

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

Vliv intravenózní aplikace laktoferinu na časnou fázi ischemie myokardu.

II. Biochemické vyšetření.

(rigorózní práce)

Vedoucí rigorózní práce :

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Vedoucí katedry :

PharmDr. Petr Jílek, CSc

Březen, 2009

Mgr. Veronika Písaříková

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

OBSAH	3
ZKRATKY	4
1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. LAKTOFERIN	9
2.1.1. Struktura	9
2.1.2. Vlastnosti	9
2.1.3. Výskyt	10
2.1.4. Účinky	10
2.1.5. Farmakologické podání	12
2.2. REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	14
2.3. ŽELEZO	16
2.4. MYOKARD	19
2.4.1. Struktura a fyziologie	19
2.4.2. Ischemická choroba srdeční	20
2.4.3. Ischemicko-reperfúzní poškození	21
2.4.4. Biochemická diagnostika	22
2.5. ISOPRENALIN	24
3. CÍL PRÁCE	25
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1. METODICKÁ ČÁST	28
4.1.1. Zvířata	28
4.1.2. Chemikálie a přístroje	28
4.1.3. Provedení experimentu	28
4.1.4. Biochemické parametry	29
4.1.5. Vápník v srdci	30
4.1.6. Statistická analýza	30
5. VÝSLEDKY	31
6. DISKUZE	36
7. ZÁVĚR	39
8. ABSTRAKT	41
9. SUMMARY	44
10. LITERATURA	46

ZKRATKY

AIM	akutní infarkt myokardu
AK	aminokyselina
ApoE	apoprotein E
apoLf	apolaktoferin
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
CK	kreatinkináza
DMT 1	transportér pro dvojmocné kovy 1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FADH	flavin adenin dinukleotid fosfát
FR	feritin
GSH	glutathion
GPx	glutathion peroxidáza
holoLf	hololaktoferin
i.v.	intravenózní aplikace
ICAM-1	intracelulární adhezivní molekula 1
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL	interleukin
LD	laktátdehydrogenáza
Lf	laktoferin
LIP	labilní intracelulární pool železa
LRP	receptor pro lipoproteiny o nízké hustotě
ISO	isoprenalin
MAO	monoamino oxidáza
MDA	malonyldialdehyd
MK	mastná kyselina
NADH	nikotin amid adenin dinukleotid
NADPH	nikotin amid adenin dinukleotid fosfát
NK buňky	natural killer buňky
p.o.	perorální podání
ROS	reaktivní formy kyslíku
s.c.	subkutánní aplikace

SR	sarkoplazmatické retikulum
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TF	transferin
TFR	receptor pro transferin
Tn	troponin
cTn	kardiální troponin
VEGF ₁₆₅	vaskulární endotelový růstový faktor

1. ÚVOD

Laktoferin je protein, který se přirozeně vyskytuje v lidském organismu, zejména v sekretech exokrinních žláz. V malém množství se nachází i v některých tkáních a krvi. Jeho molekula byla poprvé izolována z mateřského mléka roku 1960. V organismu vykazuje široké spektrum účinků, které ve velké míře souvisí se schopností vázat železo a jiné molekuly.

Ischemická choroba srdeční je ve vyspělých zemích jedním z nejčastěji se vyskytujících onemocnění a je jednou z nejčastějších příčin hospitalizace a úmrtnosti v dospělé populaci. V České republice ročně umírá na ischemickou chorobu srdeční přibližně 30 000 osob, z toho přes 20% tvoří osoby mladších 65 let. Vzhledem k těmto okolnostem probíhá výzkum látek, které by mohli mít protektivní účinky na myokard.

V současné době je laktoferin studován jako potenciální léčivá látka, která by mohla zmírnit poškození myokardu při ischemii a následně při obnově prokrvení ischemické tkáně (reperfúzi). Jedním z faktorů, které přispívají k poškození tkáně, jsou reaktivní sloučeniny kyslíku. Reakce, při kterých vznikají volné kyslíkové radikály, jsou katalyzovány volnými ionty železa. Díky schopnosti chelatovat volné železité ionty je laktoferin schopen snížit tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů. Jeho afinita k železu je 260krát vyšší než u transferinu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. LAKTOFERIN

2.1.1. Struktura

Laktoferin (Lf) je monomerní, železo vázající glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 80 kDa. (1)

Lidský Lf je přibližně ze 60 % shodný se sérovým transferinem a přibližně ze 70 % je shodný s Lf, který se nachází u jiných živočišných druhů (hovězí, vepřový, koňský, velbloudí, kozí, buvolí a myší). (1)

Protein je tvořen dvěma homologními globulárními podjednotkami – N-podjednotkou a C-podjednotkou. Každá z těchto podjednotek se skládá ze dvou domén (N1, N2 a C1 a C2), které společně tvoří vazebné místo pro Fe^{3+} . Obě podjednotky jsou spojeny peptidem složeným z 10-15 AK zbytků. (1,6)

2.1.2. Vlastnosti

Lf uvolňuje železo v prostředí při pH kolem 3, zatímco transferin uvolňuje železo už při pH 5,5. Afinity Lf k železu je asi 260krát vyšší než afinita sérového transferinu a na rozdíl od transferinu je schopen udržet železo i při nižším pH. (6)

