířat, kterým byl podán pouze isoprenalin. V experimentu jsme použili příliš malý počet experimentálních zvířat, a proto nelze porovnat výsledky.

## **ABSTRACT**

Lactoferrin is an iron-binding glycoprotein with molecular weight about 80,000 Da. Lactoferrin is a multifunctional protein with many biological functions. Functions of lactoferrin are still being studied for now. It is found in milk and in most exocrine secretions including tears, saliva, nasal secretions, intestinal mucus and so on. This protein is secreted by the secondary granules of neutrophils. The glycoprotein folds into globular lobes, N and C. And the lobes are divided into two domains, N1 and N2, and C1 and C2. The iron-binding site is situated between the domains in each lobe.

In our experiment we studied the influence of lactoferrin on damage of the heart after myocardial infarction. In the experiment were used 10 male rats about starting weight 170-192 grams. Lactoferrin was administered by gastric gavage. And half of them was administered isoprenaline for inducing myocardial infarction. In the blood are tested concentration of cardiac troponin T and tissues are fixed and adapted for histodifferentiation. We are constructing graph from returns of concentration of cardiac troponin and preparation we are studying microscopically.

Experiment results show that concentration of cardiac troponin T aren't different between rats with lactoferrin and without lactoferrin. In our experiment we used small number of experimental animals, that's why we can't compare results.



# 1. ÚVOD

Laktoferin je glykoprotein o molekulové hmotnosti okolo 80 kDa. Nachází se v mléce a dalších sekretech exokrinních žláz. Nachází se například v slzách, nosním sekretu, slinách, střevním hlenu, genitálních sekretech a také je obsažen v sekundárních granulích neutrofilů. Laktoferin má schopnost vazby železa. Ve své molekule má dvě vazebná místa pro železo. Podílí se tedy na metabolismu železa v organismu.

Laktoferin je multifunkční protein. Mezi funkce laktoferinu patří regulace absorpce železa v organismu, antibakteriální ochrana organismu, regulace imunitní odpovědi, protizánětlivý účinek, vliv laktoferinu na střevní viry a parazity a další. Řada jeho funkcí však není zcela objasněna a je předmětem mnoha studií. (1, 5, 6, 7, 10)

Cílem této práce je poukázat na protektivní vliv laktoferinu po navození stavu podobnému infarktu myokardu. Cílem je především poukázat na ovlivnění možných morfologických a funkčních změn v myokardu po experimentálním podání s.c. isoprenalinu potkanům krátkodobě premedikovaným i.g. podáváním laktoferinu.

Na Katedře biologických a lékařských věd a na Katedře farmakologie intenzivně probíhá výzkum protektivních účinků laktoferinu na organismu.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## **2.1. Laktoferin**

Laktoferin je multifunkční glykoprotein, který má schopnost vázat železo. Někdy bývá též nazýván laktotransferin. Název laktoferin je odvozen z latinských slov ferrum – železo a lac – mléko. Laktoferin byl objeven v roce 1939 v kravském mléce a roku 1960 byl poprvé izolován z lidského mateřského mléka.

Laktoferin společně s transferinem a ovotransferinem patří do rodiny železo-vázajících proteinů nazývaných transferiny.(10)

Laktoferin je protein vázající železo o molekulové hmotnosti okolo 80 000 Da (80 kDa). V molekule má dvě vazebná místa pro železo. Laktoferinu je připisována řada biologických funkcí, např. regulace absorpce železa, regulace imunitního systému, podpora růstu lymfocytů, inhibice růstu bakterií a mnoho dalších.(6)

Laktoferin má řadu biologických funkcí. Tyto funkce však nejsou zcela objasněny a jsou předmětem mnoha studií.

### **2.1.1. Výskyt:**

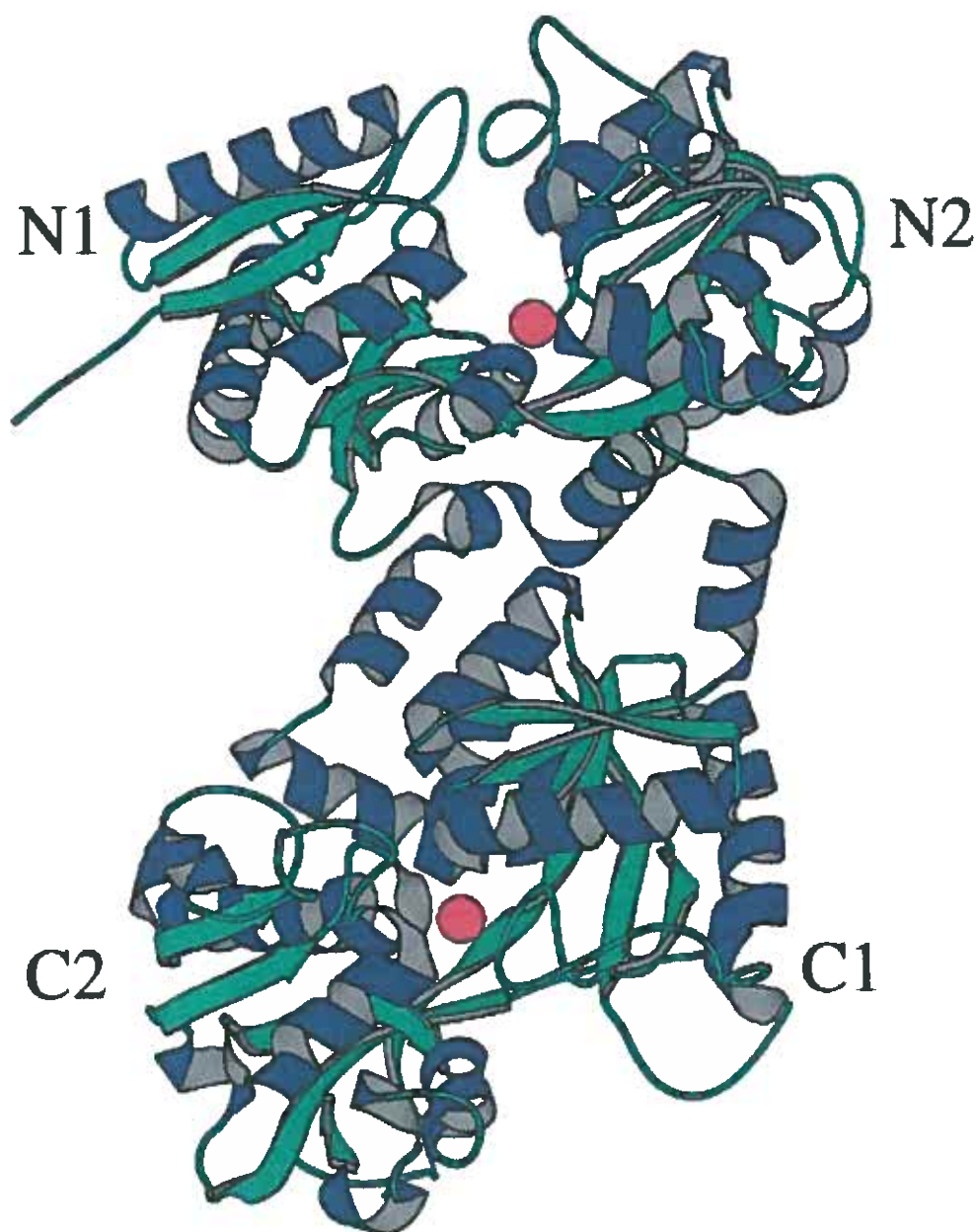
Laktoferin se vyskytuje v mléce a mnoha dalších sekretech exokrinních žláz. Nachází se například v slzách, nosním sekretu, slinách, střevním hlenu, genitálních sekretech a také je obsažen v sekundárních granulích neutrofilů. (1)

### **2.1.2. Struktura:**

Laktoferin je glykoprotein, tzn. že kromě proteinové struktury, skládající se z aminokyselin, obsahuje ve své molekule navázanou cukernou složku.

