

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

**Vliv rutinu na experimentální poškození myokardu**  
( diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce :

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Vedoucí katedry :

PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Hradec Králové 2010

Bc. Veronika Filipová

## **PROHLÁŠENÍ**

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

Děkuji panu Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení, cenné rady a informace při psaní této diplomové práce. Děkuji také paní laborantce Pavlíně Jabůrkové a ostatním laborantkám za pomoc při histologickém zpracování vzorků. Děkuji všem členům Katedry biologických a lékařských věd a Katedry farmakologie a toxikologie, kteří se podíleli na experimentu.

<b>Obsah</b> .....	4
<b>Zkratky</b> .....	6
<b>Abstrakt</b> .....	8
<b>Abstact</b> .....	9
<b>1.ÚVOD</b> .....	10
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	12
2.1.RUTIN (kvercetin-3-rutinosid):.....	13
2.1.1. Polyfenolové sloučeniny: .....	13
2.1.2. Flavonoidy : .....	14
2.1.3. Rutin : .....	15
2.1.4. Příklady biologických aktivit rutinu : .....	15
2.1.5. Aplikace rutinu : .....	18
2.2. Další látky s antioxidačním účinkem : .....	19
2.2.1. Laktoferin : .....	19
2.2.2. Výskyt laktoferinu .....	19
2.2.3. Struktura laktoferinu.....	19
2.2.4. Biologické vlastnosti laktoferrinu :.....	20
2.3. ROS (reaktivní formy kyslíku):.....	22
2.3.1. Charakteristika ROS :.....	22
2.3.2. Možnosti měření antioxidační aktivity:.....	23
2.3.3. Reperfúzní paradox : .....	23
2.4. ISCHEMICKÉ POŠKOZENÍ SRDCE:.....	25
2.4.1. Ischemie : .....	25
2.4.2. Biochemické markery infarktu myokardu:.....	26
2.4.3. Histologický obraz srdce :.....	28
2.4.4. Histopatologický obraz srdce : .....	29

2.5. ISOPRENALINOVÝ MODEL POŠKOZENÍ MYOKARDU .....	30
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>32</b>
3.1. EXPERIMENT: .....	33
3.1.1. Zvířata.....	33
3.1.2. Chemikálie a přístroje .....	33
3.1.3. Provedení experimentu :.....	34
3.2. HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ VZOKU : .....	35
3.2.1. Chemikálie, přístroje, nástroje při histologickém zpracování :.....	35
3.2.2. Fixace.....	37
3.2.3. Krájení .....	39
3.2.4. Barvení .....	39
3.2.5. Zamontování do kanadského balzámu : .....	43
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>44</b>
4.1. Histologické zhodnocení experimentu :.....	45
4.2. Zhodnocení koncentrace srdečního troponinu T :.....	60
<b>5. DISKUSE</b> .....	<b>61</b>
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	<b>65</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>67</b>

## Zkratky :

AIM	akutní infarkt myokardu
ADP	adenosindifosfát
AST	aspartátaminotransferasa
ATP	adenosintrifosfát
CK	kreatinkinasa
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GSH-Px	glutathionperoxidasa
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL	interleukin
IM	infarkt myokardu
ISO	isoprenalin
i.v.	intravenózní aplikace
LD	laktátdehydrogenasa
LDL	lipoprotein o nízké hustotě
Lf	laktoferin
LPS	lipopolysacharid
NO	oxid dusnatý
ROS	reaktivní formy kyslíku
Ru	rutin
s.c	subkutánní aplikace
SOD	superoxiddismutasa
TnC	troponin C
TNF $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$

TnI

troponin I

TnT

troponin T

VEGF

vaskulární endoteliální růstový faktor

## Abstrakt

Rutin je glykosid flavonolu vyskytující se v mnoha rostlinách, zelenině a ovoci. Rutinu je připisováno nesčetné množství biologických aktivit jako například antioxidační schopnosti, antihypertenzní účinek, protizánětlivý účinek, antihemoragická aktivita, posílení pevnosti kapilár, schopnost regulace kapilární permeability, stabilizace destiček. Dále jsou rutinu připisovány antibakteriální, antivirové, antiprotozoální, antialergické a antikarcinogenní vlastnosti. V posledních letech je biologická aktivita rutinu předmětem řady studií.

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit vliv rutinu u experimentálního poškození myokardu za využití isoprenalinového modelu poškození myokardu, který vyvolává morfologické a biochemické změny určitých parametrů, které lze přirovnat k infarktu myokardu. Jako potenciálně kardioprotektivní látku jsme zvolili rutin. Rutin byl podáván intravenózně 5 minut před aplikací isoprenalinu. Hodnotili jsme koncentraci srdečního troponinu T v plazmě a histologický obraz srdeční tkáně u experimentovaných zvířat. Koncentrace srdečního troponinu T jsme zanesli do grafu a histologické preparáty jsme hodnotili pomocí světelné mikroskopie.

U hodnot koncentrací srdečního TnT nedošlo ke snížení po aplikaci rutinu 5 minut před aplikací isoprenalinu a hodnoty koncentrací srdečního TnT byly podobné jako u skupiny zvířat, které byl podán pouze isoprenalin. Isoprenalin byl podáván v dávce 100 mg/kg s.c. V histologickém obraze podání isoprenalinu vyvolává poškození srdeční tkáně s charakteristickým edematózním rozšířením intersticiálních prostorů a zánětlivým infiltrátem především v oblasti subendokardu. Stejný histologický obraz byl pozorován i u skupin zvířat, které byly premedikovány rutinem 5 minut před aplikací isoprenalinu.

V tomto uspořádání experimentu rutin nemá kardioprotektivní vliv u isoprenalinového poškození myokardu. Pro další studie by bylo vhodné zhodnotit dlouhodobé podávání rutinu v různých dávkách.



## **Abstract**

Rutin is a flavonol glycoside appearing in many kinds of plants, vegetable and fruits. There are numerous biological activities attached to it, such as antioxidant properties, hypertension treatment, anti-inflammatory effect, antihemorrhagic activity, strengthening of capillaries, ability to regulate a capillary permeability and stabilization of blood platelets as well. Other qualities characteristic for rutin are antibacterial, antiviral and antiallergenic properties, antiprotozoal activities and anticarcinogenic effects. In recent years, the biological activity of rutin is the matter of many studies.

The main objective of this thesis is to review an influence of rutin on experimental myocardium damage with usage of isoprenaline model of myocardium damage, which is causing morphological and biochemical changes of certain parameters. These changes can be compared to the myocardial infarction. Rutin was chosen to be a potentially cardio preventive substance and it was applied intravenously 5 minutes before an isoprenaline application. On experimented animals a plasma concentration of cardiac troponin T and histology images of the heart were judged. The concentration of cardiac troponin T was charted into a diagram and histological preparations (samples) were evaluated by the medium of the light microscopy.

Values of the concentration of cardiac TnT were not lowered after application of rutin 5 minutes before application of isoprenaline, and these values were similar to the values recorded in the group of animals medicated only with isoprenaline. Isoprenaline was applied in a dose of 100mg/kg s.c. In the histology image an application of isoprenaline produces damage of the cardiac muscle with characteristic edematous extension of interstitial spaces with inflammatory infiltrate especially in subendocardial space. Similar histology image was observed in groups of animals premedicated with rutin 5 minutes before application of isoprenaline.

In experiment structured this way, rutin does not work cardio protectively in case of isoprenaline damage of myocardium. For further studies it would be appropriate to evaluate a long time giving of rutin in various doses.

# 1.ÚVOD

Rutin je glykosid flavonolu vyskytující se v mnoha rostlinách, především v pohance. Rutinu je připisováno množství biologických aktivit. Například antioxidační, antihypertenzní, antihemoragický účinek, posílení pevnosti kapilár a schopnost regulace kapilární permeability. Dále pak antibakteriální, antivirové, antiprotozoální, antialergické a antikarcinogenní vlastnosti.

ROS způsobují oxidační poškození lipidů, bílkovin, enzymů a jiných makromolekul organismu. Oxidační stres hraje roli ve vzniku kardiovaskulárních onemocnění a tedy antioxidační terapie by měla mít prospěšný efekt v léčbě těchto onemocnění. Během ischemie jsou ROS přítomny v malém množství, které se však zvýší při obnovení krevního toku poškozenou arterií (tzv. reperfuční paradox). Po reperfuční fázi vzniká v organismu velké množství superoxidových iontů, které poškozují tkáň. V posledních letech je věnována pozornost přírodním látkám s antioxidačními vlastnostmi a to zejména polyfenolovým sloučeninám.

Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci: Biologická úloha laktoferinu (2008) Cílem této práce je zhodnotit vliv rutinu na experimentální poškození myokardu za použití isoprenalinového modelu poškození myokardu.

## **2. TEORETICKÁ ČÁST**

## **2.1.RUTIN (kvercetin-3-rutinosid):**

Rutin je flavonoidní glykosid nacházející se v mnoha rostlinách.(23,24,35)

Flavonoidy jsou skupinou polyfenolových sloučenin, které se vyskytují jako sekundární metabolity rostlin a jsou v posledních letech intenzivně sledovány především pro jejich antioxidační, protizánětlivé, protialergenní, antidiabetické, cardio-, hepato- a gastroprotektivní, antivirové, antineoplastické vlastnosti.(8,35)

### ***2.1.1. Polyfenolové sloučeniny:***

Rostlinné polyfenoly jsou jednou z nejrozšířenějších skupin rostlinných sekundárních metabolitů. Je známo okolo 8000 struktur. (41)

Polyfenolové sloučeniny jsou sloučeniny strukturně velmi různorodé, vyskytující se v rostlinách a tedy jsou i běžnou součástí lidské stravy (vzhledem k jejich širokému rozšíření a vysoké koncentrací v rostlinách). Na základě různých studií se předpokládá protektivní vliv polyfenolů především u kardiovaskulárních či nádorových onemocnění a to zejména na základě schopnosti rostlinných polyfenolů zhaset reaktivní kyslíkové radikály a omezovat jejich tvorbu chelatací iontů přechodných kovů, především kationtů železa, které jsou schopny generovat vysoce reaktivní hydroxylové radikály.

Na druhou stranu polyfenoly ve vysokých koncentracích vykazují řadu nepříznivých efektů jako například prooxidační, mutagenní, genotoxické a strumigenní účinky.

Mezi nejběžnější polyfenoly patří flavonoidy, fenolové kyseliny a lignany z čehož na celkovém příjmu polyfenolů se flavonoidy podílí asi ze 2/3, fenolové kyseliny přibližně 1/3 a ostatní polyfenoly tvoří minoritní podíl.(47)

Polyfenoly mají vhodnou chemickou strukturu pro zachycení volných radikálů a ukazuje se, že by mohly být lepšími antioxidanty *in vitro* než vitamin E a vitamin C. Navíc tendence polyfenolů k chelataci kovů (především železa a mědi) vede k antioxidačním vlastnostem inhibicí tvorby volných radikálů, které jsou právě těmito kovy katalyzovány.(40)

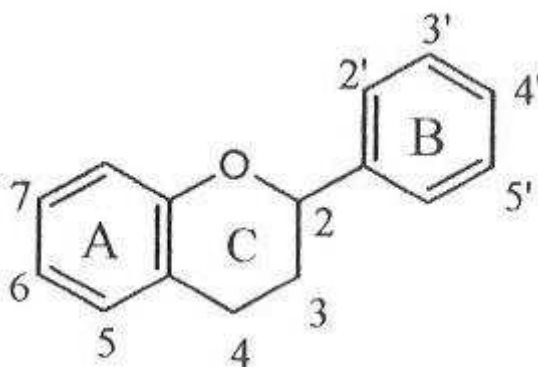
Mnohé studie poukazují na vliv polyfenolů na lidské zdraví. Kromě antioxidační aktivity dále polyfenoly vykazují i jiné biologické vlastnosti, jako je antialergický, anti aterosklerotický, protizánětlivý, antimikrobiální, antitrombotický, kardioprotektivní, vasodilatační efekt.(41)

### 2.1.2. Flavonoidy :

Flavonoidy jsou skupina polyfenolových látek s rozdílnou chemickou strukturou a vlastnostmi. Přírodně se nachází především v ovoci, zelenině, ořechách, semenech a kůrách.

Flavonoidům jsou připisovány různé biologické aktivity. Příkladem může být antibakteriální, antivirový, protizánětlivý, antialergický a vasodilatační účinek. Dále také inhibice lipidové peroxidace, ovlivnění agregace destiček, snížení permeability kapilár, snížení fragility kapilár, inhibice aktivity enzymového systému zahrnující cyklooxygenasu a lipoxygenasu. Flavonoidy se uplatňují jako antioxidanty, „vyčistáči“ (tzv. scavengery) volných radikálů a chelatory divalentních kationtů.(8)

V současné době je známo více než 4000 různých struktur flavonoidů.(5,8)



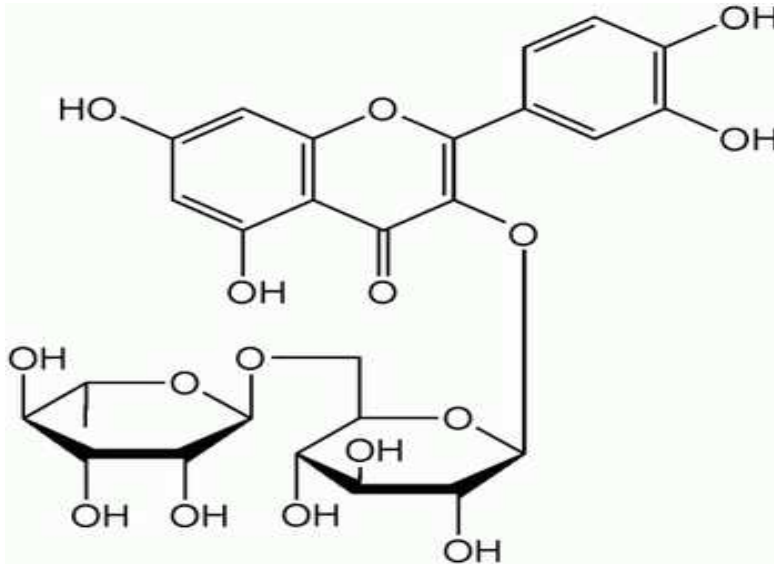
Obr.1 -Základní struktura flavonoidů (42)

Základem struktury flavonoidů je flavan skládající se ze dvou benzenových jader (A,B), které jsou spojeny pyranem (C).Jednotlivé flavonoidy odlišují hydroxylové a keto- skupiny substituované na základní strukturu.

Přírodní flavonoidy mají nejčastěji podobu O-glykosidů (cukerná složka a necukerná část=aglykon).

Mezi základní skupiny flavonoidů patří flavonoly, flavony, flavanony, katechiny, (flavanoly), antokyanidiny, izoflavony, dihydroflavonoly, chalkony.(8,38)

### 2.1.3. Rutin :



Obr. 2 -Struktura rutinu (53)

#### Výskyt rutinu:

Rutin je glykosid flavonolu vyskytující se v mnoha rostlinách, především v pohance.(23,24,51) Nadzemní část Pohanky obecné (*Fagopyrum esculentum*) obsahuje značné množství rutinu.(18) Dále je široce distribuovaný v zelenině a ovoci.(52)

### 2.1.4. Příklady biologických aktivit rutinu :

Rutin byl sledován pro jeho prospěšný vliv v prevenci a léčbě různých onemocnění.

Rutinu je připisováno nesčetné množství aktivit jako například antioxidační, antihypertenzní a protizánětlivý účinek. Antihemoragická aktivita, posílení pevnosti kapilár, schopnost regulace kapilární permeability a stabilizace destiček. Dále jsou mu připisovány antibakteriální, antivirové, antiprotozoální, antialergické a antikarcinogenní vlastnosti. V některých studiích je popisována inhibice LDL peroxidace a antioxidační aktivita ve Fentonově reakci.(24,52)

- Protizánětlivý účinek rutinu :

Protizánětlivý efekt rutinu může být realizován přinejmenším inhibicí produkce prozánětlivých mediátorů, které hrají důležitou roli v migraci a aktivaci neutrofilů. Protože se neutrofilové významně účastní zánětlivého procesu, jejich inhibice migrace a degranulace může být zodpovědná za protizánětlivou aktivitu rutinu.

Výsledky studie Seloum L. et.al ukazují na inhibiční vliv rutinu na migraci a degranulaci neutrofilů. Předpokládá se efekt rutinu na inhibici enzymů zahrnutých v neutrofilní odpovědi během zánětlivého procesu. Přesný mechanismus účinku rutinu na zánětlivý proces není znám.(44)

- Antimikrobiální aktivita rutinu :

Některé studie popisují, že rutin má též antimikrobiální účinek.

Rutin má prospěšný vliv na septickou artritidu způsobenou *Candida albicans*. V závislosti na dávce efektivnost rutinu spočívá pravděpodobně především v inhibici produkce NO LPS-aktivovanými makrofágy a supresi proliferace T-lymfocytů. Během proliferace T-lymfocytů CD4+ T lymfocyty indukují produkci cytokinů, které ovlivňují artritidu. Kandidicidní efekt rutinu v porovnání s klinicky užívanými léčivy typu azolových sloučenin a fluconazolu není tak významný.(15)

- Vliv rutinu na permeabilitu kapilár:

Rutin snižuje permeabilitu kožních kapilár. (1)

Rutin byl řadu let používán pro jeho schopnost snížit kapilární permeabilitu a fragilitu. Například troxerutin ( O-(beta-hydroxyethyl)-rutinosid ) se stal velice užitečný v léčbě chronické žilní insuficience. Komplexní mechanismus účinku není znám, ale je popisován efekt proti agregaci erytrocytů a příznivý vliv na krevní fibrinolytický systém.(12)

- Antikarcinogenní vlastnosti rutinu:

Přírodně vyskytující se fenolové sloučeniny, obzvláště pak fenolové kyseliny a polyhydroxylované flavonoidy, vykazují možnou antikarcinogenní aktivitu proti různým chemickým látkám. Mezi tyto polyfenoly patří i rutin, glykosid flavonolu quercetinu.



Karcinogeny interagují s DNA, poškozují určitá místa genomu a to může vést ke změnám nukleotidové sekvence a aktivaci protoonkogenů, které se účastní rozvoje karcinomu. Rutin moduluje poškození DNA karcinogeny a opravné enzymy DNA (DNA polymeráza  $\beta$  a DNA ligáza). Na základě těchto poznatků by tedy rutin mohl poskytovat ochranu proti chemickým karcinogenům. (51)

Rutin prokazuje schopnost inhibice proliferace leukemie zvýšením aktivity makrofágů a tedy indukci apoptózy nádorových buněk. (29)

Rutin vykazuje inhibiční efekt angiogeneze *in vitro* a *in vivo* tím, že mění produkci VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), IL-1 $\beta$  TNF $\alpha$ . Inhibuje produkci VEGF (hlavní regulátor angiogeneze) a IL-1 $\beta$  (stimuluje proliferaci endotelových buněk) a stimuluje produkci TNF $\alpha$  (vyšší dávky TNF $\alpha$  vyvolávají smrt nádorových buněk) v tumor-asociovaných makrofázích. Dále rutin inhibuje proliferaci a migraci endotelových buněk. Angiogeneze je důležitá pro růst karcinomu a tedy inhibice angiogeneze by mohla být účinný způsob léčby nádorových onemocnění.(13)

- Antioxidační aktivita rutinu:

Flavonoidy dokáží chelátovat ionty kovů což hraje důležitou roli v jejich antioxidační aktivitě, protože vznik volných radikálů je obvykle katalyzován přechodnými kovy *in vivo* a *in vitro*.(11)

Oxidační stres se podílí na poškození bílkovin, lipidů, nukleových kyselin, akceleraci aterosklerózy, přispívá k rozvoji degenerativních onemocnění a karcinogeneze. (16)

Studie podporují stanovisko, že oxidační stres hraje roli ve vzniku srdečních a vaskulárních abnormalit u různých typů kardiovaskulárních onemocnění a tedy antioxidační terapie by měla mít prospěšný efekt v boji s těmito onemocněními. Prospěšný vliv antioxidační terapie byl sledován u hypertenze, aterosklerózy, ischemické choroby srdeční, kardiomyopatie a městnavého srdečního selhání. (9)

Na základě studie P. Mladěnka et al. rutin nemá protektivní vliv proti katecholaminové kardiotoxicitě. Malé dávky isoprenalinu způsobují ischemii myokardu, která je spojena se zvýšením volného železa a mědi, které jsou uvolněny do cirkulace a vyvolávají oxidační stres. Flavonoidy na základě schopnosti vázat železo a měď a vychytávat ROS by teoreticky měli mít protektivní efekt na toto poškození myokardu. Nicméně na

základě studie P. Mladěnka et al. *i.v.* podávaný rutin nemá pozitivní efekt na katecholaminové poškození myokardu. (35)

Studie C. La. Casa et.al ukazuje, že má rutin gastroprotektivní efekt u experimentálního poškození 50% ethanolem, pravděpodobně na základě jeho antioxidačních vlastností. Výsledky této studie naznačují, že gastroprotektivní účinek rutinu je dán anti-lipoperoxidačním efektem a zvýšenou anti-oxidační enzymatickou (GSH-Px) činností. (25)

- Antiaterogenní vlastnost rutinu

Studie poukazují na schopnost rutinu inhibovat peroxidaci LDL. (52) Právě oxidace LDL má rozhodující úlohu v rozvoji aterosklerózy, protože modifikovaná LDL vykazují vyšší aterogenitu ve srovnání s nativními LDL.(16) Využití antioxidantů by tedy mělo mít antiaterogenní účinek.(24)

### **2.1.5. Aplikace rutinu :**

Rutin se používá k léčbě hemoragií, alergií, hemoroidů, křečových žil či hypertenze.(50)

Rutin se používá též pro jeho antioxidační vlastnosti a v kombinaci s vitamínem C se znásobuje antioxidační efekt rutinu, díky kterému jsou buňky organismu chráněny před poškozením volnými radikály. Dále rutin napomáhá roztažení cév a tím zlepšuje prokrvení orgánů, má vasodilatační a antitrobotický účinek.(54)

Rutin a jeho deriváty jsou součástí různých léčebných přípravků jako např. Ascorutin, Anavenol, Cilkanol, Venoruton a další.(55)

## **2.2. Další látky s antioxidačním účinkem :**

V bakalářské práci jsme se zabývali další možnou kardioprotektivní látkou u experimentálního poškození myokardu a to laktoferinem, který v této práci opět uvádím a bude porovnán s výsledky experimentu provedeného s rutinem. Obě látky byly testovány na isoprenalinovém modelu poškození myokardu, kde podávaná dávka isoprenalinu byla 100 mg/kg hmotnosti zvířete.

V předchozí práci byl laktoferin dávkován 2 mg a 2,5 mg v 0,5 ml aqua pro inj. pomocí gastrické sondy.

Z výsledků stanovených koncentrací srdečních troponinů T a na základě histologického zhodnocení laktoferin nejevil kardioprotektivní účinek u isoprenalinového poškození myokardu.(10)

Pro předchozí bakalářskou práci byly využity prostředky z grantu GA UK 94/2006/C/Faf.

### ***2.2.1. Laktoferin :***

Laktoferin je železo-vázající glykoprotein o molekulové hmotnosti okolo 80kDa, který společně s transferinem a ovotransferinem patří do rodiny transferinů, jejichž funkcí je transport železa v krevním séru.(2,14,49)

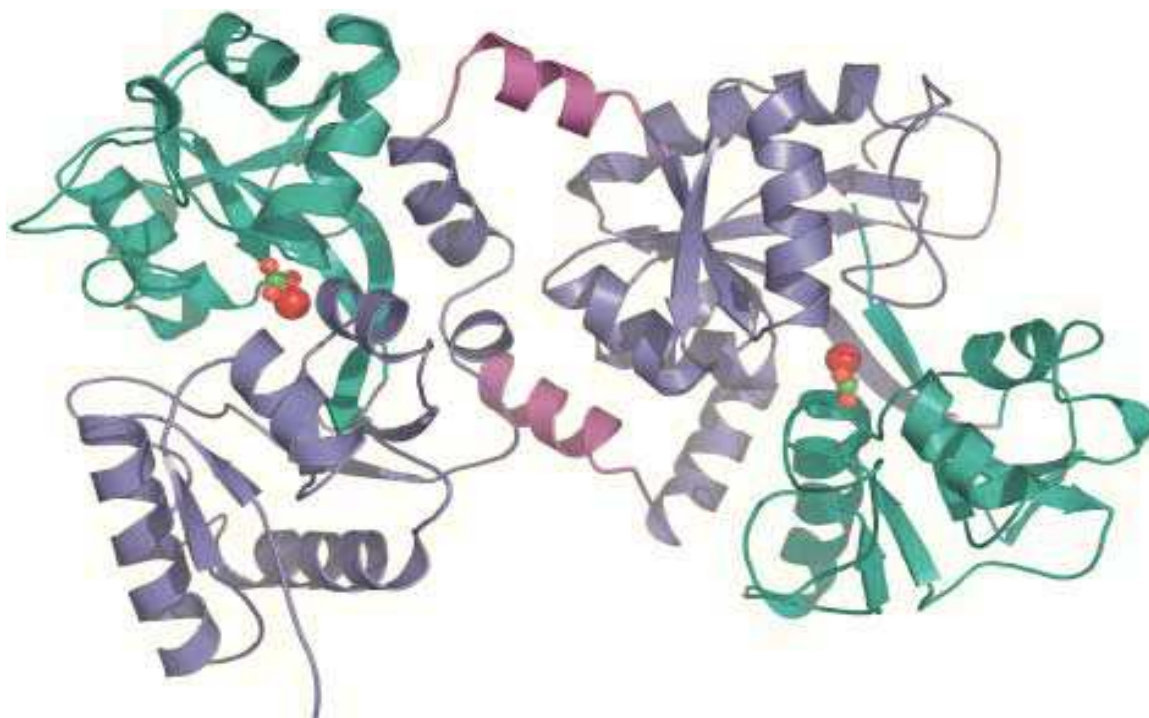
### ***2.2.2..Výskyt laktoferinu :***

Laktoferin se nachází ve vysoké koncentraci především v kolostru a mléce. Dále se nachází v sekretech exokrinních žláz jako například slzách, slinách, spermatu, vaginální tekutině, nosním a bronchiálním sekretu, žluči, gastrointestinální tekutině a moči. Také se nachází v granulích neutrofilů a nízká koncentrace byla nalezena v plasmě.(7,21,49)

### ***2.2.3. Struktura laktoferinu :***

Laktoferin je monomerní glykoprotein s molekulovou hmotností okolo 80 kDa.(45) Struktura laktoferinu se z části liší mezi zástupci různých druhů.(3)Laktoferin se skládá z polypeptidového řetězce, který obsahuje okolo 700 aminokyselin a je rozdělen do

dvou homologních podjednotek nazývaných N a C podjednotky. Dále má každá z těchto podjednotek dvě domény N1+N2 a C+C2.(10,21,45)



Obr. 3 – Polypeptidový řetězec lidského laktoferinu.(3)

Laktoferin má schopnost vazby především Fe, ale váže i jiné kovy jako např. Ga<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, VO<sup>2+</sup>, Mn<sup>3+</sup>, Co<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, a další. Má však největší afinitu k železu.(10,48)

#### **2.2.4. Biologické vlastnosti laktoferinu :**

Laktoferin je multifunkční glykoprotein, který je intenzivně studován především v posledním desetiletí.(19,21)

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 různých onemocnění.(10)

Některé vlastnosti laktoferinu jsou spojovány s jeho schopností vazby železa a naopak jiné z nich jsou na železe nezávislé.(21)

***Příklady biologických aktivit laktoferinu :***

- Laktoferin se podílí na regulaci absorpce železa v organismu
- Imunomodulační a protizánětlivá aktivita
- Antibakteriální vlastnost laktoferinu
- Antivirová aktivita laktoferinu
- Antifungální aktivita
- Antiparazitární aktivita
- Protinádorová aktivita
- Enzymová aktivita
- Antioxidační a chelatační aktivita laktoferinu(19,21,28,36)

## **2.3. ROS (reaktivní formy kyslíku):**

### ***2.3.1. Charakteristika ROS :***

Radikál je molekula, atom, iont, který má ve valenční sféře jeden nebo více nepárových elektronů.(16) Radikály jsou schopné po určitou dobu nezávislé existence, vyznačující se tendencí k řetězovým reakcím, kdy jeden radikál vytváří radikály další.(33)

Mezi ROS patří především superoxidový anion  $O_2^-$  a hydroxylový radikál  $OH\cdot$ . Dále mezi ROS patří peroxid vodíku a singletový kyslík, které nejsou radikály.(33) ROS vznikají v organismu působením exogenních faktorů i endogenních metabolických procesů.(52)

ROS způsobují především oxidační poškození lipidů (lipoperoxidace) a to zejména fosfolipidové dvojvrstvy všech biologických membrán, dále pak oxidační poškození bílkovin, enzymů a jiných makromolekul (nukleové kyseliny, polysacharidy, glykosaminoglykany) organismu.

Vztah ke vzniku ROS mají ionty kovů (zejména Fe a Cu), které ve formě  $Fe^{2+}$  nebo  $Cu^{2+}$  katalyzují tvorbu hydroxylového radikálu.(27)

Při ischemii hyne řada buněk a následně při obnovení cirkulace jsou pak mrtvé a poškozené buňky zdrojem volných radikálů, které vznikají odbouráváním poškozených molekul (např. purinů xantinoxidázou).(16) V reperfuční fázi po ischemii tedy vzniká množství volných radikálů.(17)

Na základě těchto poznatků lze předpokládat vliv chelatačních vlastností rutinu jako potenciální ochranu organismu před vznikem kyslíkových radikálů.

Ochranu před oxidačním stresem v organismu tvoří především SOD (superoxiddismutasa), glutathionperoxidasa, myeloperoxidasa, katalasa, peroxidasy.

Dále pak endogenní nízkomolekulární antioxidanty, jako jsou glutathion, kyselina močová, koenzym Q a další. Dále mezi neenzymatickou ochranu patří antioxidační vitamíny přijímané potravou jako například vitamin E, vitamin C, karotenoidy a v posledních letech se věnuje pozornost přírodním látkám, zejména polyfenolovým sloučeninám (fenolové kyseliny, hydroxyskořicové kyseliny, naftochinony, kumariny, flavonoidy, taniny). (27,41)

### 2.3.2. Možnosti měření antioxidační aktivity:

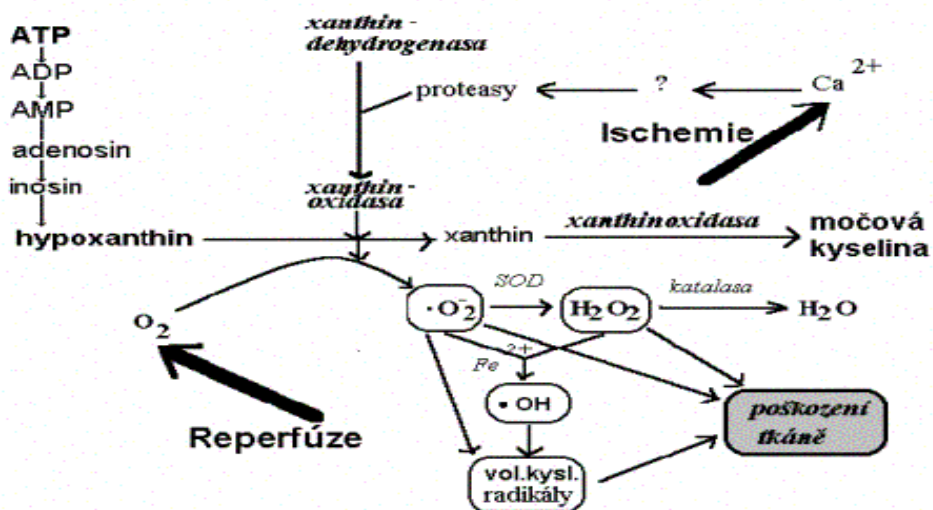
Mezi metody schopné měření antioxidační aktivity patří DPPH radikálový test, FRAP metoda a jejich modifikace.

DPPH radikálový test je založen na reakci stabilního fialově zbarveného radikálu DPPH (2,2-difenyl-1-picrylhydrazyl radikál) s antioxidantem. Při této reakci dochází ke zhášení DPPH radikálu projevující se blednutím roztoku DPPH a poklesem jeho absorbance měřené při 525 nm. Pokles absorbance je úměrný koncentraci antioxidantu ve vzorku.

FRAP metoda je spektrofotometrická metoda založená na schopnosti antioxidantů redukovat  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$ .  $Fe^{2+}$  jsou pak měřeny spektrofotometricky měřením barevného (modrého) komplexu s 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin(TPTZ), jehož absorpční maximum je při 595 nm. (41)

### 2.3.3. Reperfúzní paradox :

Při tkáňové hypoxii xantinoxidasa katalyzuje tvorbu superoxidového iontu. Tato xantinoxidasa vzniká z xantindehydrogenasy při nedostatku kyslíku v tkáni. Následně po obnovení dodávky kyslíku dostane xantinoxidáza potřebný substrát a oxiduje hypoxantin na xantin za vzniku superoxidových iontů, které poškozují tkáň.(33)



Obr. 4 - Mechanismus reperfúzního poškození (33)

ROS jsou během ischemie myokardu přítomny pouze v malém množství, které se však zvýší při obnovení krevního toku koronární arterií (= reperfúzní paradox). Toto zvýšení reaktivních forem kyslíku vzniká neúplnou redukcí kyslíku v mitochondriích a tvorbou superoxidového iontu při reakci xantinoxidázy, bohatě přítomné ve vaskulárním endotelu. Též se podílejí volné kyslíkové radikály uvolněné z polymorfonukleárních leukocytů, které přicestovali na místo poškození.(31)



## **2.4. ISCHEMICKÉ POŠKOZENÍ SRDCE:**

### **2.4.1. Ischemie :**

Kontrakce myokardu vyžaduje výlučně aerobní metabolismus ( regenerace ATP z ADP oxidativní fosforylací) a je navozována srdečním svalem samým (autonomní srdeční systém), nikoliv vnějšími nervovými podněty, ačkoliv nervová soustava může mít na tento stav vliv. Myokard vyžaduje stálý přívod kyslíku a nemůže pracovat na „kyslíkový dluh“ (získávání energie po kratší dobu z anaerobní glykolýzy), jako je tomu u kosterního svalu. Jako zdroj energie slouží myokardu především mastné kyseliny, při hladovění ketolátky.

### **Akutní hypoxie :**

Kardiomyocyt je velmi citlivý na nedostatek kyslíku. Hlavním důsledkem ischemie je velmi rychlá změna (několik sekund) na anaerobní metabolismus, končící potenciálně toxickou kyselinou mléčnou. Rapidně se snižuje zásoba energetických fosfátů (kreatinfosfát, ATP). Během 60 sekund se objeví neschopnost kontraktility, změny v ultrastruktuře se objevují do několika minut (nabobtnání mitochondrií i celé buňky, deplece glykogenu). Změny jsou zpočátku reverzibilní, ale po 20-40 minutách trvající ischemie dojde k irreverzibilní nekróze postupně všech kardiomyocytů.(31)

<i>změna</i>	<i>čas</i>
nástup deplece ATP	několik sekund
ztráta kontraktility	do 2 min
snížení ATP :	
na 50%	10 min
na 10%	40 min
nekróza kardiomyocytu	20 – 40 min
mikrovaskulární poškození	Po 1 hod

Obr. 5 -Časový sled klíčových změn v kardiomyocytech při akutní ischemii(31)

Isoprenalin vyvolává morfologické a biochemické změny některých parametrů, které lze přirovnat k infarktu myokardu.

Infarkt myokardu je nejzávažnější formou ischemické choroby srdeční (ICHS). ICHS je dána snížením koronární rezervy a tedy snížení nabídky kyslíku při zátěži či psychickém vypětí. Hlavní příčinou ICHS je zúžení proximálních koronárních arterií aterosklerózou. (10,39,46)

#### ***2.4.2. Biochemické markery infarktu myokardu:***

Jak již bylo zmíněno v mé bakalářské práci vyšetření markerů infarktu myokardu má význam 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, stanovení rekanalizace věnčité cévy a reperfuze ischemického ložiska.(10,39)

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). Pokud však ischemie trvá delší dobu, dochází k uvolňování do krevního oběhu bílkovin tvořících fibrilární kontraktilní komplex a to především TnT a TnI.

Z biochemických markerů IM lze stanovit zejména AST, CK ( CK-MB mass), LD, myoglobin, troponin T a I .

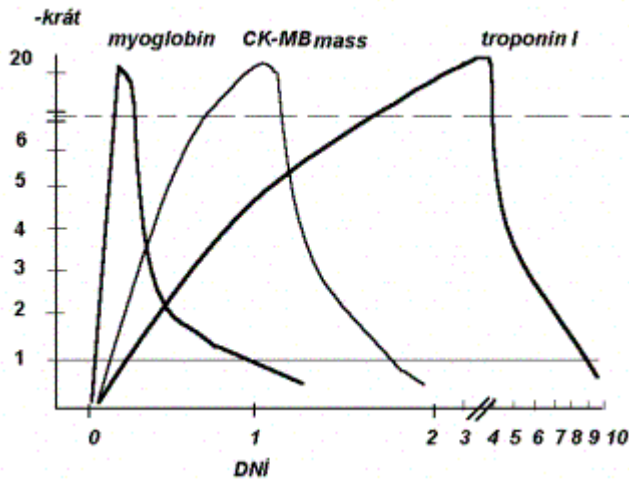
Za nejlepší markery pro potvrzení IM jsou považovány především myoglobin jako časný marker IM, ale nespecifický. Dále CK-MB mass a specifické kardiální troponiny T a I.(10,39)

#### **Srdeční troponiny :**

Srdeční troponiny jsou orgánově specifické biochemické markery při ischemickém poškození myokardu u akutních koronárních syndromů a při poškození myokardu jiné etiologie a patogeneze. Klinická symptomatologie a vzestup koncentrace srdečních troponinů je považována za důsledek ireverzibilní nekrózy myokardu. K vzestupu koncentrace srdečních troponinů v krvi dochází po 2-4 hodinách a pokračuje jejich

postupné uvolňování z již nekrotických myofibril kardiomyocytů, které podmiňuje trvání zvýšených koncentrací troponinů v krvi v řádu (7-14) dní.

Uvolněné množství srdečních troponinů je úměrné rozsahu nekrózy, avšak výsledná aktuální koncentrace v krvi může být ovlivněna rychlostí vzniku nekrózy, rozsahem reperfúze a reperfúzním poškozením myokardu.(57)



Obr. 6- Typický průběh myoglobinu, CK-MBmass a TnI u akutního infarktu myokardu.(32)

V posledních letech stoupá využití stanovení koncentrace srdečních troponinů oproti ostatním markerům srdečního poškození především pro jejich kardiospecifitu a přetrvávání jejich zvýšených hodnot koncentrací v krvi po delší dobu (delší „diagnostické okno“).