Molekula laktoferinu je rozdělena na podjednotky N a C, které jsou homologní. Podjednotky jsou spojeny polypeptidovým řetězcem. Každá podjednotka má 2 domény N1+N2 a C1+C2. V každé podjednotce jsou domény kovalentně spojeny 2 řetězci (ve formě beta skládaného listu, antiparalelně uspořádaných). Mezi doménami je místo pro vazbu železa. Molekula může být ve formě vázající železo, nebo ve formě volné. Ve formě s navázaným železem dochází ke změně konformace a domény N1 a N2 se uzavřou, mezi nimi je navázáno železo. To samé platí i pro domény C1 a C2.

Naopak pokud molekula neobsahuje železo jsou domény oddáleny a vzniká mezi nimi štěrbina, která je přístupná pro vazbu železa. (3)



Obr. 1 – Molekula laktoferinu klisny s navázaným Fe<sup>3+</sup> v každé podjednotce (Esnouf, 1997).

Struktura laktoferinu klisny se shoduje ze 70 % s ostatními laktoferiny. (10)

### **2.1.3. Význam železa (Fe) pro organismus :**

Laktoferin je schopný vázat železo, je však schopný vázat i jiné kovy, ale s daleko menší afinitou. Váže například:  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{VO}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , a další. Má však největší afinitu k železu. (12)

Množství vstřebaného železa je od 3 % do 6 % požitého množství.

Většina železa se vstřebává v horní části tenkého střeva. Duodenum a přilehlá část jejunu obsahují tedy nejvíce železa vhodného pro resorpci. Slizniční buňky mají intracelulární přenašeč železa, z něhož se část železa dostává do mitochondrií a zbytek je rozdělen mezi apoferitin v buňkách sliznice a transferin. Transferin je transportní polypeptid železa v plasmě. Tento polypeptid má dvě vazebná místa pro železo. Naopak apoferitin je bílkovina tvořená 24 podjednotkami, která se nachází v mnoha tkáních, a která po spojení s železem tvoří feritin. Feritin je hlavní zásobárnou železa ve tkáních. Molekuly feritinu v lyzozomálních membránách mohou agregovat v depozita, která obsahují až 50 % železa. Tato depozita se nazývají hemosiderin. (2)

Zásoby železa jsou tedy v podobě feritinu nebo hemosiderinu. V plazmě je železo vázáno na transportní protein transferin. Navázáním transferinu na specifický transferinový receptor (TfR) se železo dostává do buněk, především erytrocytů, ve kterých je využito pro syntézu hemu. (8)

Tělo dospělého člověka obsahuje okolo 4 g železa a z toho tvoří asi 3g hemoglobin v erytrocytech. Dále je železo obsaženo myoglobinu a mnoho enzymech, jako např. kataláza, peroxidázy, cytochromy. (9)

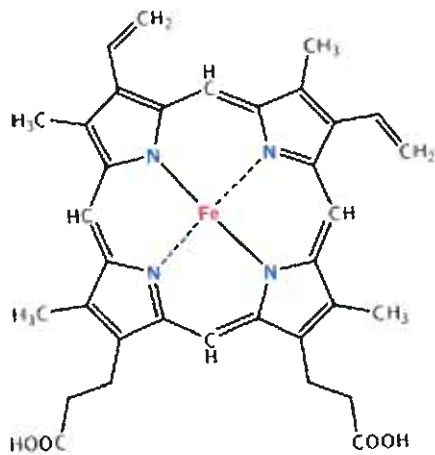
Fyziologická hladina železa v séru je u mužů 14,3 – 26,00  $\mu\text{mol/l}$  a u žen 10,7 – 21,5  $\mu\text{mol/l}$ . Novorozenci mají vyšší hladinu. (9)

#### **Biologický význam železa pro organismus :**

Hlavní funkcí železa je jeho zastoupení v molekule hemoglobinu, který je nezbytný pro přenos kyslíku v organismu.

Hemoglobin je krevní bílkovina (hemoprotein) o molekulové hmotnosti 64 450 Da, která vyplňuje erytrocyty. Molekula hemoglobinu se skládá ze 4 globinových řetězců a 4 hemů. Vždy dva a dva řetězce jsou identické. Základem hemu je protoporfirin (= tetrapyrol). V hemu je železo ve formě

$\text{Fe}^{2+}$ .  $\text{Fe}^{2+}$  je čtyřmi vazbami vázáno v tetrapyrolovém kruhu, jednou vazbou na globin a jednou vazbou je schopný vázat kyslík. (8)



Obr. 2 – Struktura hemu

Železo je dále obsaženo v myoglobinu, cytochromech a mnoha enzymech. Je tedy nezbytnou součástí pro správnou funkci organismu.

Ionty  $\text{Fe}^{2+}$  mají i negativní vliv na organismus, protože se účastní tvorby nebezpečného hydroxylového radikálu z peroxidu vodíku. Tato reakce je nazývána Fentonova reakce:



Hydroxylový radikál může způsobit poškození životně důležitých molekul, jako jsou nukleové kyseliny a bílkoviny, nebo může nastartovat řetězovou reakci lipoperoxidace. Ve Fentonově reakci se uplatňují ionty  $\text{Fe}^{2+}$ . Redukci  $\text{Fe}^{3+}$  může vyvolat např. i superoxidový radikál ( $\text{O}_2^-$ ), nebo za určitých okolností i kyselina askorbová, která v tomto případě má vlastně prooxidační účinky. Této reakci brání transferrin, který váže volné železo. Další ochranu tvoří ceruloplazmin, který oxiduje  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$ . (9)

Schopnost laktoferinu chelatovat železo snižuje tedy také tvorbu kyslíkových radikálů.

#### **2.1.4. Biologické funkce laktoferinu :**

Laktoferinu je připisováno velké množství biologických funkcí na organismus. Nejsou však prozatím zcela objasněny a pravděpodobně řada z nich není do dnešní doby ještě objevena. Laktoferin je tedy předmětem experimentů, které zkoumají jeho strukturu, vlastnosti, ale i možnost jeho využití pro léčbu či prevenci onemocnění. Zde uvádím pouze některé z nich:

##### **Příklady funkcí laktoferinu :**

#### **1. Laktoferin se podílí na regulaci absorpce železa v organismu. (6)**

##### **2. Antibakteriální ochrana organismu:**

Antibakteriální funkce laktoferinu je zprostředkována dvěma různými mechanismy:

A<sub>1</sub> První mechanismus využívá schopnosti laktoferinu vázat železo s vysokou afinitou. Bakterie využívají železo ke svému růstu. Laktoferin tím, že váže železo, brání bakteriálnímu růstu. Laktoferin je tedy schopný pozastavit růst četné řady mikroorganismů a to gram-negativních i gram-positivních bakterií a kvasinek. Pozastavení růstu je však často dočasné, protože některé bakterie, především gram-negativní bakterie se mohou na nedostatek železa adaptovat a vytváří jednoduchý výběžek ,kterým mohou železo odebírat z laktoferinu. (1)

B<sub>1</sub> Druhým způsobem antibakteriální ochrany je přímé baktericidní působení laktoferinu. Laktoferin má přímý baktericidní účinek na některé G- a G+ bakterie, který není způsoben odebíráním Fe bakteriím. Ve fyziologických koncentracích ničí laktoferin buněčnou stěnu tím, že z buněčné stěny uvolňuje lipopolysacharidy. Výzkumy naznačují, že za baktericidní působení je zodpovědná doména N-konce laktoferinu. Aminokyseliny zodpovědné za baktericidní působení jsou vzdálené od aminokyselin podílejících se na vazbě Fe. To poukazuje na fakt, že baktericidní působení a vazba Fe jsou na sobě nezávislé. (1)

#### **3. Regulace imunitní odpovědi organismu :**

Laktoferin se podílí na regulaci imunitního systému. (5)

Laktoferin je uvolňován ze sekundárních granulí neutrofilů. Byl prokázán jeho vliv na myelopoezu a to jak pozitivní, tak i negativní. Systémová bakteriální



infekce je provázena vzestupem hladiny laktoferinu v séru secernovaného granulocyty a doprovodným snížením hladiny železa v séru. (1)

Ve studiích *in vitro* a *in vivo* byl prezentován vliv laktoferinu na inhibici produkce několika cytokinů včetně TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$ , které jsou klíčovými mediátory zánětlivé reakce. Laktoferin se váže na lipid A, který se uvolňuje z lyzovaných bakterií, a tím zabraňuje vazbě tohoto lipidu na CD14 receptory makrofágů. Dochází tedy ke snížení produkce TNF- $\alpha$  a zmírnění rozvoje zánětlivé reakce. (1)

Receptory pro laktoferin jsou na povrchu myeloblastů, monocytů, makrofágů, lymfocytů a poškozených epiteliálních buňkách, proto je navrhována schopnost laktoferinu řídit produkci cytokinů v těchto buňkách. (1)

#### 4. Profizánětlivý účinek laktoferinu:

Laktoferin je schopen inhibice několika cytokinů (např. TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6,...), které jsou hlavními mediátory zánětlivé reakce. Inhibice je způsobena vazbou Lf na Lipid A, který je součástí lipopolysacharidu uvolňujícího se z bakterií a tím je znemožněno navázání lipopolysacharidu k CD14 receptorům na povrchu makrofágů a tím se zmírňuje rozvoj zánětlivé reakce. (1)

#### 5. Vliv laktoferinu na střevní viry :

Některé studie ukazují na schopnost apo- laktoferinu (laktoferin ochuzený o železo) a holo- laktoferinu (laktoferin saturovaný železem) z hovězího mléka potlačit vazbu a replikaci rotaviru *in vitro*. Ne všechny zkoumání však tuto vlastnost potvrzují. Podobně je poukazováno na schopnost laktoferinu předejít replikaci adenoviru. (7)

#### 6. Vliv laktoferinu na střevní parazity :

Lidský i hovězí laktoferin vykazují giardicidní účinek. Způsobují změny ve struktuře *Giardia* trophozoites. Dá se tedy říci, že laktoferin má funkci slizniční ochrany proti Giardiaim. (7)

Jak již bylo řečeno laktoferin je multifunkční protein a má tedy nespočetné množství funkcí na organismus. Většina z nich je však teprve ve stádiu zkoumání.

## **2.2. ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ**

Laktoferin má silné železo-chelatační vlastnosti a má 260x vyšší afinitu k železu než transferin. Schopností chelatace trojmocného železa působí proti tvorbě kyslíkových radikálů. Z této schopnosti je předpokládáno, že laktoferin bude bránit vzniku volných kyslíkových radikálů u ischemicko-reperfuzního poškození. (5,15)

Volné radikály poškozují především nukleové kyseliny, proteiny a lipidy.

### **2.2.1. Ischemická choroba srdeční**

Fyzická námaha či psychické vzrušení vyvolávají větší spotřebu O<sub>2</sub> myokardem proto, že v důsledku aktivace sympatiku roste tepová frekvence i kontraktilita myokardu. Zdravé srdce na to reaguje snížením odporu koronárních cév a tím tedy zvyšuje průtok krve koronárním řečištěm a vyrovnává tedy kyslíkovou bilanci. Průtok krve koronárním řečištěm se zvyšuje až na pětinasobek klidové hodnoty. Tento jev se nazývá *koronární rezerva*. Tzv. koronární rezerva je dána tím, že koronární cévy jsou v klidu ve stavu konstriktce a dilatují se až v případě potřeby.

**Ischemická choroba srdeční (ICHS)** je dána snížením koronární rezervy a je proto snížena nabídka O<sub>2</sub> při zátěži a psychickém vypětí. Projevem ICHS je levostranná bolest na prsou, v paži a krku. (11)

Hlavní příčinou ICHS je zúžení proximálních koronárních arterií aterosklerózou. Trvá-li ischemie myokardu delší dobu, dochází zhruba po 1 hodině k nekróze tkáně, tzn. infarktu. (11)

### **2.2.2 Infarkt myokardu**

Nejzávažnějším typem ICHS je **akutní infarkt myokardu**. Dochází k ischemii a následně nekróze části myokardu následkem úplné okluze koronární tepny. Mortalita tohoto onemocnění je stále vysoká. (9)

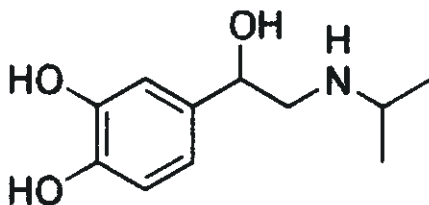
Infarkt myokardu (IM) diagnostikujeme podle nejméně dvou příznaků z tzv. Triády příznaků IM. Mezi triádu patří : více než půl hodiny trvající bolest na hrudi, změny na EKG, laboratorní známky.(9)

### 2.2.3. Reperfúze a reperfúzní paradox :

Obnovení prokrvení, tedy reperfúze ischemické tkáně, je nezbytné pro zachování životaschopnosti myokardu. Reperfúze však vede k produkci toxických reaktivních forem kyslíku (volné kyslíkové radikály, ROS-reactive oxygen species). Tento jev se nazývá *reperfúzní paradox*. (5,15)

Volné kyslíkové radikály pak způsobují poškození tkání.

### 2.2.4. Isoprenalin (Isoprenaline (INN) nebo isoproterenol (USAN))



4-[1-hydroxy-2-(1-methylethylamino)]ethylbenzen-1,2-diol

Obr. 3.- Struktura isoprenalinu (16)

Na myokard má isoprenalin pozitivní inotropní, chronotropní, dromotropní a batmotropní efekt. Zvyšuje srdeční výdej a spotřebu kyslíku myokardem. Aktivací  $\beta_2$  receptorů snižuje periferní rezistenci a cévní vazodilataci. Klesá systolický a diastolický krevní tlak. Dále svým působením na presynaptické  $\beta_2$  receptory působí zvýšené uvolňování noradrenalinu z postsynaptických zakončení sympatiku. V minulosti byl isoprenalin používán jako krátkodobý kard.ostimulas, bronchodilatans a při léčbě astmatu. Isoprenalin však zhoršuje ischemii a to především tím, že zvyšuje spotřebu kyslíku myokardem. Z tohoto důvodu se v současné době používá především pro experimentální účely. (16)

Isoprenalin je syntetický katecholamin. Po jeho podání dochází k podobnému stavu jako je infarkt myokardu. Isoprenalin je tedy vhodný pro studium infarktu myokardu a látek působících proti vzniku reaktivních forem kyslíku. (15)

Odborný článek udává, že po podání s.c. isoprenalinu v dávce 67mg/kg tělesné hmotnosti zvířete vyvolalo charakteristické změny srdeční tkáně. Ihned po smrti experimentovaného potkana bylo jeho srdce vyjmuto, fixováno a zpracováno pro histologické pozorování a následně pozorováno světelnou i elektronovou mikroskopií. Na histologických obrazech byla vidět koagulační nekróza a fragmentace fibril, které

reprezentují poškození srdeční tkáně infarktem. Dále byli zřetelné makrofágy, fibroblasty a kolagenová vlákna, která charakterizovala poinfarktový stav. (4)

### **2.2.5. Laboratorní vyšetření IM :**

V krevním séru (plazmě) jsou prokazovány intracelulární bílkoviny, které se uvolňují z ischemického ložiska myokardu. Trvá-li ischemie pouze několik hodin uvolňují se do krevního oběhu pouze bílkoviny obsažené v cytoplazmě svalových buněk (např. AST, CK, myoglobin a malá část TnT). Na rozdíl pokud trvá ischemie delší dobu dochází i k uvolňování do krevního oběhu bílkovin tvořících fibrilárního kontraktinálního komplexu a to především TnT a TnI. (9)

Jako nejlepší pro potvrzení či vyloučení IM se jeví myoglobin, CK-MB mass a kardiální troponin T nebo I.