### **2.4.3. Histologický obraz srdce :**

Stěna srdce se skládá z endokardu, myokardu a epikardu :

- Endokard vystýlá vnitřní povrch srdce. Je různě tlustý na různých místech srdce. Nejtlustší je v okolí ústí velkých cév.(22)

Endokard se skládá z jedné vrstvy plochých endotelových buněk a tenké subendotelové vrstvy řídkého vaziva, které kromě kolagenních a elastických vláken obsahuje něco buněk hladkého svalstva. (20)

Mezi endokardem a myokardem je subendokardová vrstva vaziva, ve které probíhají cévy, nervy a větve převodního systému srdečního (Purkyňova vlákna). (20)

- Myokard tvoří nejširší část srdeční stěny a je tvořen vrstvou příčně pruhovaného svalu uspořádaného v anastomozující trámce, které jsou složeny z kardiomyocytů. Kardiomyocyty jsou cylindrické buňky s šikmými výběžky, které mají jádro uloženo zpravidla uprostřed (=centrálně uložené jádro) a až 25% kardiomyocytů může být dvoujaderných. Dále jsou buňky mezi sebou propojeny tzv. interkalárními disky, které se ve světelném mikroskopu jeví jako příčně probíhající schodovité tmavší linie. Prostory mezi svalovými trámci vyplňuje řídké vazivo, v němž probíhají kapiláry koronárního oběhu.(34)

Podle funkce lze buňky myokardu rozdělit na buňky převodního systému srdečního, který má schopnost samovolně tvořit vzruchy a rozvést je v náležité posloupnosti po srdci, a buňky pracovního myokardu, jejichž funkcí je kontrakce a tedy mechanická práce srdce. Vzruch vzniká v sinoatriálním uzlu ( nodulus sinoatrialis) jehož buňky jsou modifikované kardiomyocyty, které jsou menší, obsahují menší počet myofibril a jsou koncentricky uspořádány kolem nodální arterie. Tyto specializované buňky vedou vzruch k atrioventrikulárnímu uzlu (nodulus atrioventricularis), který je tvořen specializovanými kardiomyocyty stejného charakteru jako buňky v sinoatriálním uzlu. Atrioventrikulární uzel přechází do Hissova svazku, který je tvořen Purkyňovými vlákny a dělí se na pravé a levé Tawarovo raménko, levé raménko se dělí na dva svazky. Svazky Purkyňových vláken se táhnou v subendokardové vrstvě až k srdečnímu hrotu,

kde vytváří postranní větve, které uskutečňují kontakty s buňkami pracovního myokardu. Purkyňovy buňky mají větší průměr než běžné kardiomyocyty. (20,26)

➤ Epikard tvoří vnější vrstvu srdeční stěny. (34)

Na zevní straně je kryt jednovrstevným plochým epitelem (mezotelem), podloženým tenkou vrstvou vaziva. Subepikardová vrstva se skládá z řídkého vaziva, které obsahuje vény, nervy a nervová ganglia. V této vrstvě je soustředěna i tuková tkáň, která srdce obaluje. (20)

#### **2.4.4. Histopatologický obraz srdce :**

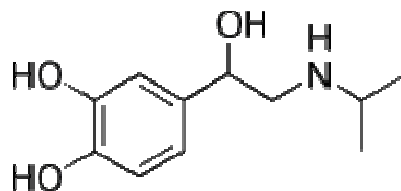
Akutní infarkt myokardu vzniká následkem akutní ischemie myokardu. Z histologického pohledu se jedná o koagulační nekrózu charakterizovanou hypereozinofilií cytoplazmy kardiomyocytů, jejichž obrysy zůstávají zachovány. Následně pak dochází k pyknóze jader, které posléze zanikají karyolýzou. Jsou patrná tmavě červená nekrotická vlákna myokardu se ztrátou barvitelnosti jader. Nekrotická svalová vlákna jsou zprvu odděleny štěrbinami vyplněnými edémovou tekutinou a zhruba po 24-48 hodinách pak zejména neutrofilními leukocyty a erytrocyty. Je patrné překrvení dilatovaných kapilár.

Od druhého týdne (subakutní infarkt myokardu) se v infarktovém ložisku objevují známky počínající koagulační nekrózy. Na periferii se tvoří nespecifická granulační tkáň, která postupně prostupuje celým ložiskem. Granulační tkáň je vysoce celulární obsahující fibroblasty, novotvořené kapiláry, makrofágy, lymfocyty a ubývá neutrofilních leukocytů. Následně po 3-6 týdnech se nespecifická granulační tkáň mění na tkáň fibrózní, kde se snižuje buněčnost, zvyšuje se produkce kolagenních vláken, fibroblasty se diferencují na fibrocyty, které produkují kolagenní vlákna a vzniká tzv. vazivová jizva. (6)

## **2.5. ISOPRENALINOVÝ MODEL POŠKOZENÍ MYOKARDU**

Zpočátku jak je i uvedeno ve studii Beregovich J. et al. byl isoprenalin studován pro jeho možný protektivní vliv u pacientů s akutním infarktem myokardu. Účelem této studie bylo popsat hemodynamickou odpověď relativně malých dávek ISO během akutní fáze IM. Pacientům byl podáván ISO v malých vzestupných dávkách 1/3, 2/3 a 1 µg/min i.v. po dobu 15 minut a byly měřeny hemodynamické vlastnosti srdce. Na základě negativních vlivů se ISO začal používat k navození experimentálního poškození myokardu a je dosud využit v množství studií, které sledují morfologické a biochemické změny některých parametrů srdce, které lze přirovnávat k infarktu myokardu.(4)

Isoprenalin (isoprotenerol,ISO) je syntetický katecholamin s inotropním a chronotropním účinkem užívaný k vyvolání patologického stavu, který lze přirovnat k IM. Úplný mechanismus katecholaminové kardiotoxicity není plně objasněn.(4,35)



Obr. 7- Vzorec isoprenalinu (56)

Katecholaminy se podílejí na normální srdeční funkci, avšak nadměrné množství katecholaminů je zodpovědné za rozvoj různých dysfunkcí srdce jako je například infarkt myokardu. Malé dávky isoprenalinu vyvolávají srdeční hypertrofii, vysoké dávky isoprenalinu vedou k biochemickým a strukturálním změnám, které způsobují irreverzibilní poškození buněk vedoucích k jejich nekróze. Isoprenalin zvyšuje srdeční frekvenci a sílu kontrakce srdce, které zjevně zvyšují práci srdce a tedy i spotřebu kyslíku. Může docházet k dysbalanci mezi dodávkou a požadavkem kyslíku srdcem. Tato dysbalance vede k ischemii. Přidružená tachykardie zkracuje periodu diastoly, snižuje plnění koronárních cév a způsobuje koronární hypotenzi. Dochází k výraznému snížení srdečního výdeje a tepového objemu. Uvolňují se biologické markery IM, především troponin T, který svědčí o poškození vlivem ischemie. Narůstá obsah kalcia

v buňkách myokardu, ke kterému dochází v důsledku porušení intracelulární homeostázy vápníku po podání isoprenalinu. Dochází k vyčerpávání ATP. (30,37)

Studie Sáncheze V.Ch. et al. zabývající se podáním isoprenalinu v dávce 67 mg/kg s.c. ukazuje charakteristické změny podobné infarktu myokardu na základě histologických, hemodynamických a biochemických měření. Histologické výsledky ukazují, že během prvních hodin a ještě více zřetelněji během 3 až 6 hodin po aplikaci ISO dochází ke změnám svalových buněk, které se po prodloužení a zvlnění následně kontrahují. Tento stav pokračuje v průběhu 12 hodin po aplikaci ISO. Mezi 12 a 24 hodinou je zřetelná koagulační nekróza a fragmentace myofibril. Přítomnost makrofágů, fibroblastů a kolagenových vláken je evidentní mezi 48 a 96 hodinou. Ultrastrukturální změny byly zřetelné v prvních hodinách po aplikaci ISO a těžké mitochondriální poškození s poklesem ATP bylo sledováno po 6 hodinách od podání ISO. Koagulační nekrózu lze považovat za indikátor infarktu (12-24hod). Změny před koagulační nekrózou (0-12hod) lze považovat za preinfarktový stav a postinfarktový stav charakterizuje začátek jizvení (48-96hod).(43)

Isoprenalinový model poškození myokardu byl použit v této diplomové práci pro zhodnocení účinků rutinu u experimentálního poškození myokardu.

# **3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**



### **3.1. EXPERIMENT:**

Experiment byl proveden na katedře Farmakologie a toxikologie ve spolupráci s katedrou Biologických a lékařských věd.

#### ***3.1.1. Zvířata***

K experimentům jsme použili samce potkanů kmene Wistar (BioTest s.r.o., Česká republika) o hmotnosti okolo 360 g. 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)

rutin (Sigma-Aldrich)

isoprenalin (Sigma-Aldrich)

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 :**

Zvířata byla náhodně rozdělena do 6 skupin :

1. **Kontrolní** skupina (7 zvířat) dostala fyziologický roztok 1 mg/kg s.c.
2. Skupina **ISO** (10 zvířat) dostala 100 mg/kg isoprenalinu ve vodném roztoku s.c.
3. Skupina **Ru11** (7 zvířat) dostala 11,5 mg/kg rutinu i.v.
4. Skupina **Ru46** (7 zvířat) dostala 46 mg/kg rutinu i.v.
5. Skupina **Ru11+ISO** (10 zvířat) dostala 11,5 mg/kg rutinu i.v. 5 minut před aplikací isoprenalinu v dávce 100 mg/kg s.c.
6. Skupina **Ru46+ISO** (17 zvířat) dostala 46 mg/kg rutinu i.v. 5 minut před aplikací isoprenalinu v dávce 100 mg/kg s.c.

Příslušná měření funkčních parametrů srdce byla provedena po 24 hodinách od aplikace rutinu, isoprenalinu či fyziologického roztoku na katedře Farmakologie a toxikologie.

Na konci experimentu byla odebrána krev pro biochemickou analýzu a srdeční komory pro histologické zhodnocení.

Biochemická analýza byla provedena v Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci králové.

Histologické zpracování vzorku a zhodnocení histologických preparátů jsme provedli na katedře Biologických a lékařských věd.

## **3.2. HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ VZOKU :**

Tkáň odebranou pro histologické zpracování jsme ihned uložili do fixační tekutiny a označili příslušným číslem, pod kterým byl vzorek evidován. Po fixaci jsme vzorek odvodnili, projasnili, prosytili parafínem a zalili do parafínu. Vzorky zalité v parafínu jsme následně nakrájeli, umístili na sklíčko a upravili. Preparáty jsme odparafinovali a obarvili žádaným histologickým barvením. Po obarvení jsme preparáty zamontovali do kanadského balzámu a nechali zaschnout. Takto zhotovené preparáty byly připraveny pro světelnou mikroskopii.

### ***3.2.1. Chemikálie, přístroje, nástroje při histologickém zpracování :***

aceton (LACH-NER s.r.o. NERATOVICE)

alcianová modř (SIGMA-ALDRICH)

bazický fuchsin (Loba Feinchemie)

eosin G (MERCK)

ethanol 96% (Lihovar Chrudim a.s.)

ethylenglykol (Lachema Brno)

formol konc. (PENTA-CHRUDIM)

fuchsin S (MERCK)

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 fosfowolframová (Lachema Brno)

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)

oranž G (MERCK)

parafín (PARAMIX-HOLICE)

pirosiřičitan draselný( Lachema Brno)

ponceu de xylidin (MERCK)

síran hlinitý (PENTA-CHRUDIM)

sírnatan 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)

světelný mikroskop (Hund Wetzlar V300)

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

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

software NIS-ELEMENTS AR 2.30

### **3.2.2. Fixace**

Fixace zabraňuje autolýze a bakteriálnímu rozkladu. Při fixaci dochází ke koagulaci a denaturaci bílkovin.

Optimální doba fixace je do 24 hodin a je závislá na velikosti vzorku. Doporučuje se, aby objem fixačního činidla byl nejméně 10x větší, než je objem fixovaného vzorku.(6)

V experimentu byla použita Bouinova fixační tekutina a formol.

#### **Bouinova fixační tekutina:**

Bouinova fixační 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 celoidinu do tkáně. Průměrná doba fixace je 24 hodin. (10)

#### Příprava:

nasycený roztok kyseliny pikrové...300ml

formol..... 100ml

Před použitím nutno přidat 5 ml kyseliny octové ledové na každých 100 ml 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. xylen ..... 10 min

II. xylen ..... 20 min

I. parafin ..... 2 hod

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

Zalítí do zkvalitněného parafínu

### **Formol :**

Formol je jedna z nejpoužívanějších fixačních tekutin. V laboratoři byl použit 4% paraformaldehyd. 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

xylen I. .... 2 hod

xylen II. .... 4 hod

parafin I. .... nechat přes noc

parafin II. ....nechat přes noc

zalítí do zkvalitněného parafínu

### **Zalítí 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.

Vzorky tkáně jsme umístili do kovových komůrek, zalili parafínem a nechali oschnout. Po zaschnutí jsme přebytečný parafín ořízli a bločky se vzorkem uložili do lednice.

### **3.2.3. Krájení**

Vzorek jsme krájeli na sáňkovém mikrotomu Leitz – Wetzlar.

Podložní sklíčko jsme označili číslem, pod kterým byl vzorek evidován. Poté jsme sklíčko potřeli směsí glycerolu a bílku (směs glycerolu a bílku v poměru 1:1 ) a na sklíčko kápli kapku vody, do které jsme přenesli řezy z mikrotomu. Řezy na sklíčku jsme umístili na předem přehřátou plotýnku a snažili se je co nejlépe vypnout pomocí preparačních jehel. Přebytečnou vodu ze sklíčka jsme slili a preparáty nechali volně oschnout.

### **3.2.4. Barvení**

Barvení pro světelnou mikroskopii:

Barvení slouží k zviditelnění jednotlivých složek tkáně a k rozlišení těchto složek mezi sebou. Za tímto účelem se používá různých směsí barviv, které tkáňové komponenty přibarví více či méně selektivním způsobem. Většina barvení používaných k histologickému hodnocení se chová jako sloučeniny kyselé nebo zásadité povahy, které mají tendenci vytvářet elektrostatické vazby s ionizovatelnými radikály tkání.

Mezi nejpoužívanější směs barviv patří hematoxylin-eosin. Hematoxylin se chová jako bazické barvivo a barví jádro a ostatní kyselé struktury (orgány bohaté na RNA) modře. Naproti tomu eosin se chová jako kyselé barvivo a barví bazické komponenty tkání. Eosin barví cytoplazmu červeně a kolagen růžově.(20)

➤ HEMATOXYLIN A EOSIN :

Odparafínování :

3x xylen 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
etylenglykol	250,0 ml
kyselina octová	40,0 ml

- Eosin : 1% roztok eosinu v destilované vodě

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

➤ ZELENÝ TRICHROM :

Princip : barvení v kyselém roztoku Ponceu, Fuchsinem S a světlé zeleni

Postup :

1. Odparafinovat, destilovaná voda
2. Hematoxylin Gill 4 minuty
3. Oplach v 70% alkoholu, diferencovat v kyselém alkoholu
4. Tekoucí voda- zmodrat
5. Goldner I. ....10 min
6. Oplach destilovanou vodou
7. Goldner II.....10 min
8. Oplach destilovanou vodou

9. Goldner III. ....10 min

10. Oplach destilovanou vodou

11. Odvodnit, projasnit, zamontovat do kanadského balzámu

Roztoky :

Goldner I. :

- |                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| a) - Ponceu de xylidin          | 1 g    |
| - koncentrovaná kyselina octová | 1 ml   |
| - destilovaná voda              | 100 ml |
| b) - oranž G                    | 1 g    |
| - koncentrovaná kyselina octová | 1 ml   |
| - destilovaná voda              | 100 ml |
| c) – Fuchsin S                  | 1 g    |
| - koncentrovaná kyselina octová | 1 ml   |
| - destilovaná voda              | 100 ml |

Roztoky zfiltrujeme. Konečný roztok Goldner I. Připravíme tak, že odebereme 20 ml roztoku a) + 10 ml roztoku b) + 10 ml roztoku c) a získáme 40 ml roztoku Goldner I.

Goldner II. :

1 % vodný roztok kyseliny fosfowolframové

Goldner III. :

- |                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| - Světlá zeleň                  | 1,5 g |
| - koncentrovaná kyselina octová | 1 ml  |
| - destilovaná voda              | 100ml |

Výsledek barvení :

Kolagenní vazivo zeleně, jádra buněk modře, svalovina cihlově červeně, erytrocyty oranžově, hyalinní vazivo červeně.

### ***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. Histologické zhodnocení experimentu :**

K histologickému zhodnocení jsme použili příčné a podélné řezy myokardu a hodnotili jsme je 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-ELEMENTS 2.30

Na obr. 9 až 18 je zobrazena kontrolní srdeční tkáň bez patologických změn:

Obr.9 ukazuje přehled pravé a levé komory srdce a na obr. 10 je zachycena stěna pravé komory s přehledně odlišitelným epikardem, myokardem a endokardem. Kardiomyocyty nejsou odděleny dilatacemi intersticiálních prostorů. Kapilární náplň je přiměřená fyziologickým poměrům. Svalovina se jeví bez zánětlivého infiltrátu.

Obr.11 až 13 je barven zeleným trichromem. Toto barvení nám umožňuje přehledně odlišit jádra buněk, erytrocyty, svalovinu, kolagenní a hyalinní vazivo. Na fotografiích je znázorněna pravá a levá komora (obr.11), levá komora s odlišitelným epikardem a myokardem ( obr.12) a endokard levé komory (obr.13). Obraz odpovídá fyziologickým poměrům v srdci. Není viditelné edematózní rozšíření intersticiálních prostorů ani zánětlivá infiltrace.

Na obr.14 je detail endokardu a myokardu pravé komory. Jádra kardiomyocytů zaujímají centrální polohu a mají rozlišitelný chromatin a jadérko.

Obr.15,16,17 znázorňují endokard bez edematózního rozšíření intersticiálních prostorů a bez zánětlivé infiltrace intersticiálních prostorů.

Na obr.18 je detail myokardu s viditelným příčným pruhováním svaloviny. Na obrazu jsou zřetelně viditelné mezibuněčné spoje tzv. interkalární disky.

Dokumentace kontroly ukazuje neporušenost srdeční tkáně bez zjevných patologických změn a poslouží nám k porovnání patologického stavu po aplikaci isoprenalinu.

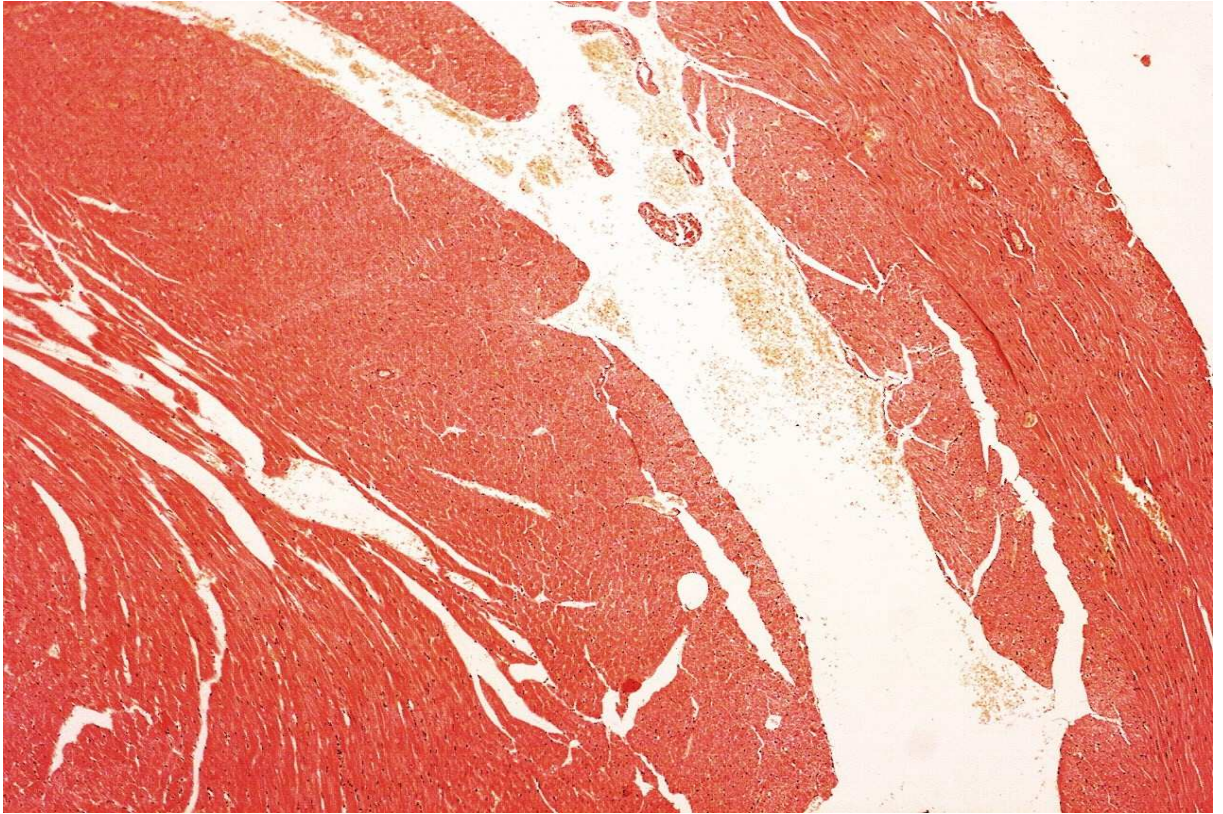
Mikroskopický obraz srdce u experimentálních zvířat po aplikaci isoprenalinu v dávce 100 mg/kg je nápadně změněn oproti kontrole. Na řezech je výrazná infiltrace intersticiálních prostorů zánětlivým kulatobuněčným infiltrátem a to nejvíce v oblasti subendokardiální. Populace zánětlivého infiltrátu je velice heterogenní a jsou v něm zastoupeny především makrofágy a neutrofilní leukocyty, méně lymfocytů. Dále je zde nápadné edematózní rozšíření intersticia. (obr.19)