### **Biochemické markery IM :**

AST (aspartátaminotransferáza) stoupá za 4-6 h po začátku ischemie, vrchol pozorujeme za 1-2 dny a k normálu se vrací do 5 dnů. AST se vyplavuje z cytoplazmy a mitochondrií. Nevýhodou je malá specifita AST z důvodu jeho uvolňování i při poškození kosterního svalstva, hemolýze a nekróze hepatocytů. Pro IM se stanovuje poměr AST/ALT a tento poměr bývá větší než 1. (9)

CK (kreatinkináza) se uvolňuje do krve podobně jako AST. Nemá také příliš velkou specifitu pro svoji aktivitu v kosterním svalu. (9)

CK má 3 typy izoenzymů, které jsou tvořeny dvěma podjednotkami a to podjednotka M (muscle) a podjednotka B (brain). Pro myokard je typický izoenzym CK-MB. Nevýhodou je přítomnost CK-MB v kosterním svalu. Celkové množství CK-MB v kosterním svalu vzhledem k podílu svalové hmoty na celé hmotnosti organismu však přesahuje množství CK-MB v myokardu. (15)

Pro stanovení IM se používá tzv. CK-MB mass. Koncentrace se uvádí v hmotnostních jednotkách ( $\mu\text{g/l}$ ). Na rozdíl od stanovení aktivity CK-MB ( $\mu\text{kat/l}$ ) se prokáží i částečně degradované molekuly, které ztratily svoji enzymovou aktivitu. Stanovení se provádí stanovením antigenu. (9)

LD(laktátdehydrogenáza) stoupá v séru u IM nejpomaleji a vrcholu dosahuje až za 2-3 dny a zvýšená zůstává až 2 týdny. LD se však vyskytuje prakticky ve v šech tkáních, a proto je pro IM málo specifická. (9)

Myoglobin je bílkovina nacházející se v cytoplazmě a v krvi se objevuje již za 0,5-2 hodiny po IM. Protože molekuly ze srdečního svalu i kosterního svalu jsou totožné, je stanovení myoglobinu dosti nespecifické, avšak se myoglobin používá jako časný marker IM. (9)

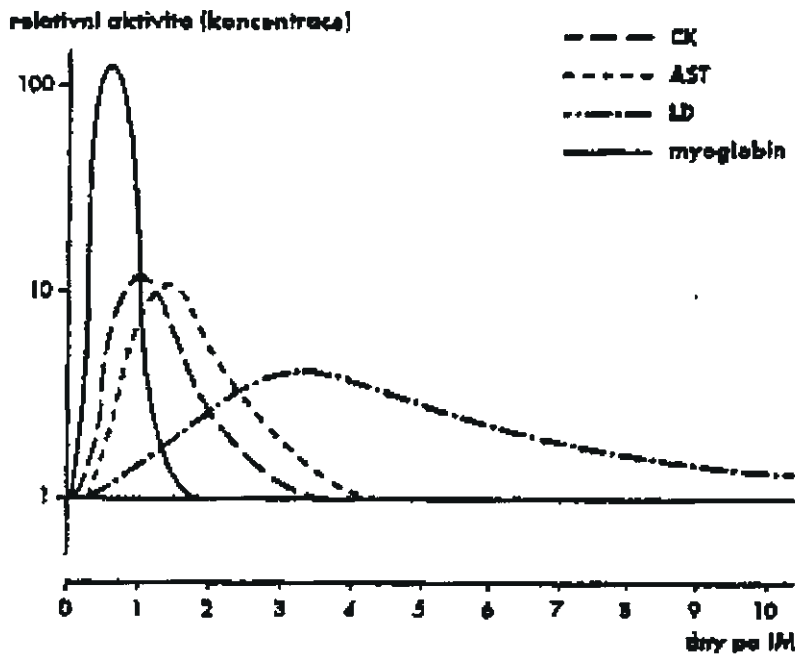
Troponin T a I (TnT a TnI) se jeví jako prozatím nejlepší markery IM.

Troponinový komplex je tvořen třemi bílkovinami, které jsou vázány na tropomyozin příčně pruhovaného svalstva. Primární struktura molekul troponinu kosterního svalu se liší od struktury troponinu myokardu a je možné je odlišit imunochemicky. (9)

TnT se v krvi objevuje současně s CK a vrcholu dosahuje kolem 4.dne a hodnoty se vrací k normálu za více než 2 týdny. (9)

TnI má menší podíl snadno uvolnitelné cytoplazmatické frakce, ale vysokou specifičnost. Lze tedy říci, že TnT má o něco větší citlivost a Tn I je zase o něco více specifičtější. (Racek)

Význam laboratorního vyšetření spočívá především ve stanovení diagnózy akutního IM, odlišení akutního IM od jiných forem ICHS či od jiné příčiny bolesti na hrudi nebo v břiše, stanovení komplikací při léčbě IM, stanovení velikosti infarktového ložiska a tedy i prognózy pacienta a stanovení rekanalizace věnčité cévy a reperfuze ischemického ložiska. (9)



Obr. 4 – Časový průběh aktivit klasických ukazatelů infarktu myokardu a koncentrace myoglobinu v séru (9)

# **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## **3.1. EXPERIMENT :**

### **3.1.1 Zvířata :**

K experimentům jsme použili samce potkanů kmene Wistar (Bio Test sro. Česká republika) o iniciální hmotnosti 170-192g. Zvířata byla chována ve viváriu Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové se zajištěním ventilace 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 Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

### **3.1.2. 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)
- isoprenalin (Zentiva a.s., Česká republika)
- laktoferin (SVUS Hradec Králové, ID: QDOD8A10016)
- 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

### 3.1.3. Provedení experimentu :

K experimentu bylo použito 10 zvířat. Pomocí gastrické sondy byla podávána suspenze laktoferinu v 0,5 ml aqua pro inj.. Některým zvířatům byl podávám pouze laktoferin (LA) a ostatním laktoferin a s.c. isoprenalin (LAI). Isoprenalin byl podávám s.c. v dávce 100 mg/kg. Dávkování laktoferinu je uvedeno v následující tabulce.

zvíře	LA 2mg v 0.5 ml gastrické sondy				LA 2,5 mg v 0.5 ml gastrické sondy					ISO	experiment
	8.IV	9.IV	10.IV	11.IV	14.IV	15.IV	17.IV	18.IV	21.IV		
LA20	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	23.IV
-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	23.IV	Ztráta krve → +
LAI20	X	X	X	X	X	X	X	X	X	23.IV	24.IV
LA21	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	28.IV
LA22	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	28.IV
LAI21	X	X	X	X	X	X	X	X	X	28.IV	29.IV
LAI22	X	X	X	X	X	X	X	X	X	5.V	6.V
-	X	X	X	X	X	X	X	X	X	6.V	anestézie → +
LA23	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-	15.V
LAI23	X	X	X	X	X	X	X	X	X	15.V	16.V

Obr. 4 - Dávkování laktoferinu a isoprenalinu

Neoznačená zvířata uvedená v tabulce uhynula. Ostatní byla náhodně rozdělena, jedné polovině z nich byl podán isoprenalin. Po provedení experimentu byla odebrána krev a zvíře usmrceno 1M vodným roztokem KCl. Orgány zvířete byly ihned fixovány pro histologické pozorování ve světelném mikroskopu. Hladina srdečního troponinu T byla změřena v séru na biochemickém oddělení Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Dávku i.g. podávaného laktoferinu jsme zvýšili z 2 mg na 2,5mg z důvodu rostoucí hmotnosti experimentovaných potkanů.