Po aplikaci rutinu je mikroskopický obraz srdce též změněn. Na řezech je v menší míře oproti aplikaci isoprenalinu viditelné edematózní rozšíření intersticiálních prostorů a zánětlivý infiltrát. (obr.20,21)

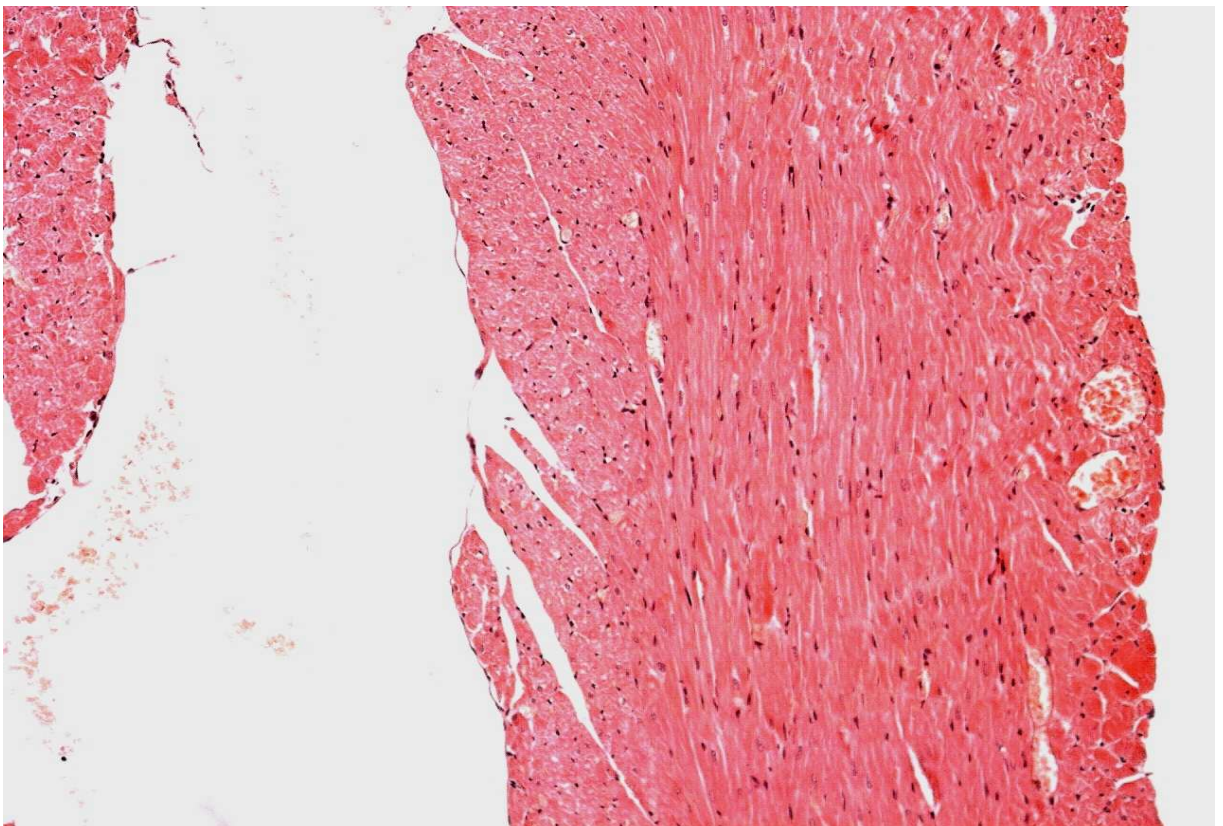
Aplikace rutinu a isoprenalinu opět vykazuje edematózní rozšíření intersticiálních prostorů se zánětlivou infiltrací. Z histologického pohledu rutin nevykazuje protektivní účinek na srdeční tkáň po aplikaci isoprenalinu. (obr.22-31)

Edematózní rozšíření intersticia mezi kardiomyocyty a zánětlivý infiltrát je lokalizován především v oblasti pod endokardem. (obr.24,25,27,28)

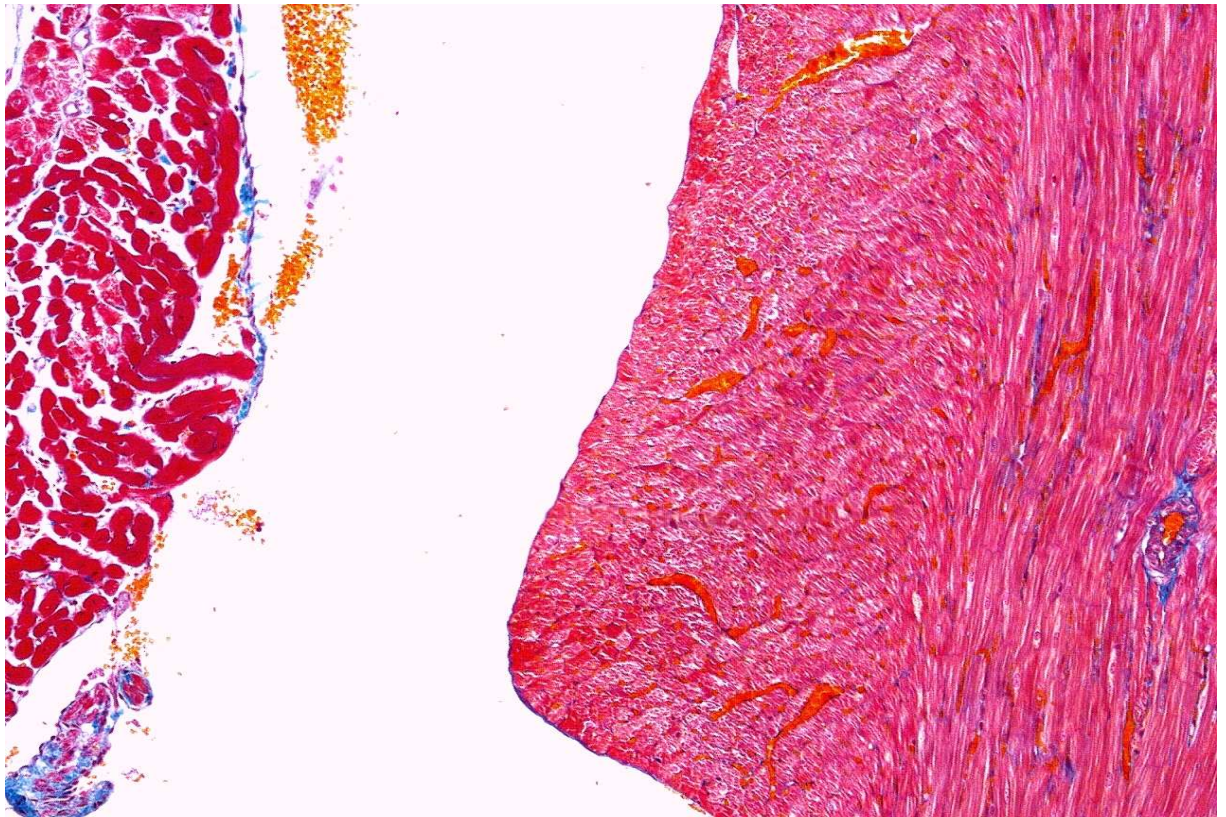
Obdobný mikroskopický obraz jsme pozorovali po aplikaci laktoferinu a isoprenalinu, která byla předmětem bakalářské práce. (obr.32,33)



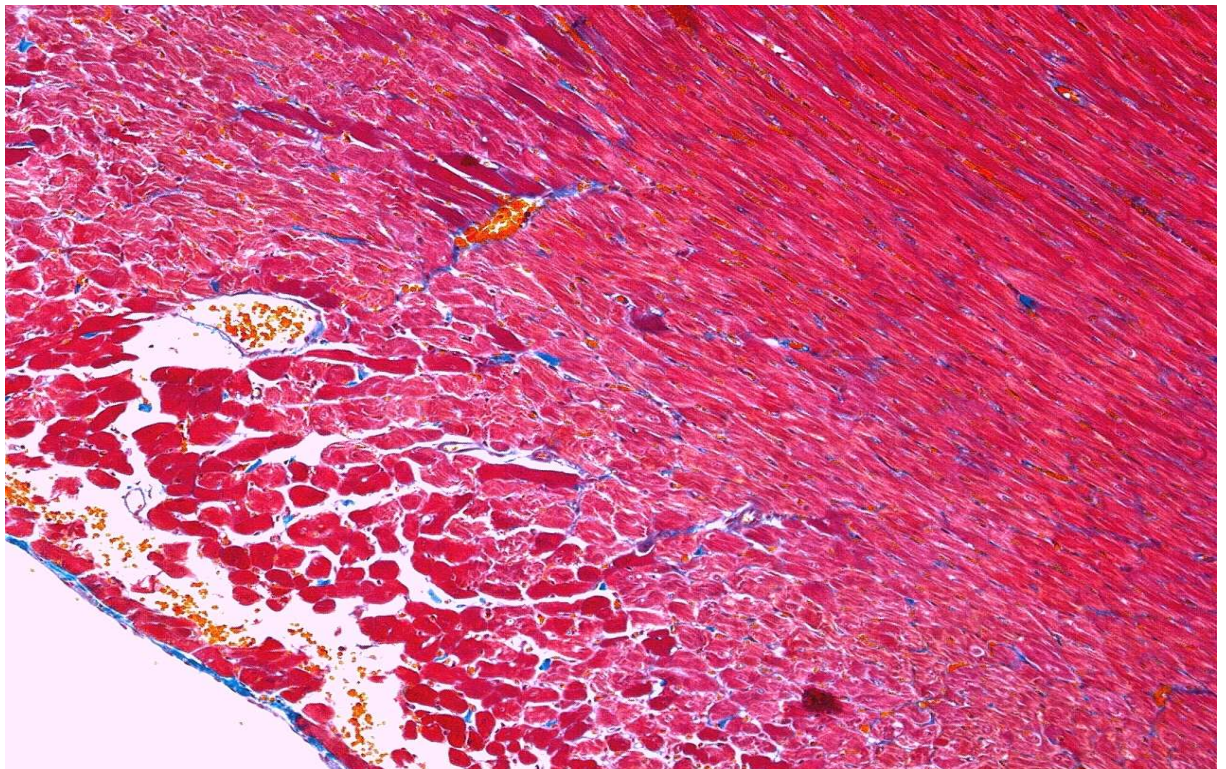
Obr. 9 - Kontrola – přehled pravé a levé komory srdce – barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 40x



Obr. 10- Kontrola – stěna pravé komory: epikard + myokard + endokard – barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 100x

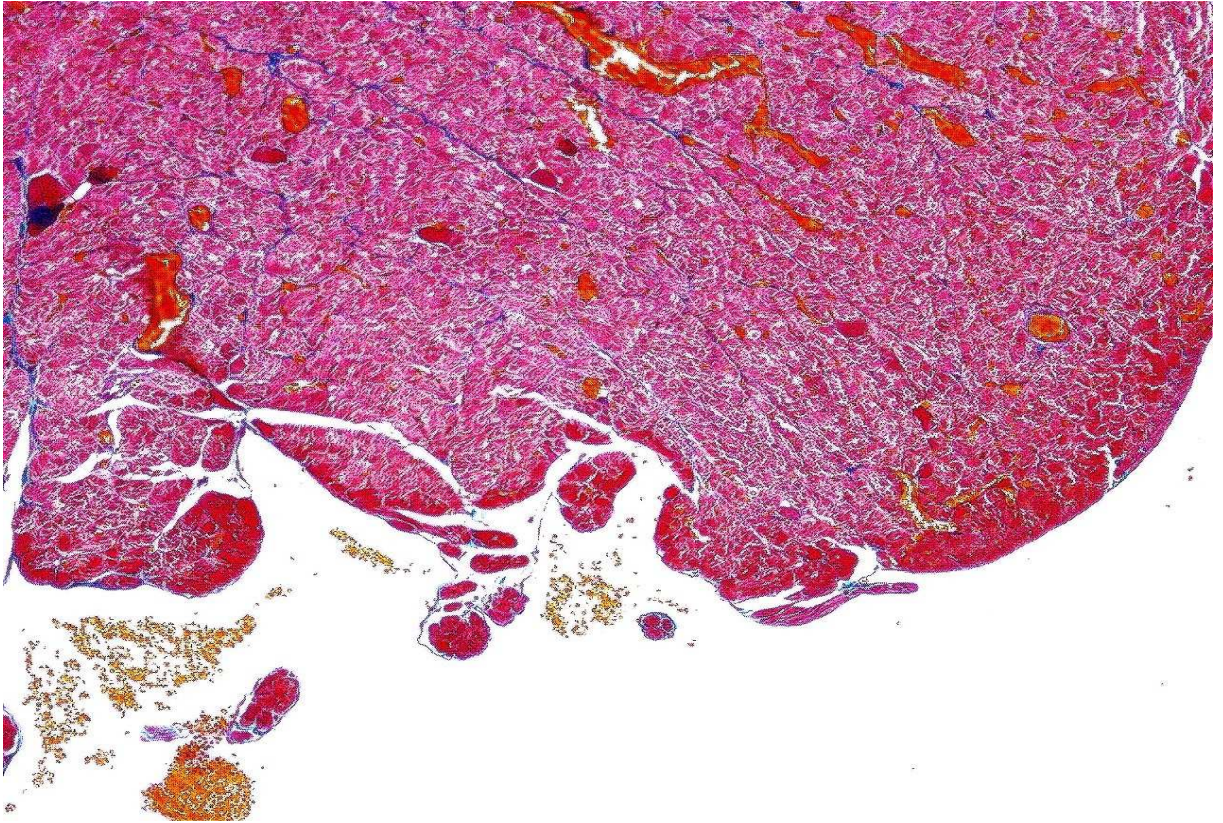


Obr. 11 – Kontrola – pravá a levá komora srdce – barvení zelený trichrom, zvětšení 100x

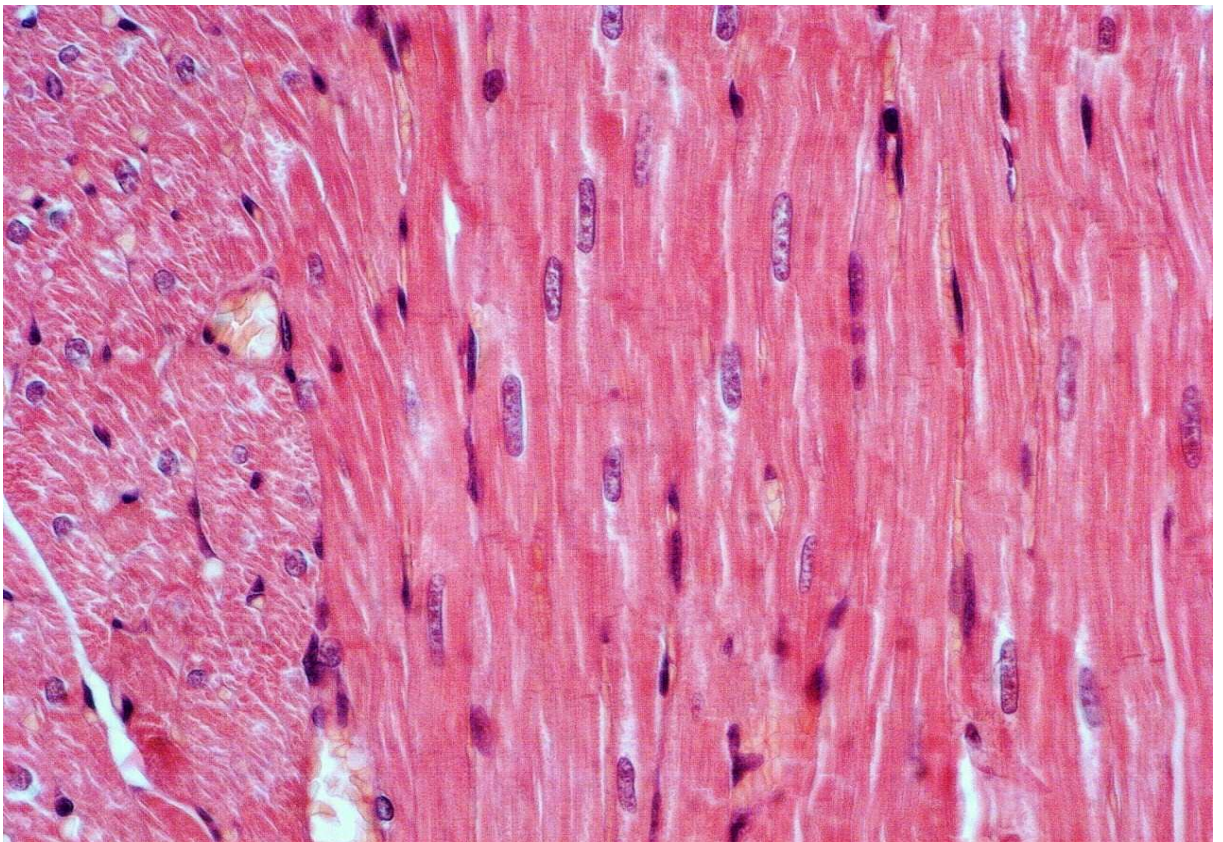


Obr. 12 – Kontrola – levá komora: epikard + myokard –barvení zelený trichrom, zvětšení 100x

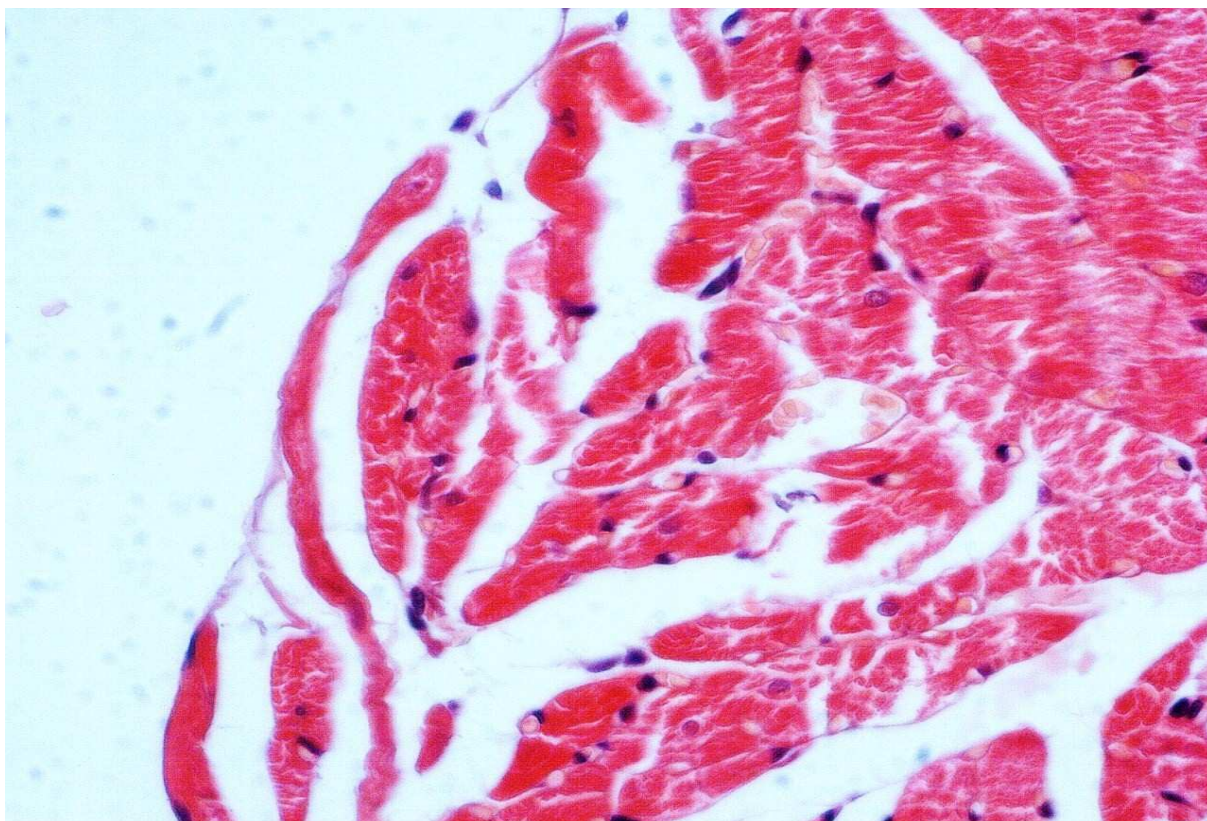




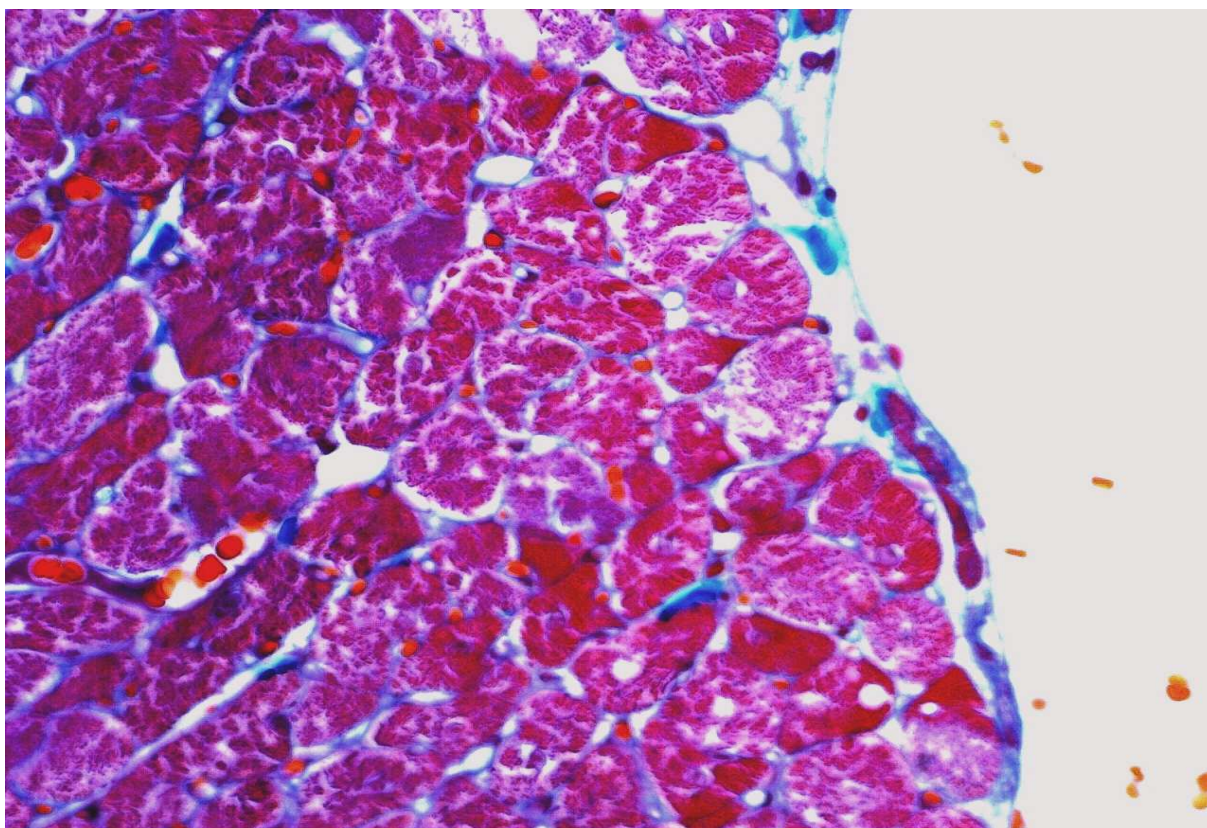
Obr. 13 – Kontrola – endokard levé komory – barvení zelený trichrom, zvětšení 100x



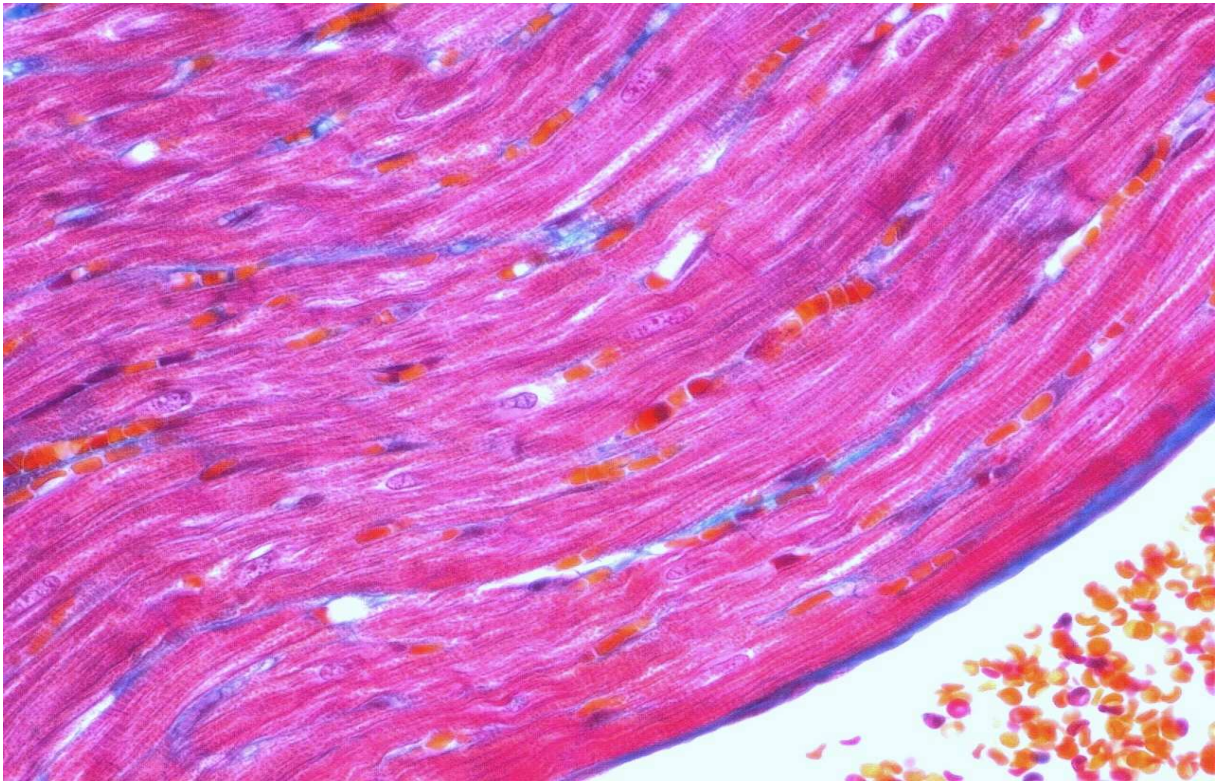
Obr. 14 – Kontrola – pravá komora: endokard + myokard – barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 400x



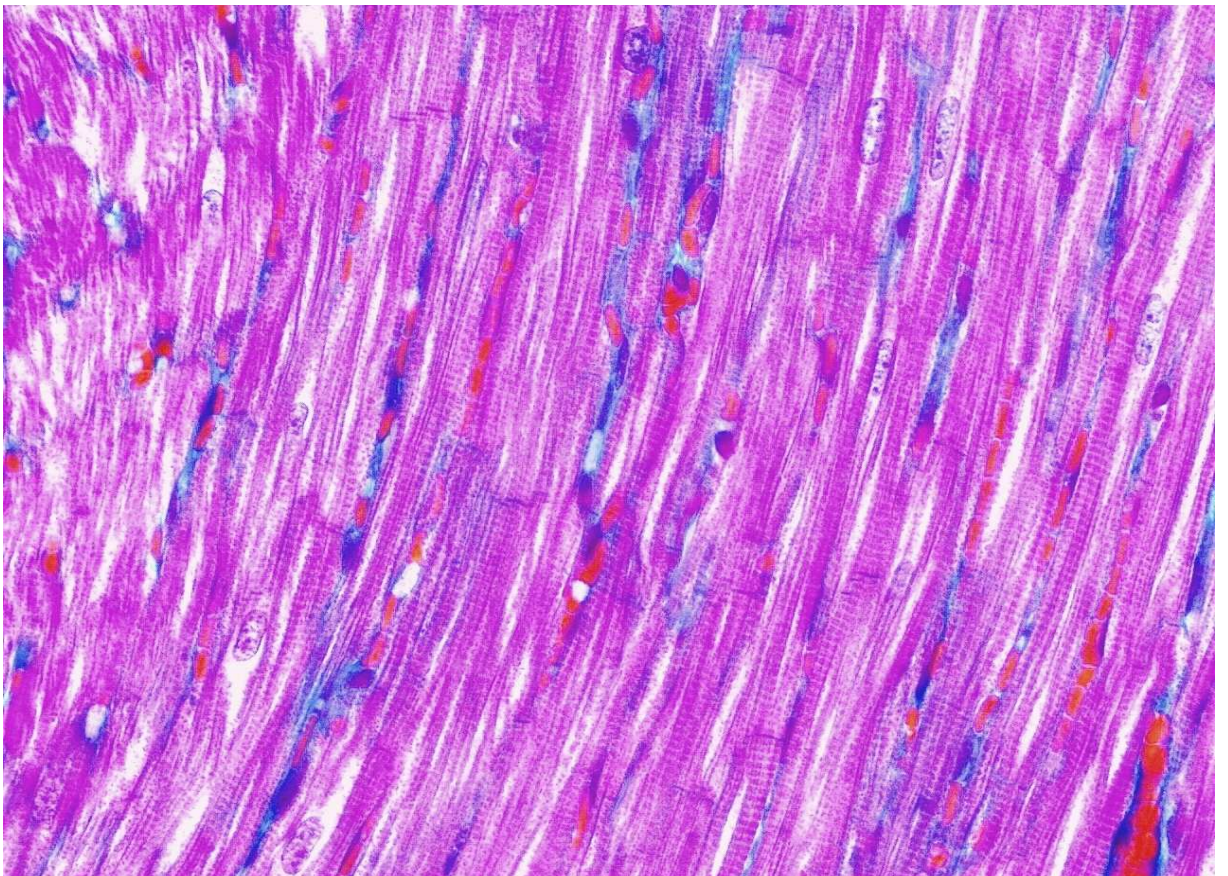
Obr. 15- Kontrola – levá komora: detail endokardu – barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 400x



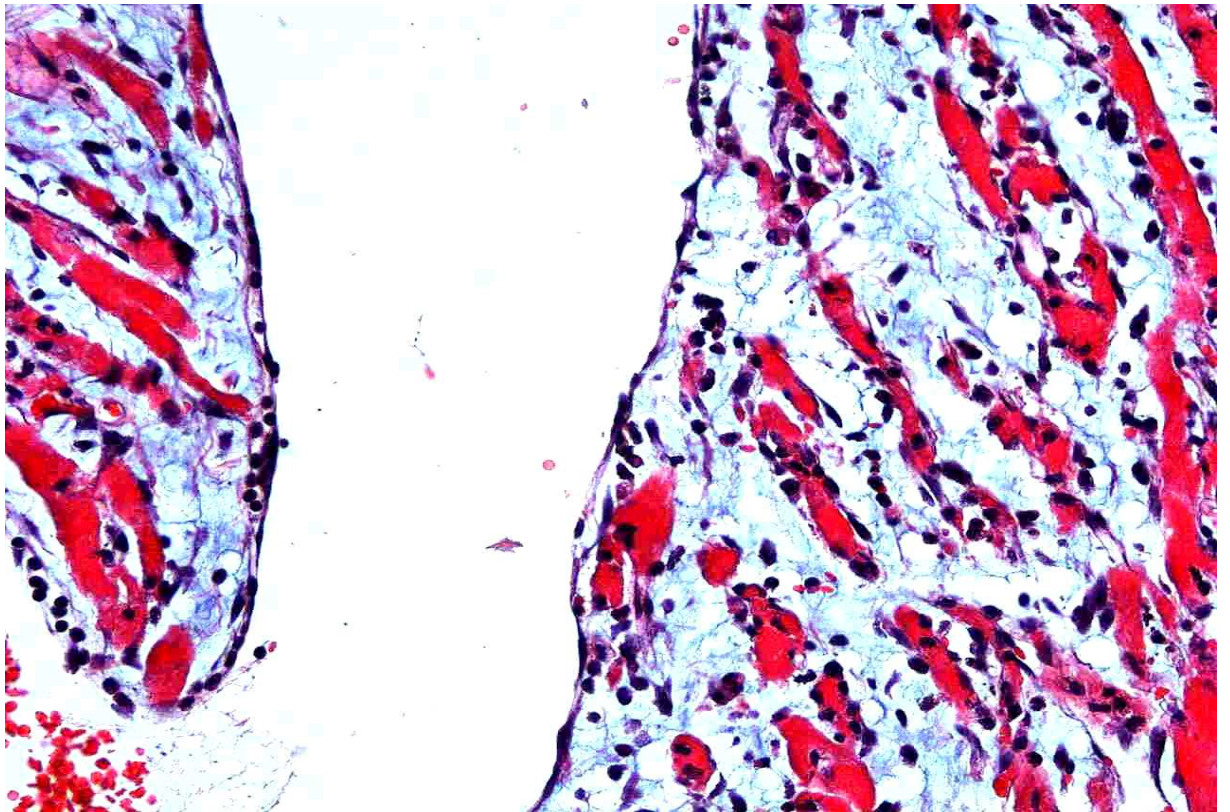
Obr. 16- Kontrola – levá komora: detail endokardu – barvení zelený trichrom, zvětšení 400x



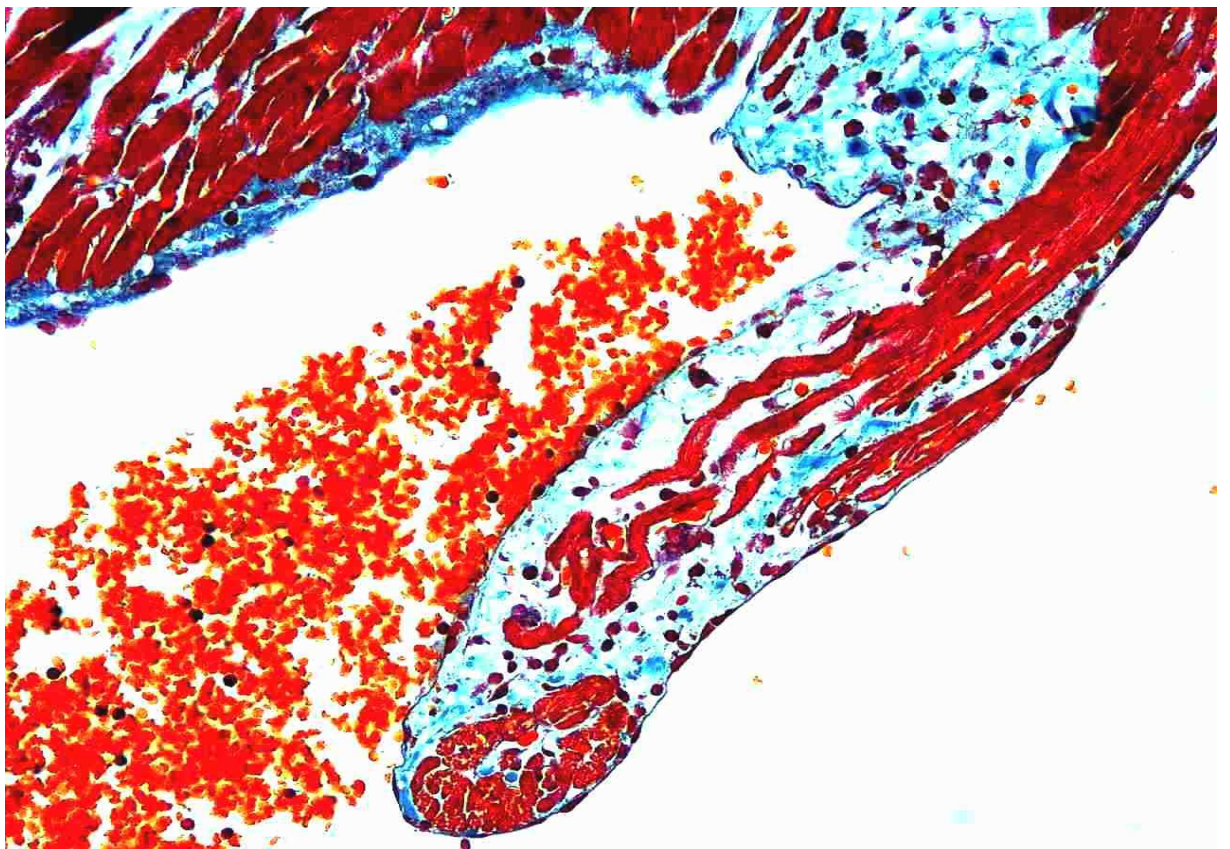
Obr. 17- Kontrola – detail endokardu – barvení zelený trichrom, zvětšení 400x



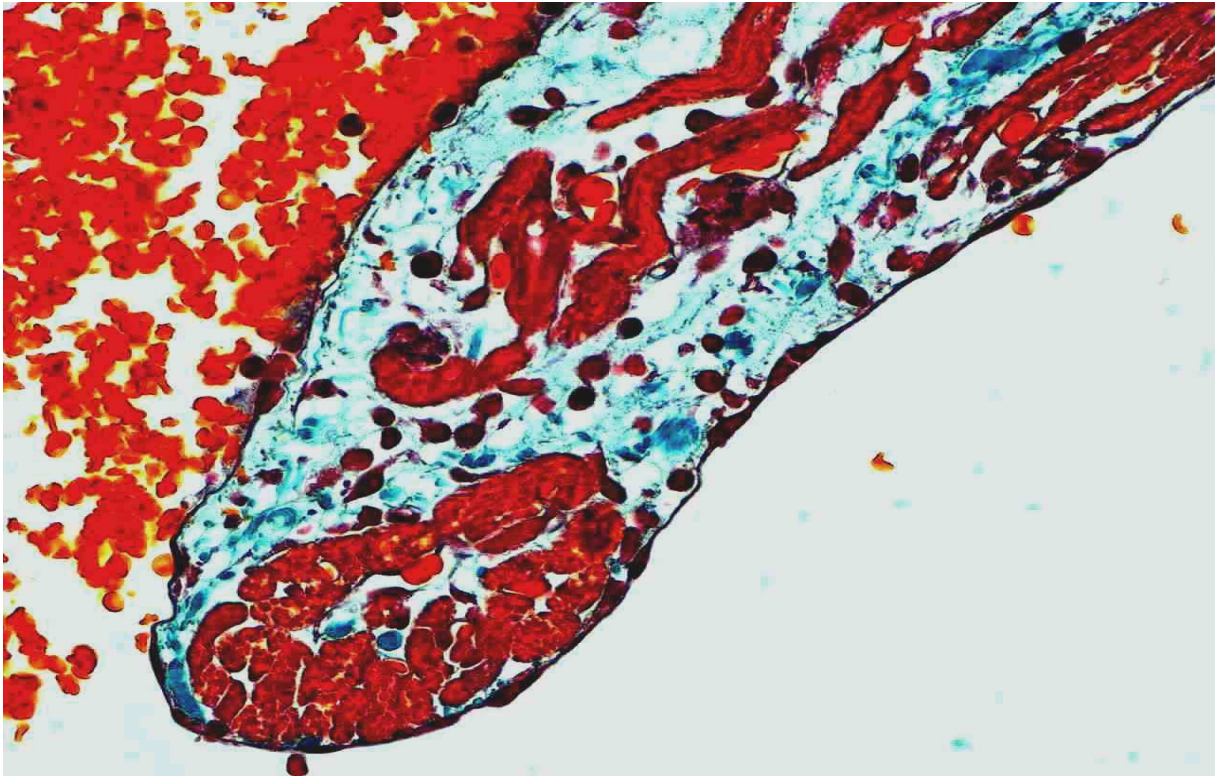
Obr. 18- Kontrola – detail myokardu – barvení zelený trichrom, zvětšení 400x