## **3.2. HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ VZORKU :**

Tkáň odebranou pro histologické vyšetření jsme ihned uložili do fixační tekutiny a označili číslem vzorku.

Vzorek byl fixován, zalit do zkvalitněného parafínu, nakrájen, obarven a nakonec mikroskopicky pozorován.

### **3.2.1. 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)
- sirnatan 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 sklíčka
- sáňkový mikrotom (Leitz-Wetzlar, Reichert)
- rotační mikrotom (MPS-2)
- mikroskop Olympus AX-70 (Olympus Ltd., Japan)
- digitální kamera Pixeling PL-A642 (Vitana Corp., USA)

- software NIS verze 2.3(Laboratory Imaging Prague, ČR)

### **3.2.2. Fixace :**

Fixace je rychlé vysrážení (denaturace) bílkovin protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky, které má zabránit samovolnému rozkladu tkáně (autolýze). Autolýza je dána působením enzymů. Fixace musí být zároveň šetrná denaturace, aby byla zachována struktura tkáně, jakou má tkáň zaživa. Avšak neznáme prostředek, který by tkáň vůbec nezměnil. Vždy dochází ke změnám struktury, například vysrážení bílkovin, smrštění tkáně, vznik artefaktů. Tyto změny mají být co nejmenší. Dále fixace musí rychle pronikat do tkáně, aby došlo ke stejnoměrnému profixování. (14)

Fixace musí splňovat tři základní podmínky :

1. co nejlépe zachovat strukturu tkáně
2. zachovat barvitelnost tkáně
3. rychle pronikat do tkáně

#### Provedení fixace :

Kousek tkáně se vloží do fixační tekutiny. Je třeba dodržovat určitá pravidla:

- Tkáň musí být do fixační tekutiny vložena co nejdříve po odběru. 4ím déle po smrti se provádí fixace, tím více je porušena autolytickými změnami.
- Tkáňový bloček nesmí být příliš velký (tloušťka do 1cm) Jinak by docházelo k profixování jen povrchové vrstvy. Pokud se fixují celé orgány je nutno vstříknout fixační tekutinu přímo do cév.
- Plošné orgány, které se krouží (např. střeva, blány), je nutno napínat na korkovou ploténku.
- Musí být dostatečné množství fixační tekutiny (20X až 50X víc než je objem tkáňového bločku).
- Fixační tekutina musí mít dostatečný přístup k tkáňovému bločku.
- Doba fixace je různá a záleží na druhu fixační tekutiny a velikosti vzorku. (14)

V experimentu jsme použili Bouinovu fixační tekutinu a 40% paraformaldehyd

### BOUINOVA FIXAČNÍ TEKUTINA :

Bouinova tekutina je žluté barvy a patří k nejčastěji používaným fixačním tekutinám. Rychle proniká do tkáně, která se pak dobře barví. Je však nevhodná k fixaci krevnatých orgánů(např. slezina), protože krev se působením této tekutiny sráží a vytváří tvrdou hmotu, která se těžko krájí. Dále se nehodí k fixaci tkání určených k zalití do celoidinu, protože zabraňuje pronikání celoidiu do tkáně.(14)

Průměrná doba fixace je 24 hodin. Tkáň se nesmí vypírat ve vodě.

Příprava:

nasycený roztok kyseliny pikrové ..... 300ml

formol..... 100ml

Před použitím nutno přidat 5 ml kyseliny octové ledové na každých 100ml roztoku.

### Zpracování vzorku po fixaci Bouinovou tekutinou :

80% etanol..... 1 hod

I. aceton..... ráno

II. aceton ..... v poledne

III. aceton ..... odpoledne

nechat přes noc

I. xylén ..... 10 min

II. xylén ..... 20 min

I. parafin ..... 2 hod

II. parafin..... do 2. dne

Zalití do zkvalitněného parafínu

### FORMOL :

Formol je jedna z nejpoužívanějších fixačních tekutin. V laboratoři byl použit 4% para-formaldehyd. Formol je bezbarvá kapalina dráždivého zápachu.

### Zpracování vzorku po fixaci formolem :

70% etanol.....30 min

70% etanol.....30 min

80% etanol..... 3 hod

90% etanol..... 2 hod

96% etanol.....nechat přes noc

aceton I. .... 30 min

aceton II. .... 30 min

xylén I. .... 2 hod

xylén II. .... 4 hod

parafin I. .... nechat přes noc

parafin II..... nechat přes noc

zalití do zkvalitněného parafínu

### Zalití do zkvalitněného parafínu :

Zkvalitněný parafín připravíme tak, že k přetavenému parafínu přidáme malé množství včelího vosku a to okolo 3 – 5 g na 100 g parafínu. Parafín s voskem umožňuje krájení velmi tenkých řezů.

Zalití jsme provedli v kovové zalévací komůrce, do které jsme umístili vzorek tkáně. Po zchladnutí se přebytečný parafín ořízne a bloček se uloží do lednice.

### **3.2.3. Krájení :**

Vzorek jsme krájeli na sáňkovém mikrotomu Leitz – Wetzlar.

Nejprve jsme označili podložní sklíčko číslem vzorku. Poté jsme potřeli podložní sklíčko směsí glycerolu a bílku (směs glycerolu a bílku v poměru 1:1). Na toto potřené sklíčko jsme kápili kapku vody, do které jsme přenesli řez z mikrotomu. Následně jsme řezy na sklíčku umístili na přehřátou plotýnku. Řezy na plotýnce jsme se snažili co nejlépe vypnout pomocí preparačních jehel. Nakonec jsme slili ze sklíčka přebytečnou vodu. Preparáty jsme nechali volně oschnout a poté barvili příslušnými barvicími technikami.

### **3.2.4. Barvení :**

Barvení jsme prováděli pro světelnou mikroskopii.

#### HEMATOXYLIN A EOSIN :

Odparafínování :

3x xylén .....5 min

96% etanol.....5 min

70% etanol.....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% etanol.....opláchnutí

etanol – xylen (2:1)..... 3 min

etanol – xylen (1:2).....3 min

Projasnění :

3x xylen .....3 min

otření sklíček

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 destilované vodě

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

ZELENÝ TRICHROM :

Roztok ponceau-kyselý fuchsin :

roztok A : kyselý fuchsin..... 1g

destilovaná voda ..... 100 ml

kyselina octová..... 1 ml

roztok B :Ponceau 2R..... 1g

destilovaná voda ..... 100 ml



kyselina octová ledová..... 1 ml

Roztoky se připraví rozpuštěním barviv ve vařící vodě s přidáním kyseliny octové ledové po zchlazení. Před použitím smísíme 1 díl roztoku A se 2 díly roztoku B.

Roztok oranže G a kyseliny fosformolybdenové :

destilovaná voda..... 100 ml

kyselina fosformolybdenová .....5 g

oranž G .....2 g

Roztok světlé zeleně :

destilovaná voda..... 100ml

světlá zeleň .....0,2g

kyselina octová ledová .....0,5g

1. Řezy odparafinujeme až do vody a podložní sklíčka otřeme.
2. Odparafinované řezy vyprané ve vodě předbarvíme hematoxylinem 3-5 minut.
3. Opláchneme ve vodě.
4. Oplachem diferencujeme v kyselém alkoholu za kontroly v mikroskopu.
5. Vypíráme 5 min. V tekoucí vodě, otřeme a opláchneme destilovanou vodou.
6. Barvíme kyselý fuchsin – panceau 3-5 minut.
7. Opláchneme řezy 1 % kyselinou octovou.
8. Diferencujeme roztokem oranže G a kyseliny fosformolybdenové za kontroly v mikroskopu až kolagenní vazivo zůstane téměř bezbarvé (30 min.).
9. Opláchneme 1% kyselinou octovou.
10. Dobarvíme roztokem světlé zeleně 3-5 min.

11. Opláchneme třemi lázněmi 1 % kyseliny octové, tekutinu z řezu odsajeme filtračním papírem.
12. Odvodníme v jedné lázni 96 % ethanolu, alkohol-xylen (2:1) a xylen-alkoholu (2:1).
13. Projasníme třemi lázněmi xylenu.
14. Po otření hadříkem zamontujeme do kanadského balzámu.

#### **3.2.5. Zamontování do kanadského balzámu :**

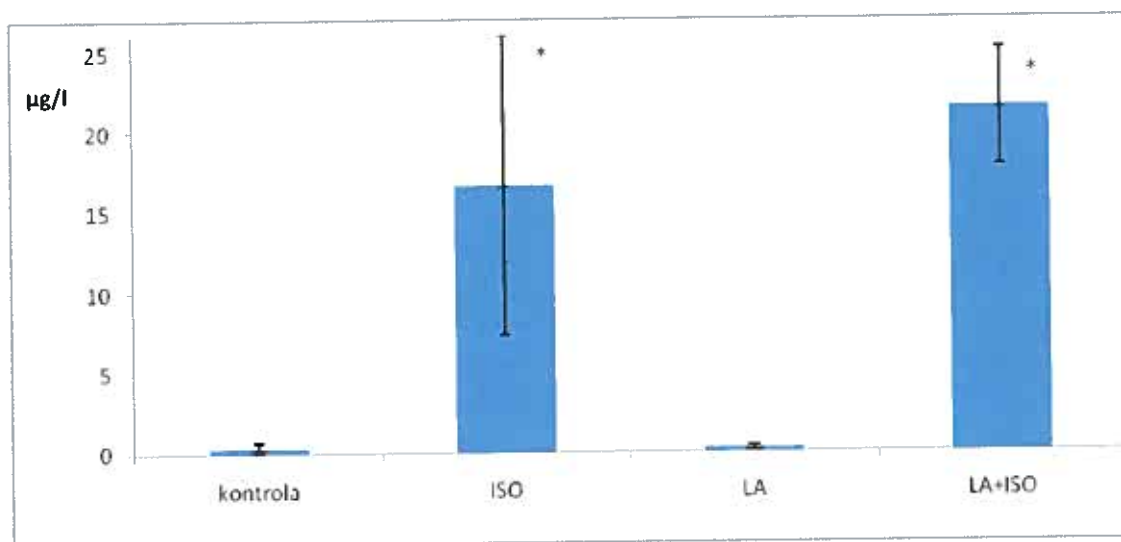
Obarvené preparáty jsme přikryli krycím sklíčkem, na kterém byla kapka kanadského balzámu a nechali několik dní oschnout.

## **4. VÝSLEDKY**

## 4.1 Vliv Lf na koncentraci srdečního troponinu T

Troponiny jsou specifické markery infarktu myokardu. Primární struktura troponinů kosterního svalu se liší od primární struktury troponinů myokardu a je proto možné je rozlišit imunochemicky a tím diagnostikovat poškození myokardu.(9)

Při poškození myokardu dochází k vyplavení zvýšeného množství troponinů do cirkulace. Vrcholu dosahují kolem 4. dne a k normálu se vrací za déle než dva týdny.(9)



\*  $p > 0.001$  vs. Kontrola

Z výsledků zanesených do grafu je vidět, že kontrolní skupina a skupina kde byl podáván pouze laktoferin (LA) mají koncentraci srdečního troponinu T téměř nulovou. U těchto skupin nedošlo k poškození myokardu.

Naopak podání isoprenalinu (ISO) vyvolalo výrazný vzestup hladiny srdečního troponinu T v plazmě testovaných zvířat. Podání isoprenalinu tedy způsobilo poškození srdeční tkáně.

U zvířat která byla premedikována laktoferinen jsme po podání isoprenalinu zaznamenali delší čas přežívání. Z toho můžeme usuzovat i na vyšší hladinu srdečního troponinu T, protože delší přežití znamená i větší produkci srdečního troponinu T.

Pro posouzení hodnot však bylo v experimentu použito malého počtu experimentovaných zvířat a nelze tedy výsledky experimentu hodnotit.

## **4.2 Histologické zhodnocení experimentu**

K histologickému zhodnocení jsme použili příčné a podélné řezy myokardu a hodnotili pomocí světelné mikroskopie.

Fotodokumentace a digitalizace byla provedena mikroskopem Olympus AX-70 (Olympus Ltd., Japan) a digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA) za použití softwaru NIS verze 2.3 (Laboratory Imaging Prague, ČR)

Histologické vyšetření myokardu potkanů, kterým byl podáván pouze i.g. laktoferin se nelišilo od obrazu normálního myokardu. Trámce tvořené kardiomyocyty probíhali bez znatelných dilatací intersticiálních prostorů, kapilární náplň byla přiměřená fyziologickým poměrům. Jádra svalových buněk byla dobře konfigurována a ve většině řezů zaujímalu centrální polohu a měla dobře rozlišitelný chromatin a jadérko. (Obr.-5)

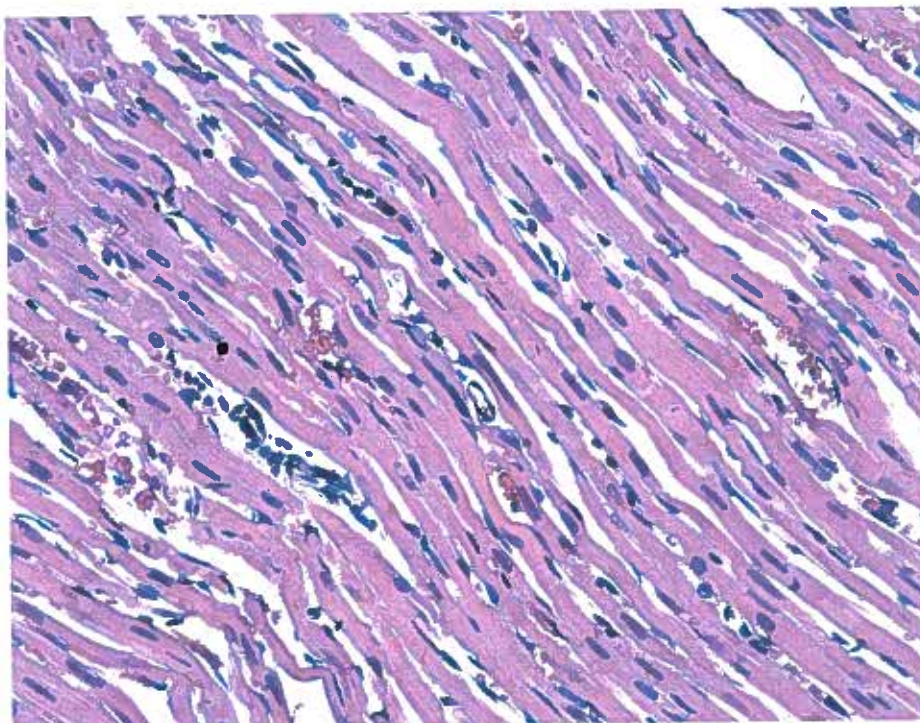
Tato charakteristika je ilustrována ve větším zvětšení, kde důležitým znakem intaktnosti myokardu je i dobře vytvořená síť myofibril. (Obr.-6)