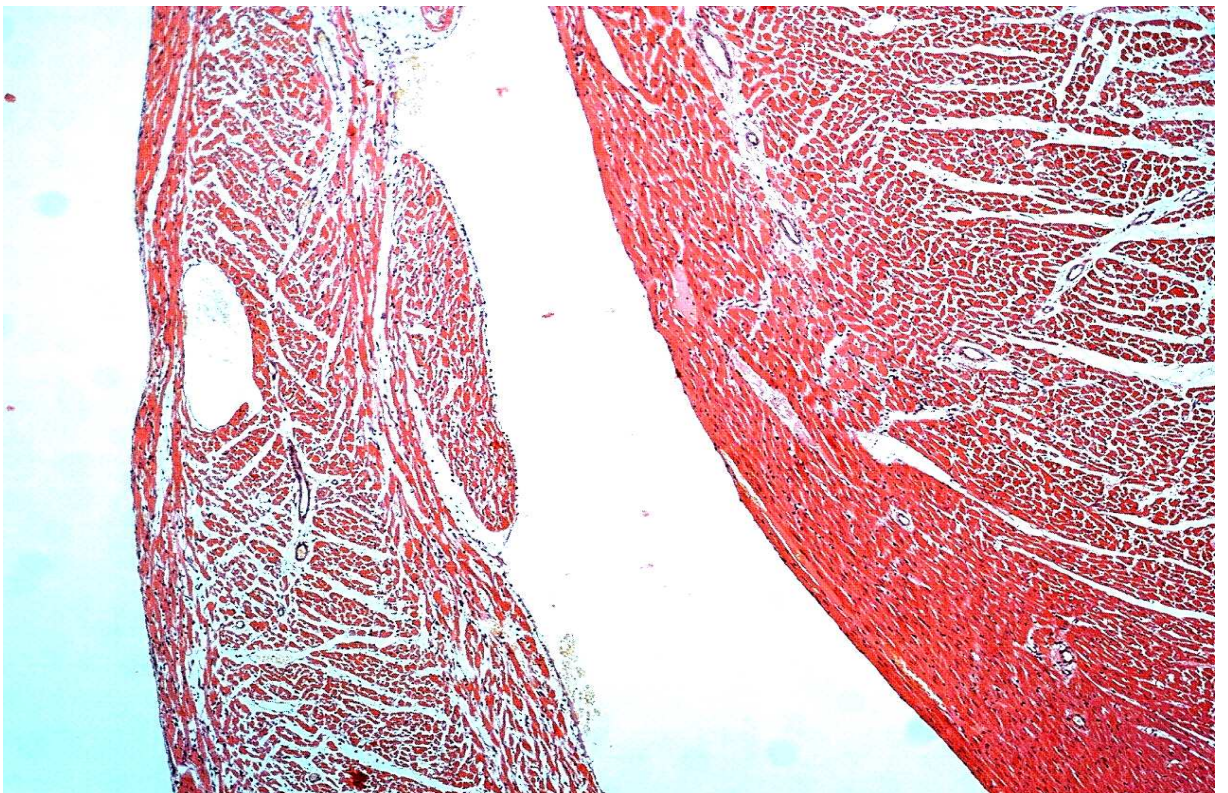
Obr. 19- ISO – endokard – barvení zelený trichrom, zvětšení 200x



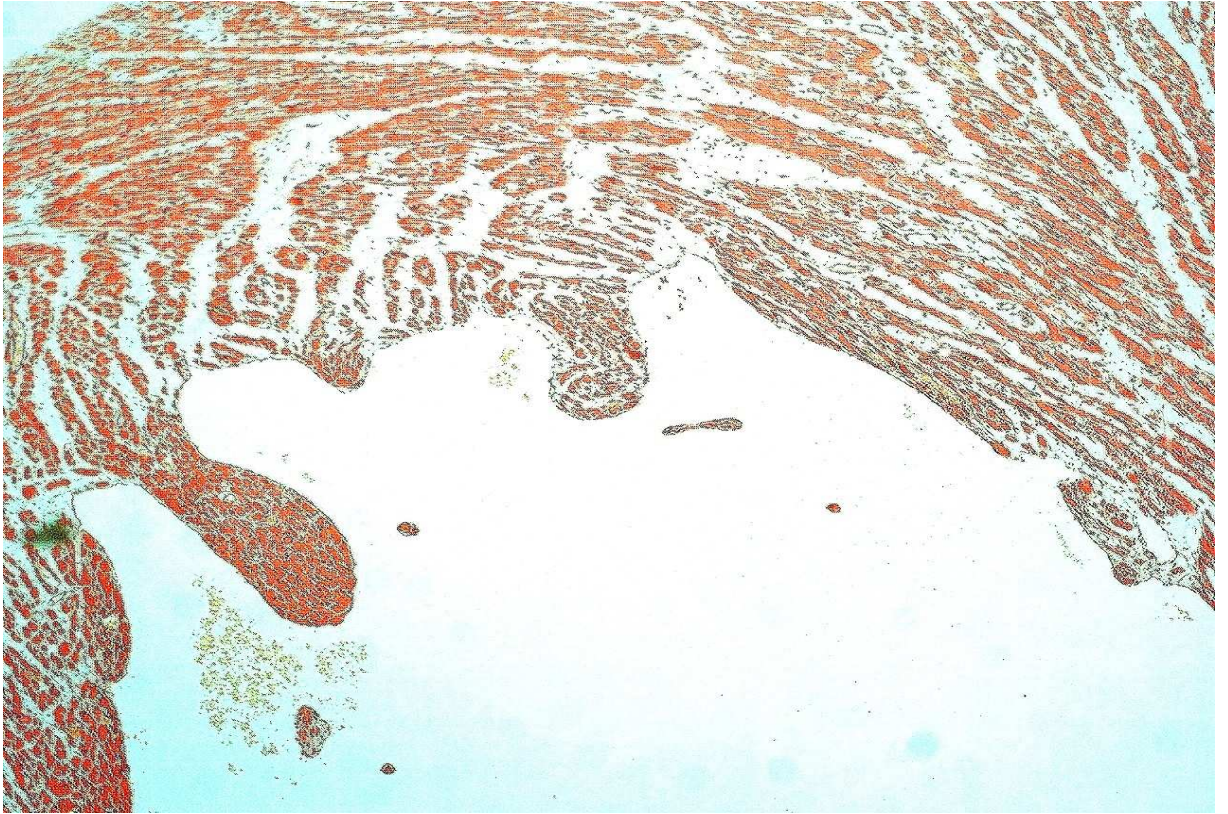
Obr. 20- Rutin – endokard – barvení zelený trichrom, zvětšení 200x



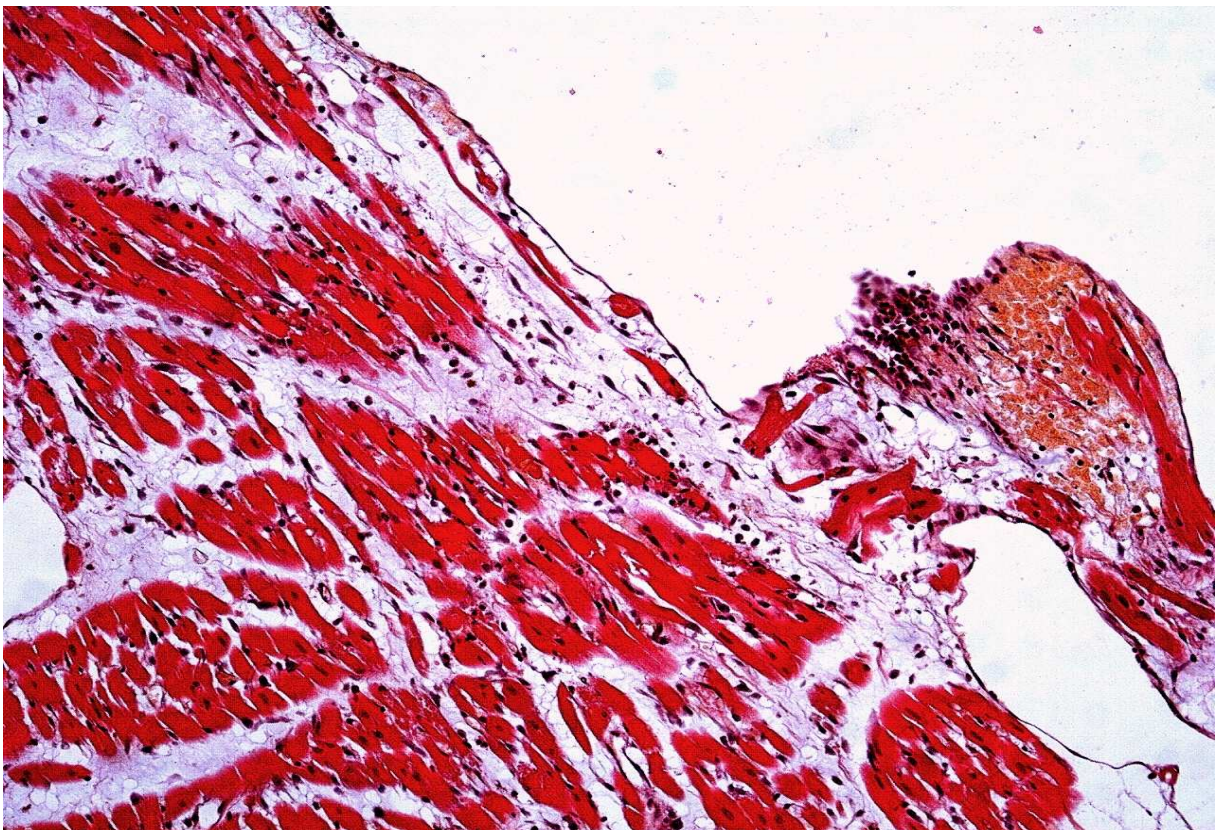
Obr. 21- Rutin – endokard – barvení zelený trichrom, zvětšení 400x



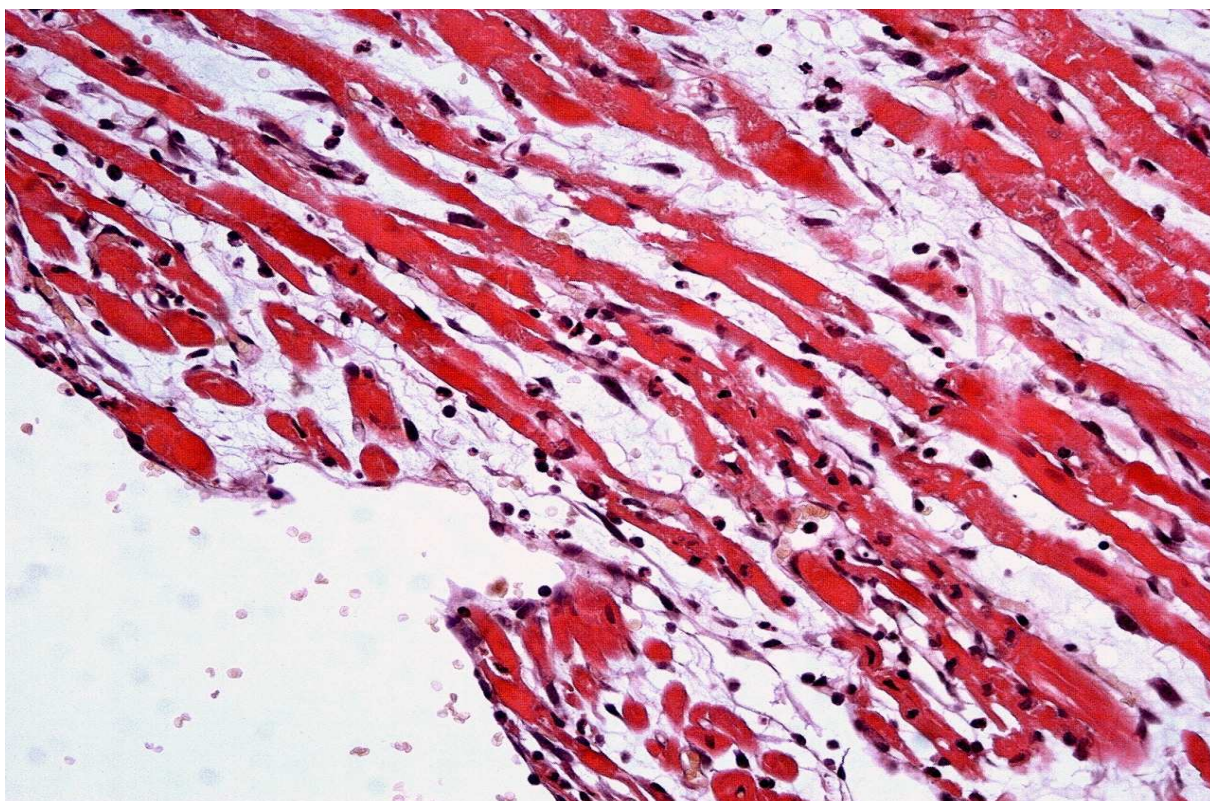
Obr. 22- Rutin + ISO – pravá a levá komora: přehled svaloviny myokardu – barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 40x



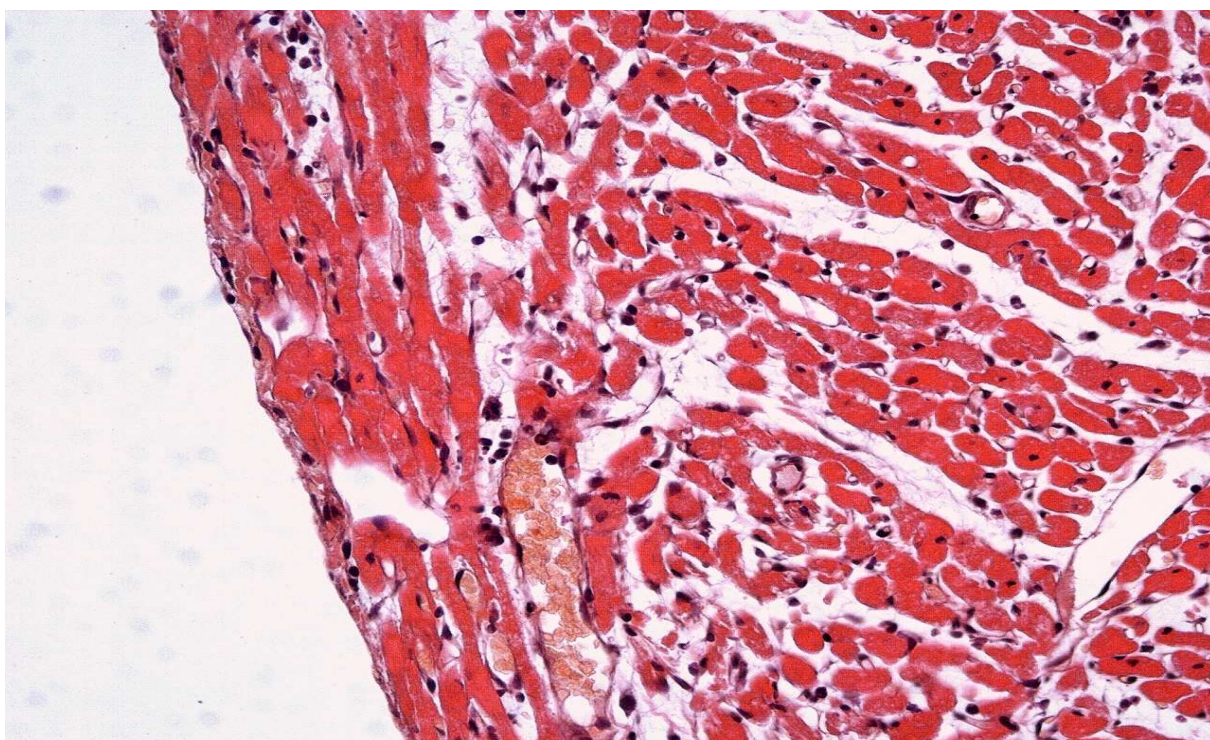
Obr. 23- Rutin + ISO - levá komora: endokard + myokard – barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 40x



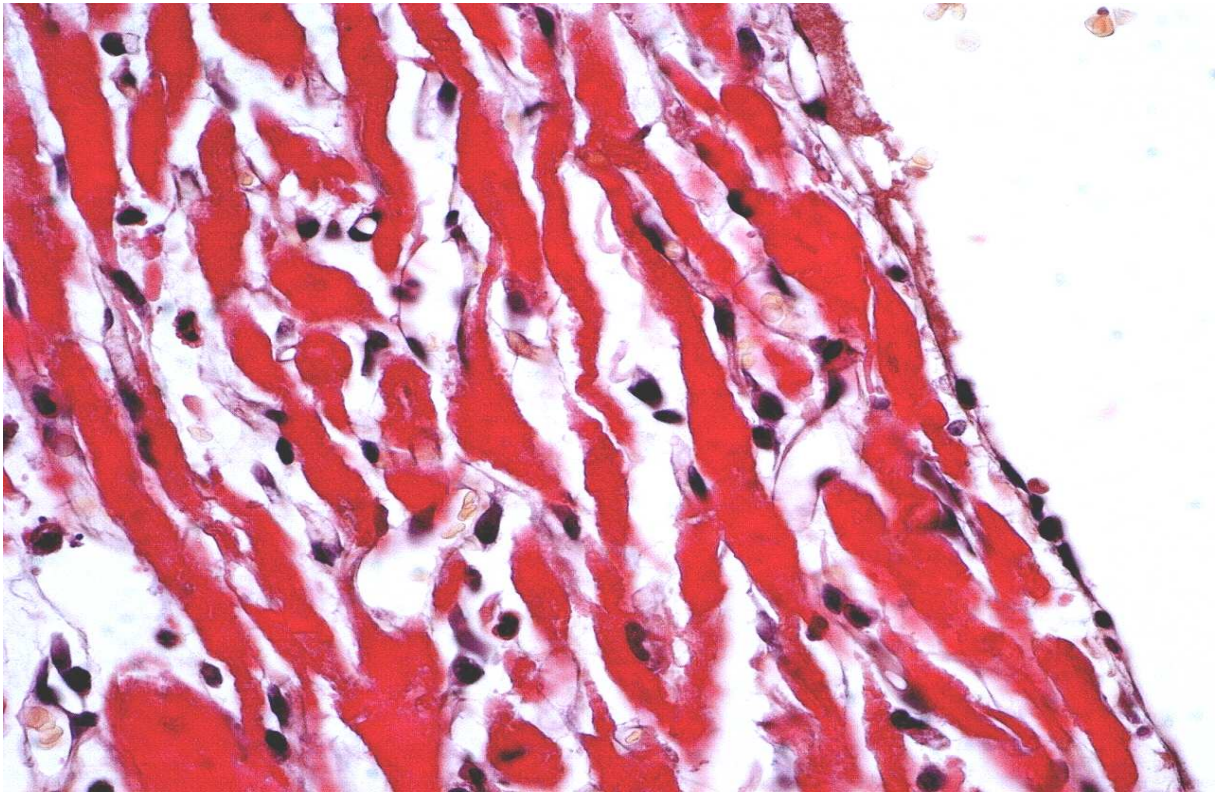
Obr. 24- Rutin + ISO - levá komora: endokard - barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 100x



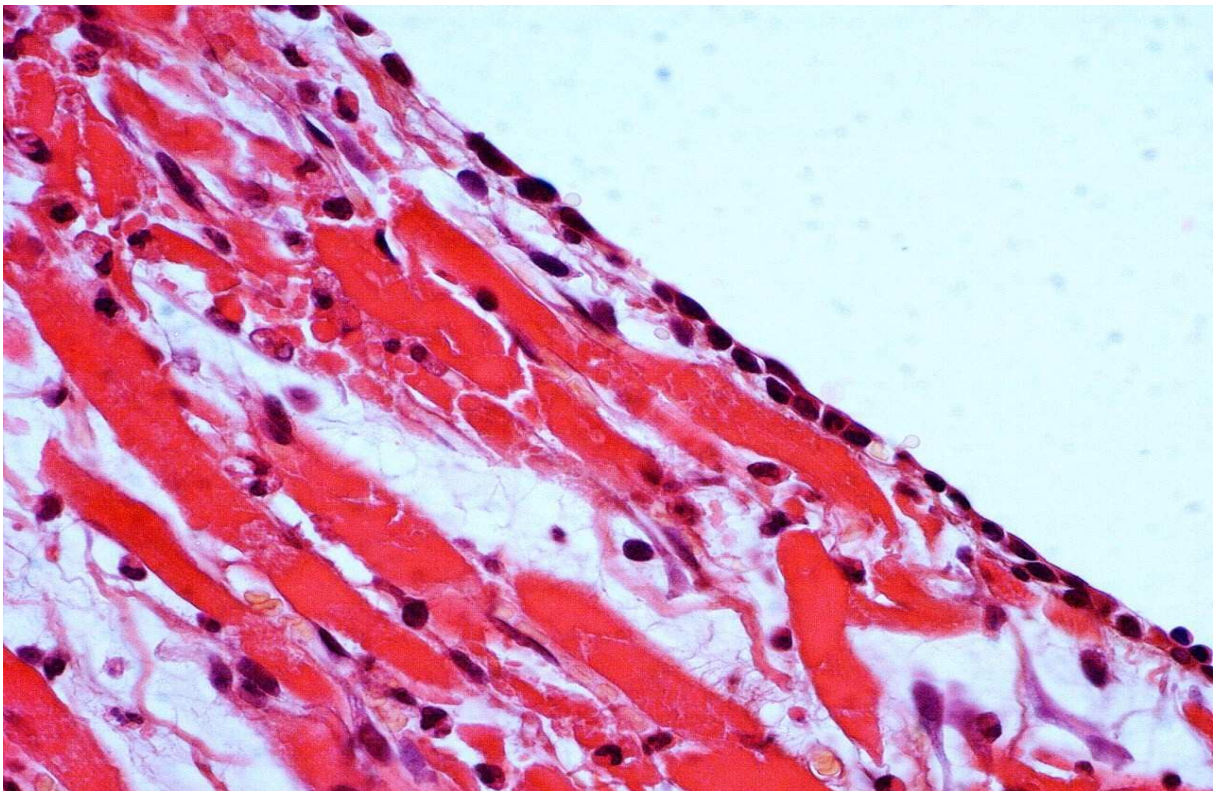
Obr. 25- Rutin + ISO - levá komora: endokard – barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 200x