Mikroskopický obraz myokardu experimentovaných potkanů, kterým byl krátkodobě podáván i.g. laktoferin a jednorázově s.c. isoprenalin, byl nápadně změněn. Při studiu zhotovených řezů byla dominantním znakem výrazná infiltrace intersticiálních prostorů myokardu zánětlivým kulatobuněčným infiltrátem. Topograficky byla nejnápadnější lokalizace v oblasti bazálních částí srdce v blízkosti hrotu. Přesnější kvantitativní zastoupení zánětlivých buněk jsme lokalizovali do oblasti subendokardiální a subperikardiální. (Obr.-7)

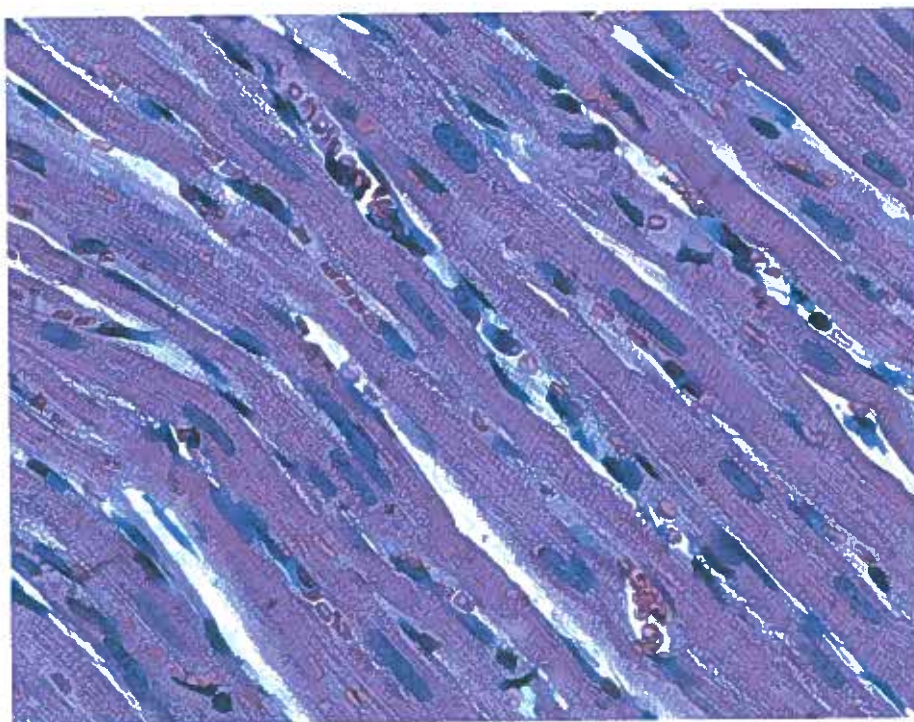
Charakterizovaná populace zánětlivého infiltrátu je velmi heterogenní. Jsou v něm zastoupeny početné makrofágy, neutrofilní leukocyty a menší počet lymfocytů. Nápadné u těchto řezů bylo edematózní rozšíření intersticia a to zvláště v přítomnosti infiltrátů, stejně jako výrazné překrvení kapilárního zásobení myokardu. (Obr.-8)

Z výše popsaných nálezů lze usuzovat na to, že samotné podání laktoferinu neovlivnilo na úrovni světelné mikroskopie fyziologické poměry v srdci. Naopak po podání isoprenalinu byl vyvolán infarktu podobný proces.



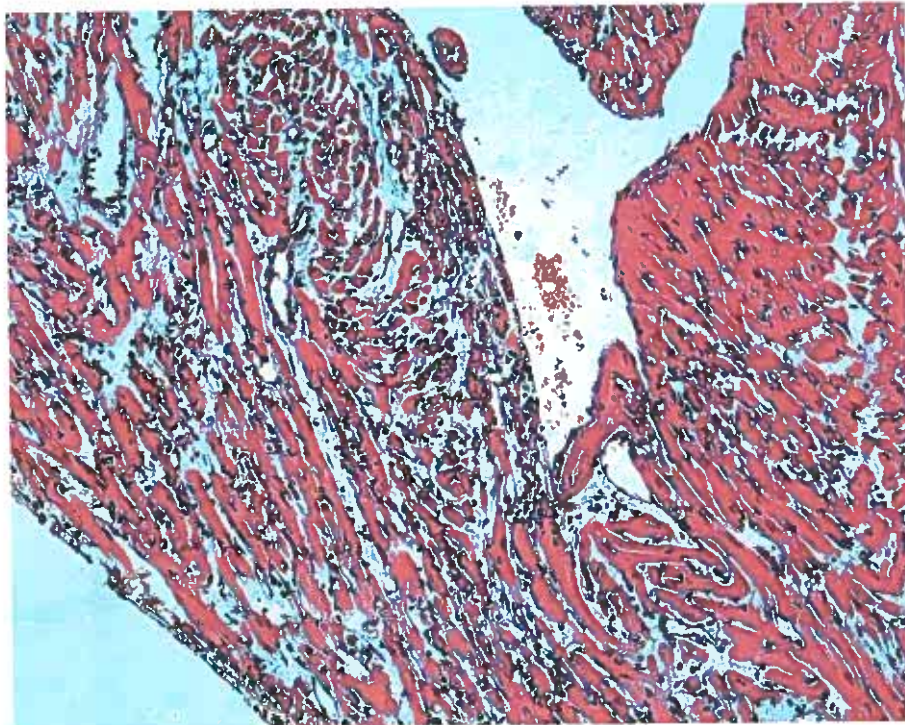


Obr.5 – LA – řez myokardem - barvení Hematoxylin-Eosin, zvětšení 200x

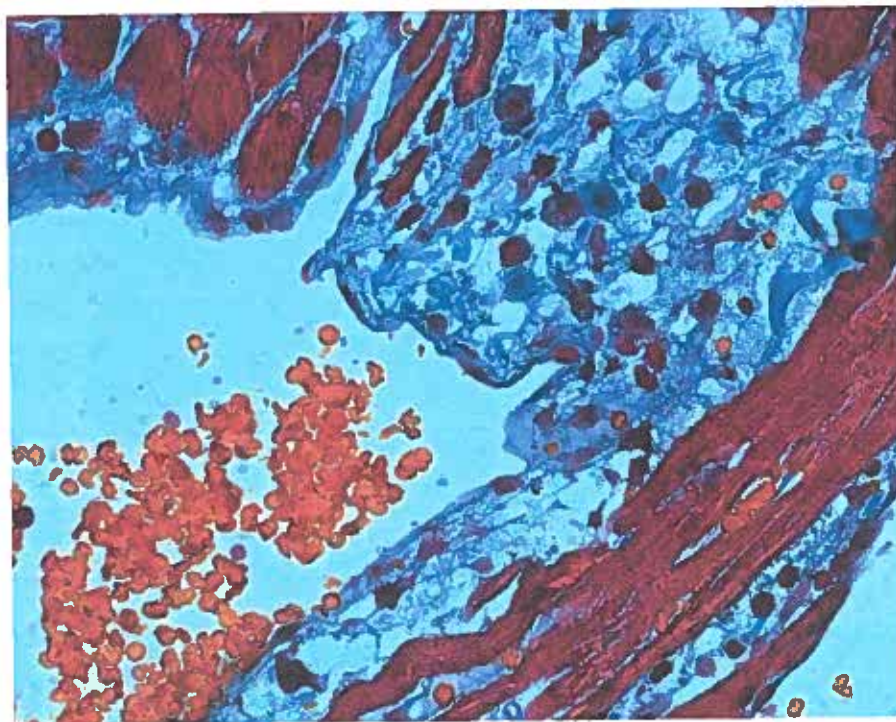


Obr.6 – LA – řez myokardem - barvení Hematoxylin-Eosin, zvětšení 400x





Obr. 7 – LA+ISO-řez myokardem - barvení Zelený trichrom, zvětšení 200x



Obr. 8 – LA+ISO-řez myokardem - barvení zelený nichrom, zvětšení 400x

# **5. DISKUSE**



Laktoferin je multifunkční glykoprotein se schopností vázat železo, který se vyskytuje v mléce a sekretech exokrinních žláz. (1) Ve své molekule má dvě vazebná místa pro železo. Svoji schopností vázat železo snižuje tvorbu hydroxylového radikálu, který vzniká v tzv. Fentonově reakci. Vznik nadbytečného hydroxylového radikálu způsobuje poškození tkání. (9) Dále volné kyslíkové radikály vznikají při reperfúzi ischemické tkáně a též poškozují další poškození tkání. (15)