Obr. 26 – Rutin + ISO - levá komora: epikard – barvení hematoxylin-eosin. Zvětšení 200x

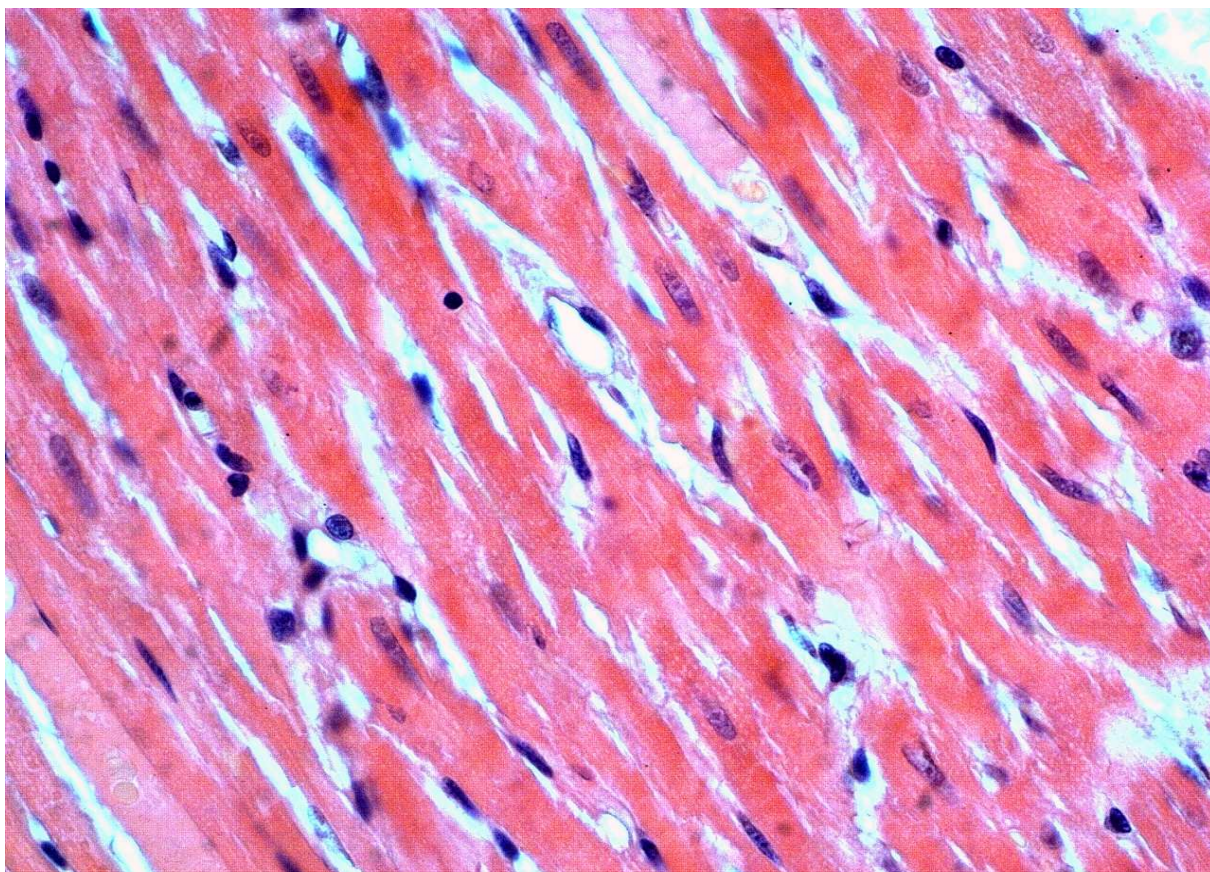


Obr. 27- Rutin + ISO - levá komora: endokard – barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 400x

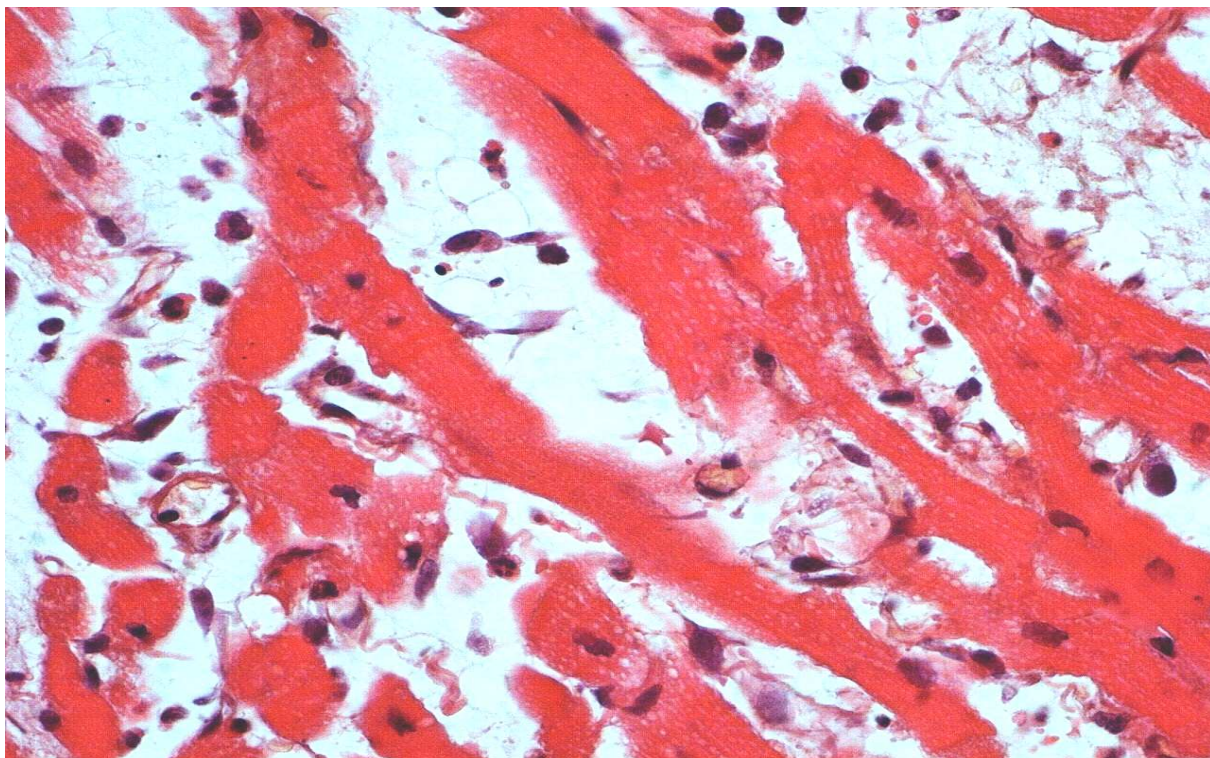


Obr. 28- Rutin + ISO - levá komora: endokard – barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 400x

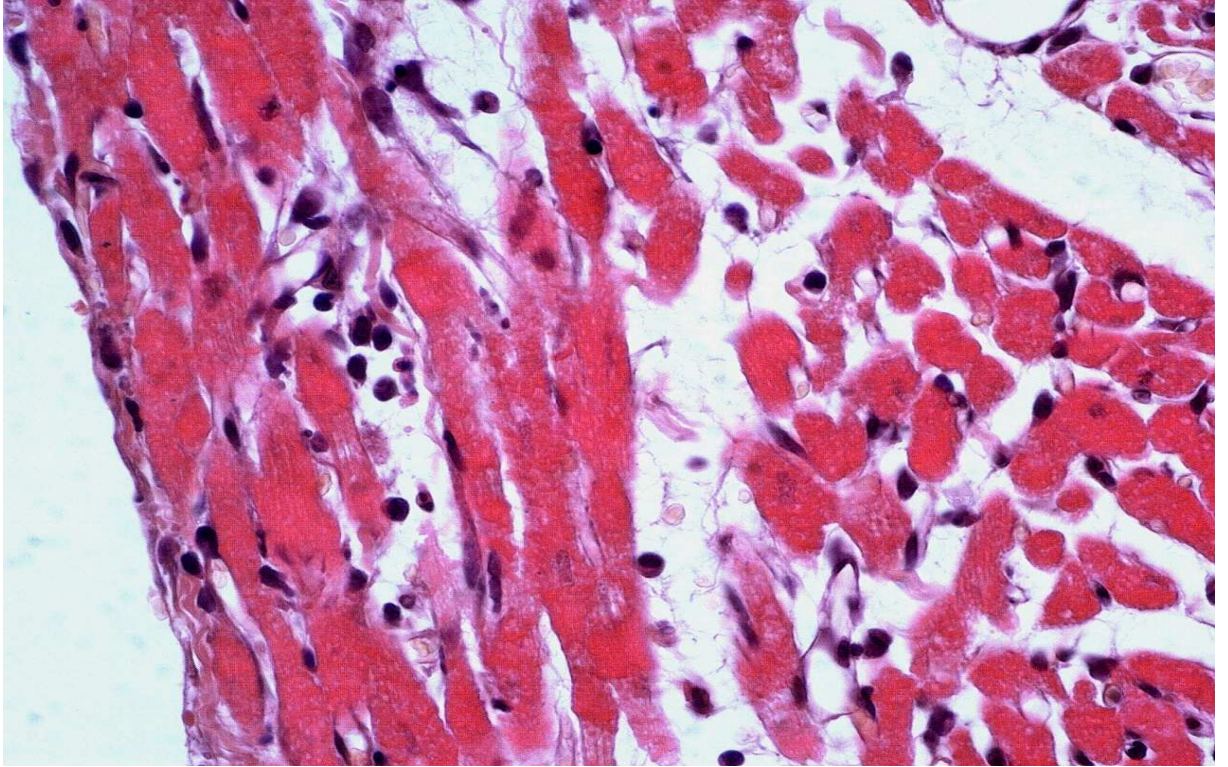




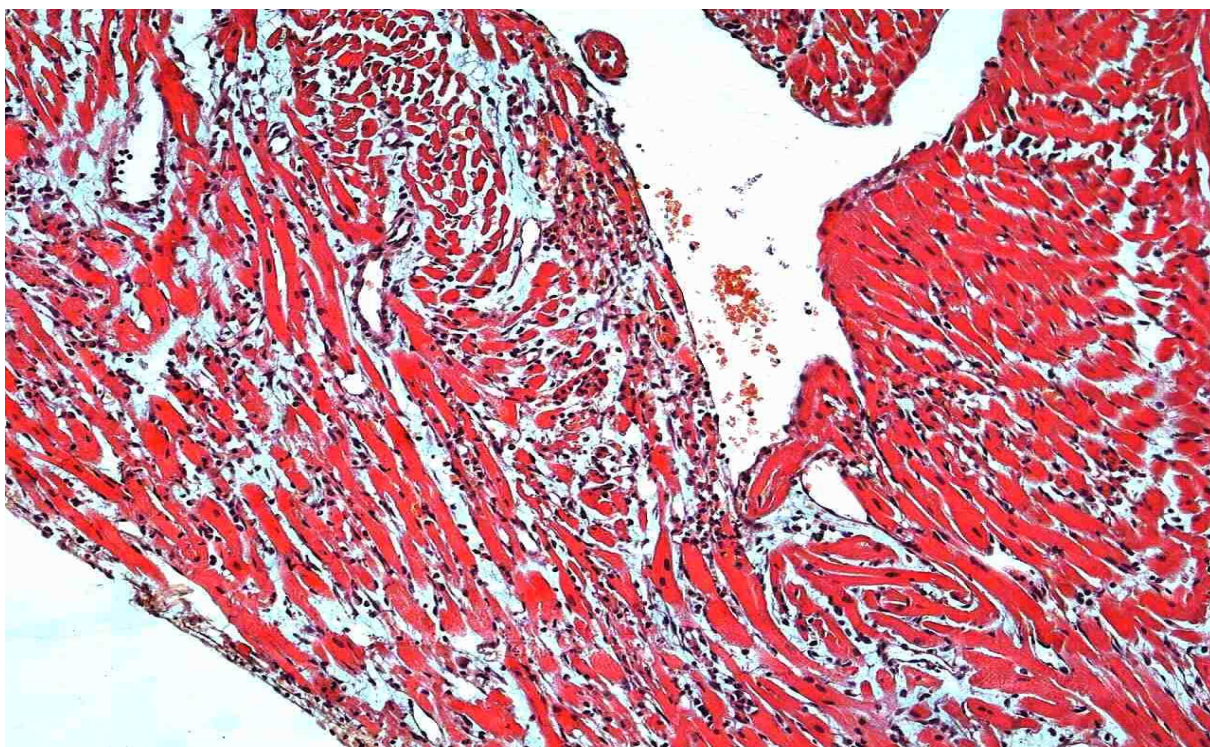
Obr. 29- Rutin + ISO - levá komora: myokard – barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 400x



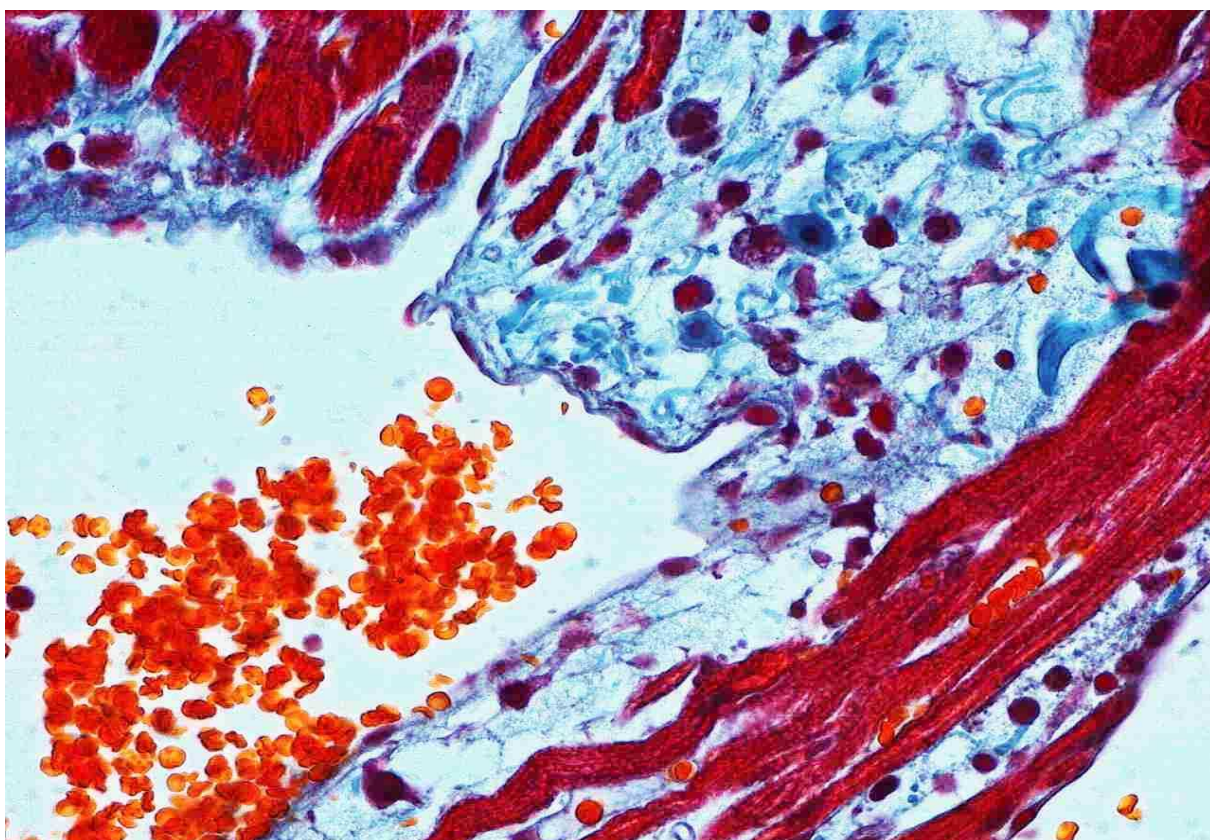
Obr. 30- Rutin + ISO - levá komora: myokard – barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 400x



Obr. 31- Rutin + ISO - levá komora: epikard – barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 400x



Obr. 32- Laktoferin + ISO – řez myokardem – barvení zelený trichrom, zvětšení 200x



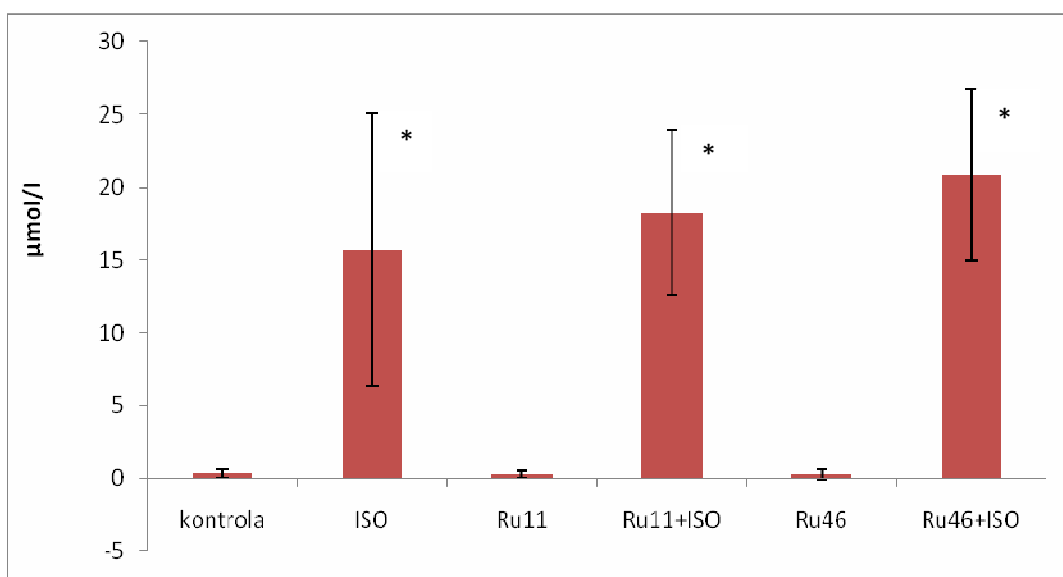
Obr. 33- Laktoferin + ISO – endokard - barvení zelený trichrom, zvětšení 400x

## 4.2. Zhodnocení koncentrace srdečního troponinu T :

Troponin společně s aktinem, tropomyosinem a myosinem je součástí filament příčně pruhované svaloviny.