V této práci jsme se zabývali otázkou, zda má laktoferin protektivní vliv na poškození myokardu, které bylo vyvoláno s.c. podáním isoprenalinu. Při podání isoprenalinu dochází k poškození myokardu, které je podobné jako u infarktu myokardu. Jako marker jsme použili hladinu srdečního troponinu T, který je specifickým markerem poškození myokardu.

Po podání isoprenalinu výrazně vzrostla hladina srdečního troponinu T oproti kontrole. U kontrolního vzorku byla hodnota srdečního troponinu T téměř nulová a stejně tak i u vzorku ,kde byl podán pouze laktoferin. Hladiny srdečního troponinu T u zvířat , kterým byl před podáním isoprenalinu krátkodobě podáván laktoferin, se nelišili od hladin srdečního troponinu T u zvířat ,kterým laktoferin podáván nebyl. Naopak hodnoty srdečního troponinu T u zvířat, kterým jsme podávali před aplikací isoprenalinu laktoferin se zdály být o něco vyšší. To lze odůvodnit tím, že jsme u potkanů premedikovaných laktoferinem zaznamenali delší časy přežívání po aplikaci isoprenalinu a tedy delší čas přežívání znamená i vyšší produkci tohoto markeru. Protože jsme testovali pouze malý počet zvířat, není možné výsledky porovnávat a je potřeba experiment provést s větší skupinou jedinců a poté hodnotit naměřené hodnoty. Dále mohou být také výsledky zkreslené z důvodu, že zvíře je při experimentu vystaveno stresu, který je pro organismus nežádoucí. Už jen podání s.c. isoprenalinu je pro zvíře stresovou situací. Pro správné hodnocení experimentu by bylo potřeba stresovou situaci co nejvíce potlačit.

Histologické hodnocení jsme provedli pomocí světelné mikroskopie a hodnotili jsme histologické řezy, které jsme zhotovili z tkáně odebrané ihned po provedení experimentu. Odebranou tkáň jsme ihned fixovali a dále zpracovávali pro histologické pozorování. Na histologických obrazech bylo vidět že, podání pouze i.g. laktoferinu nevedlo k žádným morfologickým změnám myokardu a histologický obraz se nelišil od fyziologického obrazu. Lze tedy říci, že i.g. podaný laktoferin nikterak neovlivnil srdeční tkáň.

Naopak s.c. podání isoprenalinu se na histologickém obrazu projevilo infiltrací intersticiálních prostorů myokardu. V infiltrátu jsme pozorovali zastoupení především makrofágů, neutrofilů a méně lymfocytů. Při podání s.c. isoprenalinu tedy došlo k poškození myokardu.

Chagoya de Sanchez et. al (4) ve svém odborném článku uvádí, že po podání isoprenalinu dochází k poškození myokardu a následné infiltraci tkáně. Totéž jsme pozorovali na našich histologických obrazech. Infiltrace byla především v subendokardiální a subperikardiální oblasti myokardu. Můžeme tedy předpokládat, že podání isoprenalinu vyvolá infarktu podobný stav a jeví se tedy jako dobrý pro studium protektivního vlivu laktoferinu na poškození myokardu.

V dalším studiu protektivního účinku laktoferinu by bylo vhodné pracovat s rozsáhlejší skupinou testovaných zvířat a zamezit stresové situaci, které je zvíře vystaveno.

## **6. ZÁVĚR**

Tato bakalářská práce byla sepsána formou teoretické a experimentální části. Odborné vedení a informace poskytli Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc. a Mgr. Přemysl Mladěnka.

V teoretické části jsme na základě odborných článků a učebnic zpracovali poznatky o výskytu, struktuře a biologických funkcích laktoferinu. Také jsme se zmínili o využití železa v organismu a tvorbě hydroxylového radikálu v tzv. Fentonově reakci. V další části jsme se zabývali ischemickou chorobou srdeční včetně infarktu myokardu a laboratorní diagnostikou těchto onemocnění, tedy biochemickými markery IM.

Následovala experimentální část, která zahrnovala provedení experimentu a následné zhodnocení výsledků. Hodnotili jsme koncentraci srdečního troponinu T a histologické preparáty myokardu.

Tuto práci bych chtěla využít pro sepsání diplomové práce v navazujícím magisterském studiu.

# **7. LITERATURA**

1. CONNEELY O. M. : Antiinflammatory activities of lactoferrin. *Journal of the American College of Nutrition* 2001; Vol.20, No.5: S389-S395
2. Ganong W.F.: *Přehled lékařské fyziologie*, 1. vydání, Jinočany, H&H, 1995
3. GERSTEIN M., ANDERSON B.F., NORRIS G.E., BAKER E.N., LESK A.M., CHOTHIA C. : Domain closure in lactoferrin, Two hinges produce a see-saw motion between alternative close-packed interfaces. *J.Mol.Biol* 1993; 234, 357-372
4. CHAGOYA de SANCHEZ V., HERMANDEY-MUÑOZ R., LOPEY Z-BARRERA F., YAÑEZ L., VIDRIO S., SUÁREZ J., COTA-GARZA D., ARANDA-FRAUSTRO A., CRUZ D. : Sequential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats : a long-term and integrative study.*Can.J.Physiol. Pharmacol.* 75 : 1997, 1300-1311
5. MASOPUST J. : *Patobiochemie buňky*. Karolinum –nakl. UK Praha , 2003
6. 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
7. OCHOA T.J., CLEARZ T.G. : Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie* 2008, doi:10.1016/j.biochi.2008.04.006
8. PECKA M. : *Laboratorní hematologie v přehledu, Buňka a krevtvorba, Český Těšín, tiskárna FINIDR, 2002, s. 104-131*
9. RACEK J. : *Klinická Biochemie, Galén, Praha, 2006, s.173-177*
10. SHARMA A.K., PARAMASIVAM M., SRINIVASAN A., YADAV M.P., SINGH T.P. : Three-dimensional structure of mare diferric lactoferrin at 2.6 Å resolution. *J.Mol. Biol.* 1998; 289, 303-317
11. SILBERNAGL s., LANG f. : *Atlas patofyziologie člověka, Grada Publishing, Praha, 2001, s.176-233*
12. STEJNS 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
13. ŠKRLE J. : *Účinek laktoferinu na makroskopický a mikroskopický obraz různých tkání u potkana II. Játra a ledviny (diplomová práce), Faf UK, 2007*
14. VACEK Z. : *Histologie a histologická technika, Avicenum, Praha1, 1988*
15. VYKRUTOVÁ E. : *Studium biochemického profilu vlivu laktoferinu na modelu isoprenalonového poškození myokardu (rigorózní práce), Faf UK, 2007*

16. <http://en.wikipedia.org/wiki/Isoprenaline>