Troponin je komplex tří podjednotek TnT, TnC , TnI a je uchycen na molekule tropomyosinu. Podjednotka TnT je spojena s tropomyosinem. TnC váže ionty kalcia a TnI omezuje interakci mezi aktinem a myosinem. (20,31)

Primární struktura molekul troponinu u kosterního svalu se liší od struktury troponinu myokardu a jsou odlišitelné imunologicky.(39)



\* $p > 0,001$  vs. kontrola

Obr. 8- Graf naměřených hodnot koncentrací srdečního TnT

Z výsledků koncentrací srdečního TnT zanesených v grafu je patrné, že kontrolní skupina, které byl podáván pouze fyziologický roztok, má naměřenou koncentraci TnT téměř nulovou. To samé je vidět i u skupiny Ru11, které byl podán rutin v dávce 11,5 mg/kg, a u skupiny Ru46, která dostala rutin v dávce 46 mg/kg. U těchto skupin nedošlo k poškození myokardu.

Po podání isoprenalinu došlo k nárůstu hodnot koncentrace srdečního TnT a je zřejmé, že podání isoprenalinu vyvolává poškození srdeční tkáně.

Premedikace rutinem v dávce 11,5 mg/kg nebo v dávce 46 mg/kg nevedla ke snížení hodnot koncentrací srdečního TnT v plazmě.

Na základě výsledků naměřených hodnot koncentrací srdečního TnT v tomto uspořádání experimentu rutin nemá kardioprotektivní účinek.

## **5. DISKUSE**

Rutin (kvercetin-3-rutinosid) je glykosid flavonolu, který se vyskytuje v mnoha rostlinách (především v pohance) a též je obsažen v ovoci a zelenině. Rutinu je připisováno množství aktivit jako například antioxidační vlastnosti, protizánětlivý účinek, antihemoragická aktivita, posílení pevnosti kapilár, regulace kapilární permeability, stabilizace destiček. Dále antibakteriální, antivirové, antiprotozoální, antialergické a antikarcinogenní vlastnosti.(23,24,51,52)

Různé studie poukazují na fakt, že oxidační stres hraje roli ve vzniku kardiovaskulárních onemocnění, a proto by antioxidační terapie měla mít prospěšný efekt při léčbě těchto onemocnění. (9) Během ischemie myokardu jsou ROS přítomny pouze v malém množství, které se však zvýší během reperfuční fáze.(31)Rutin by tedy teoreticky na základě jeho antioxidačních vlastností mohl sloužit právě jako antioxidační terapie u těchto onemocnění.

Ochranu před oxidačním stresem v organismu tvoří především SOD, glutathionperoxidasa, myeloperoxidasa, katalasa, peroxidasy. Dále pak nízkomolekulární endogenní antioxidanty glutathion, kyselina močová, koenzym Q a další. Patří sem i neenzymatické antioxidanty přijímané potravou jako jsou vitamin E, vitamin C a karotenoidy. V posledních letech se věnuje pozornost především polyfenolovým sloučeninám a tyto sloučeniny se tak stávají předmětem zájmu různých studií. (27,41)

V současné době využití flavonoidů jako antioxidantů, je založeno na jejich schopnosti chelátovat ionty kovů, které hrají důležitou roli ve vzniku volných radikálů.(40) Antioxidační schopnost rutinu by teoreticky mohla sloužit jako ochrana organismu před vznikem kyslíkových radikálů.

V této diplomové práci jsme se snažili na základě teoretických znalostí prokázat, nebo naopak vyvrátit předpokládaný kardioprotektivní vliv rutinu u experimentálního poškození myokardu. Jako model poškození myokardu jsme zvolili isoprenalinový model poškození myokardu, který měl posloužit k vyvolání patologického stavu morfologických a biochemických změn některých parametrů, které lze přirovnat k infarktu myokardu. Isoprenalin byl podáván v dávce 100 mg/kg s.c. Dávkování rutinu jsme zvolili 11,5 mg/kg a 46 mg/kg *i.v.* 5 minut před aplikací isoprenalinu. Základem pro nás bylo histologické zhodnocení provedeného experimentu. Pro doplnění výsledků experimentu jsme využili stanovení koncentrace srdečního troponinu T jako specifického markeru poškození myokardu.

Při histologickém zhodnocení provedeného experimentu jsme vycházeli z obrazů získaných světelnou mikroskopií, kde jsme hodnotili změny srdeční tkáně v porovnání s kontrolou. Kontrolní preparáty nejevily známky patologických změn a odpovídaly fyziologickým poměrům v srdci. Mezi kardiomyocyty kontrolního vzorku jsme nepozorovali dilatace intersticiálních prostorů. Svalovina nejevila známky zánětlivého infiltrátu a kapilární náplň byla přiměřená fyziologickým poměrům. Naopak po podání isoprenalinu jsme pozorovali výrazné změny charakteristické rozšířením intersticia

s výrazným zánětlivým kulatobuněčným infiltrátem především v subendokardu. Dále jsme pozorovali ztrátu barvitelnosti jader a degenerativní změny v kardiomyocytech. Jak jsme očekávali ISO vyvolal poškození srdeční tkáně.

Již v histologické studii Chagoya de Sánchez et. al jsou popsány změny v mikroskopickém obrazu po aplikaci isoprenalinu v dávce 67 mg/kg s.c. v průběhu 96 hodin. V této studii jsou infarktu podobné změny především v oblasti subendokardu a totéž jsme pozorovali i v našem provedení experimentu, kde byl podáván isoprenalin v dávce 100 mg/kg.(43)

Lze tedy říci, že aplikace isoprenalinu vyvolává infarktu podobné změny srdeční tkáně s charakteristickým histologickým obrazem. Po aplikaci pouze rutin jsou však v menší míře též patrné změny v podobě dilatací intersticiálních prostorů se zánětlivou infiltrací. Předpoklad, že rutin by měl mít kardioprotektivní vliv se nám nepodařilo v tomto uspořádání experimentu prokázat a aplikace rutin 5 minut před aplikací isoprenalinu neměla vliv na poškození myokardu vyvolané isoprenalinem. V histologickém obraze jsme opět zaznamenali edematózní změny intersticiálních prostorů, zánětlivý infiltrát, ztrátu barvitelnosti jader a degenerativní změny kardiomyocytů především v oblasti pod endokardem. Z histologického zhodnocení provedeného experimentu vyplývá, že rutin nemá kardioprotektivní účinek v tomto uspořádání experimentu.

Pro upřesnění zhodnocení poškození myokardu jsme zvolili kardiospecifický TnT. Srdeční troponiny jsou popisovány jako orgánově specifické biochemické markery poškození myokardu. Orgánově specifické jsou proto, že primární struktura troponinu kosterního svalu se liší od primární struktury troponinu myokardu a je možné je odlišit imunologicky. Na základě této orgánové specifity troponinů stoupá jejich využití oproti ostatním markerům srdečního poškození. Výhodou stanovení troponinů je i fakt, že k vzestupu jejich koncentrace v krvi dochází po 2-4 hodinách od poškození myokardu a dále pokračuje jejich postupné uvolňování z již nekrotických myofibril kardiomyocytů, které podmiňuje trvání zvýšené koncentrace troponinů v krvi v řádu 7-14 dní. Pro tyto vlastnosti jsou v posledních letech srdeční troponiny považovány za nejlepší markery srdečního poškození. (39,57)

Hodnoty koncentrací srdečního TnT v tomto experimentu nejevili tendenci k poklesu u skupin, které byli premedikováni rutinem. Koncentrace srdečního TnT v plazmě u kontrolní skupiny a skupin, kterým byl aplikován pouze rutin byly téměř nulové a nelze usuzovat na poškození srdeční tkáně. Naopak podání isoprenalinu v dávce 100 mg/kg s.c. vyvolalo výrazný vzestup koncentrace srdečního TnT. Vzestup koncentrace srdečního TnT po aplikaci isoprenalinu je následkem nekrózy myokardu. Ani z biochemického pohledu stanovení hladin koncentrací srdečního TnT v plazmě rutin nemá předpokládaný kardioprotektivní účinek v tomto uspořádání experimentu.

V této diplomové práci jsme neprokázali kardioprotektivní efekt rutin u experimentálního poškození myokardu. Otázkou je především volba dávkování rutin. Při dalších studiích zabývajících se účinky rutin by bylo vhodné dlouhodobé podávání

rutinu v různých dávkách, které by nám pomohlo prokázat nebo naopak vyvrátit předpokládaný protektivní účinek rutinu.

Obdobné výsledky jsme pozorovali v bakalářské práci, kde jsme se snažili prokázat kardioprotektivní účinek laktoferinu, jako též látky s antioxidačními vlastnostmi. Laktoferinu je též připisováno množství biologických aktivit a některé z nich jsou spojovány s jeho schopností vazby železa a naopak jiné z nich se jeví na této schopnosti nezávislé. V předchozí práci jsme též využili isoprenalinový model poškození myokardu a isoprenalin byl rovněž aplikován v dávce 100 mg/kg s.c. Jako teoreticky protektivní látku jsme aplikovali laktoferin v dávce 2 a 2,5 mg v 0,5 ml gastrické sondy. V histologickém zhodnocení jsme pozorovali podobné změny jako u experimentu provedeného s rutinem. Premedikace laktoferinem taktéž nevedla k ochraně srdeční tkáně před poškozením isoprenalinem. Histologický obraz po aplikaci isoprenalinu opět vykazoval patologické změny v podobě dilatace intersticiálních prostorů a zánětlivého infiltrátu především v oblasti subendokardu a subperikardu. Podaný laktoferin nezabránil patologickým změnám srdeční tkáně. Taktéž stanovení koncentrace srdečního TnT nevykazovalo pokles po premedikaci laktoferinem. (10)

V další práci by bylo vhodné především navrhnout dlouhodobé podávání rutinu (případně laktoferinu) v různých dávkách.



## **6. ZÁVĚR**

Tato diplomová práce je navazující prací na bakalářskou práci: Biologická úloha laktoferinu. Diplomová práce je sepsána formou teoretické a experimentální části. Odborné vedení a informace poskytli Doc.RNDr. Vladimír Semecký a Mgr. Přemysl Mladěnka PhD.

V teoretické části jsme použili odborných článků a učebnic k sepsání poznatků o struktuře, výskytu, aplikacích a biologických účincích rutinu. Dále jsme se zaměřili na charakteristiku ROS a tzv. reperfúzní paradox, ischemické poškození srdce a isoprenalinový model poškození myokardu.

V experimentální části je popsáno provedení experimentu a histopatologické zhodnocení odebraných vzorků myokardu, které byly zpracovány histologickou technikou pro světelnou mikroskopii. Histopatologické zhodnocení je doplněno o zhodnocení koncentrací srdečního troponinu T v plazmě experimentovaných potkanů. V experimentu byl využit isoprenalinový model poškození myokardu, který vyvolává morfologické a biochemické změny některých parametrů, které lze přirovnat k infarktu myokardu.

Tato práce by mohla být využita při dalším studiu biologických aktivit rutinu.

## **7. LITERATURA**

1. Ambrose A.M., Deeds F. : *Effect of rutin on permeability of cutaneous capillares*. JPET August 1947; vol. 90, no. 4, 359-363
2. Baker E.N., Anderson B.F., Baker H.M., Haridas M., Norris G.E., Rumball S.V., Smith C.A.: *Metal and anion binding sites in lactoferrin and related proteins*. Pure & Appl. Chem., 1990; Vol.62, No 6.,1067-1070
3. Baker E.N, Baker H.M. : *Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin*. Cell. Mol. Life Sci. 62, 2005; 2531-2539
4. Beregovich J., Reicher-Reiss H., Grihman A. : *Haenodynamic effect of isoprenaline in acute myocardial infarction*. British Heart Journal, 1972; 34, 705-710
5. Boyle SP, Dobson VL, Duthie SJ, Hinselwood DC, Kyle JAM, Collins AR : *Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study*. European Journal of Clinical Nutrition 54, 2000; 774-782
6. Brychtová S., Hlobilková A. : *Histopatologický atlas*. Grada Publishing,a.s., Praha,2008; 12-14
7. Conneely O. M. : *Antiinflammatory activities of lactoferrin*. Journal of the American College of Nutrition 2001;Vol.20, No.5,389-395
8. Cook N.C., Samman S. : *Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effect, and dietary sources*. Nutritional Biochemistry 7,1996;66-76
9. Dhala, Naranjan S.; Temsah, Rana .M.; Netticadan, Thomas : *Role of oxidative stres in cardiovascular diseases*. Journal of Hypertension, June 2000; Volume 18, Issue 6, 655-673
10. FilipovaV.: *Biologická úloha laktoferinu*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, fakulta v Hradci Králové, 2008
11. Gao Z., Xu H., Huang K. : *Effects of Rutin Supplementation onAntioxidant Status and Iron, Copper, and Zinc Contents in Mouse Liver and Brain*. Biological Trace Elemnt Research, 2002; vol.88
12. Guilliams T.G. : *Venous Disorders : More than a cosmetic concern*. A consise update of important issues concerning natural health ingredients, 1998;Volume 1, No. 4

13. Guruvayoorappan C., Kuttan G. : *Antiangiogenic Effect of Rutin and its Regulatory Effect on the Production of VEGF, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in Tumor Associated Macrophages*. Journal of Biological Science 7(8), 2007; 1511-1519
14. Hagivara T., Ozava K., Fukuwatari Y., Hayasawa H., Hirohata Y., Adachi A., Kanda S., Aihara K. : *Effects of lactoferrin on iron absorption in immature mice*. Nutrition Research, 1997; Vol. 17, No.5, 895-906
15. Han Y. : *Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by Candida albicans*. International Immunopharmacology 9, 2009; 207-211
16. Hlúbik P., Strítecká H., Fajfová J. : *Antioxidanty v klinické praxi*. Interní Med. 2006; 79-81
17. Holeček V. : *Volné radikály, antioxidanty a jak dále?* Klin.Biochem.Metab., 14(35), 2006; No 3, 140-145
18. Jahodář L. : *Farmakobotanika, semenné rostliny*. Karolinum, Praha, 2006; 64
19. Jessen H., Hancock R.E.W. : *Antimicrobial properties of lactoferrin*. Biochimie 91, 2009; 19-29
20. Junqueira L.C., Carneiro J., Kelley R.O. : *Základy histologie*. H&H, Jinočany, 1999; 184-218
21. Kanyshkova T.G., Buneva V.N., Nevinsky G.A. : *Lactoferrin and Its Biological Functions*. Biochemistry (Moscow), Vol.66, No.1, 2001, pp. 1-7. Translated from Biokhimiya, 2001; Vol.66, No.1, 5-13
22. Konrádová V., Uhlík J., Vajner L. : *Funkční histologie*. H & H, 2. vyd., 2000; 124-126
23. Kreft I., Fabjan N., Yasumoto K. : *Rutin content in buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) food materials and products*. Food Chemistry 98, 2006 : 508-512
24. Kurisawa M., Chung J.E., Uyama H., Kobayashi S. : *Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly (rutin)*. Biomacromolecules 4, 2003; 1394-1399

25. La Casa C., Villegas I., Alarcón de la Lastra C., Motilva V., Calero M.J.M. : *Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions*. Journal of Ethnopharmacology 71, 2000; 45-53
26. Langmeier M. a kolektiv : *Základy lékařské fyziologie*. Grada Publishing, a.s., Praha, 2009, 61-62
27. Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J. : *Biochemie pro studující medicíny*. Karolinum, Praha1, 2005; 94-98
28. Legrand D., Elass E., Pierce A., Mazurier J. : *Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties*. BioMetals 17, 2004; 225-229
29. Lin J.-P., Yang J.-S., Lu Ch.-Ch., Chiang J.-H., Wu Ch.-L., Lin J.-J., Lin H.-L., Yang M.-D., Liu K.-Ch., Chiu T.-H., Chung J.-G. : *Rutin inhibits the proliferation of murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promotes immune response in vivo*. Leukemia Research 33, 2009; 823-828
30. Loh H.K., Sahoo C., Kishore K., Ray R., Nag T.C., Kumari S., Arya D.S. : *Effect of thalidomide on isoprenaline-induced acute myocardial infarction: A haemodynamic, histopathological and ultrastructural study*. Journal compilation, Nordic Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & toxicology, 100, 2007; 223-239
31. Masopust J., Průša R. : *Patobiochemie buňky*. Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Praha 2003
32. Masopust J. : *Vývoj biochemických hodnot u různých srdečních onemocnění*. Klinická biochemie, speciální část-7. srdce, Dostupné z: [https://www.zdravcentra.cz/index.php?act=k-10&did=1035&page=kapitoly%2Fspecialni\\_cast%2Fsrdce%2F7\\_3.htm](https://www.zdravcentra.cz/index.php?act=k-10&did=1035&page=kapitoly%2Fspecialni_cast%2Fsrdce%2F7_3.htm) ke dni 29.3.2010
33. Masopust J. : *Reaktivní formy kyslíku (volné kyslíkové radikály)*. Klinická biochemie, speciální část-9. klinická biochemie zánětlivých procesů, Dostupné z: [https://www.zdravcentra.cz/index.php?act=k-10&did=1035&page=kapitoly%2Fspecialni\\_cast%2Fznetlive\\_procesy%2F9\\_10.htm](https://www.zdravcentra.cz/index.php?act=k-10&did=1035&page=kapitoly%2Fspecialni_cast%2Fznetlive_procesy%2F9_10.htm) ke dni 29.3.2010

34. Martínek J., Vacek Z. : *Histologický atlas*. Grada Publishing,a.s., Praha,2009;11-18
35. Mladěnka P., Zatloukalová L., Šimůnek T., Bobrovová Z., Semecký V., Nachtigal P., Hašková P., Macková E., Vávrová J., Holečková M., Palicka V., Hrdina R. : *Direct administration of rutin does not protect against catecholamine cardiotoxicity*. *Toxicology* 255, 2009; 25-32
36. Nagasako Y., Saito H., Tamura Z., Shimamura S., Tomita M.: *Iron-Binding Properties of Bovine Lactoferrin in Iron-Rich Solution*. *J Dairy Sci* 1993; 76, 1876-1881
37. Ohta H., Azuma J., Onishi S., Awata N., Takihara K., Kishimoto S. : *Protective effect of taurine against isoprenaline-induced myocardial damage*. *Basic Res cardiol* 81, 1986; 473-481
38. Protivová V. : *Flavonoidy a jejich role ve vývoji rostlin*. Bakalářská práce, Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno 2006
39. Racek J. : *Klinická Biochemie*, Galén, Praha, 2006,173-177
40. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. : *Antioxidant properties of phenolic compounds*. Elsevier Science Ltd, April 1997, Vol. 2, No 4
41. Řeháková Z. : *Vyhledávání biologicky aktivních rostlinných sekundárních metabolitů: Testy antioxidantní a antiagregační aktivity*. Autoreferát k disertační práci, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové,2009
42. Řihošková J. : *Biochemické aspekty konzumace čokolády*.Univerzita Pardubice, Fakulta Chemicko-technologická,2009
43. Sánchez Ch.V., Muñoz R.H., Barrera F.L., Yanez L., Vidrio S., Suárez j., Garza D.C., Fraustro A.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. Pharmacol.* 75, 1997;1300-1311
44. Selloum L., Bouriche H., Tigrine Ch., Boudoukha Ch. : *Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation*. *Exp Toxic Pathol* 2003;54: 313-318

45. 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. 289,1998; 303-317
46. Silbernagl S., Lang F. : *Atlas patofyziologie člověka*. Grada Publishing, Praha, 2001;176-233
47. Slanina J., Táborská E. : *Příjem, biologická dostupnost a metabolismus rostlinných polyfenolů u člověka*. Chem. Listy 98, 2004;239-245
48. 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, 11-17
49. Susana A. González-Chávez, Sigifredo Arévalo-Gallegos, Quintín Rascón-Cruz : *Lactoferrin: structure, function and applications*. International Journal of Antimicrobial Agents 33 (2009); 301.e1-301e8
50. Tůmová L., Píchová M., Dušek J. : *Pohanka obecná a její terapeutické využití*. Praktické lékařství 4, 2007;190
51. Webster R.P., Gawde M.D., Bhattacharya R.K. : *Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats*. Cancer Letters 109, 1996; 185-191
52. Yang J., Guo J., Yuan J. : *In vitro antioxidant properties of rutin*. LWT 41, 2008; 1060-1066
53. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Rutin> ke dni 24.3.2010
54. <http://www.zentiva.cz/default.aspx/cz/productadd?Kod=000020&DetailType=detail&Type=20> ke dni 28.3.2010
55. <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/farmakoterapie-chronicke-zilni-insuficience-162719> ke dni 28.3.2010
56. <http://de.wikipedia.org/wiki/Isoprenalin> ke dni 29.3.2010
57. <http://www.cskb.cz/cskb.php?pg=doporuceni--kardialni-markery> ke dni 2.4.2010