V přirozeném stavu je Lf z 15-20% nasycen železem a má lososově růžovou barvu, jejíž intenzita je závislá na stupni nasycení železem. Lf, který obsahuje menší množství než 5% železa, je označován jako **apolaktoferin** (apoLf). Naopak Lf plně nasycený železem je **hololaktoferin** (holoLf). V mateřském mléce se Lf nachází v podobě apoLf. (6)

1 mg Lf je schopen vázat 1,4 μg železa. (5) Lf má i určitou afinitu k jiným kovům a může vázat např.: Cu^{2+} , Mn^{3+} , Co^{3+} a Zn^{2+} ionty. (6)

2.1.3. Výskyt

Lf se fyziologicky vyskytuje v sekretech exokrinních žláz, např.: v slzách, slinách, mléce, synoviální a seminální tekutině, žluči a pankreatické šťávě, které jsou lokalizovány ve vstupních branách do trávicího, respiračního a reprodukčního systému. Lf zde tvoří bariéru proti patogenům. Ve velmi malém množství byl Lf nalezen ve vzorcích moče a stolice. (6,7)

Jeho koncentrace v krvi je naopak velmi malá za fyziologických podmínek. Během zánětlivých procesů v organismu je Lf uvolňován ze sekundárních granul neutrofilů. (6) Po degranulaci je Lf transportován do jater, kde je vychytáván specifickými receptory a následně rozložen. (9)

2.1.4. Účinky

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

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

Antimikrobiální účinky

Lf má schopnost vázat železo a tím omezuje jeho přísun bakteriím. Železo je esenciální živinou pro bakterie a při nedostatku železa dochází k zastavení růstu bakterií. (9)

Antivirové účinky

Lf je schopen redukovat aktivitu různých virů hlavně *in vitro*. Mechanismus tohoto účinku je zatím nejistý. Pravděpodobně souvisí s blokováním interakcí mezi hostitelskou buňkou a virem. Tento účinek vyplývá ze schopnosti Lf vázat kyselé molekuly. (9)

Ovlivnění zánětu

Lf je důležitou složkou první obranné linie organismu. Při zánětlivé reakci je uvolněn ze sekundárních granulí neutrofilů do infikované tkáně a do krve. Za fyziologických podmínek dosahuje koncentrace Lf v krvi 0,4-2 mg/l, ale během patologické reakce vzroste až na 200 mg/l. (17)

Studie *in vitro* a *in vivo* prokázaly, že Lf inhibuje produkci některých cytokinů, mezi které patří TNF- α a IL-1 β , IL-6. Tyto cytokiny jsou klíčovými mediátory zánětlivé odpovědi. Lf může mít i prozánětlivé účinky. Indukuje uvolnění IL-8, TNF- α a oxidu dusnatého (NO). Lf také inhibuje expresi adhezivních molekul (E-selektin, ICAM-1, IL-8) na endoteliálních buňkách, které jsou nutné pro přestup imunitních buněk do místa zánětu.

Imunomodulační účinky

V *in vitro* studiích bylo zjištěno, že Lf může indukovat buněčnou proliferaci a maturaci tím, že slouží jako dárce železa pro T-buňky. Lf tedy reguluje zrání a aktivaci T-lymfocytů. (17)

Antitumorové účinky

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

Laktoferin jako růstový faktor

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

Enzymatická aktivita

Různé frakce purifikovaného lidského Lf mají 5 enzymových aktivit: DNáza, RNáza, ATPáza, fosfatáza a hydroláza malto-oligosacharidů. Odlišná enzymová aktivita je dána specifickou konformací monomerního Lf, kterou ovlivňují navázané ligandy. DNázová a RNázová aktivita přispívá k ochraně před viry a bakteriemi tak, že hydrolyzuje jejich nukleové kyseliny. Některé z katalytických schopností jednotlivých frakcí jsou cytotoxické a indukují apoptósu. (2)

Regulace transkripce genů

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

2.1.5. Farmakologické podání

Intravenózní podání (i.v.)

Intravenózně podaný Lf je rychle vychytáván játry z cirkulace potkanů, myší a králíků (92.8 +/- 9.5% dávky 5 minut po podání). Na parenchymálních buňkách se nachází receptor, který slouží k vychytávání apoE lipoproteinů. Díky podobnosti v sekvenci AK Lf a apoE lipoproteinů dochází ke kompetici o vazebné místo a Lf může tedy blokovat vychytávání apoE lipoproteinů.

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

Perorální podání (p.o.)

Lf je odolný vůči proteolytické degradaci trypsinem a jemu podobným enzymům. HoloLf je více rezistentní než apoLf. (11)

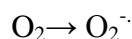
Lf podaný p.o. má protektivní účinky proti různým nemocem jak u zvířat tak u lidí. V trávicím traktu se Lf či jeho fragmenty vážou na epiteliální buňky a ovlivňují imunitní reakci intestinální mukózy a dále i systémovou imunitu. (8)

V kartáčovém lemu tenkého střeva se nachází receptory pro Lf. Jedná se o receptor pro nízkomolekulární lipoproteiny (LRP). Po navázání na receptor je Lf absorbován endocytózou do buněk střevního epitelu a odtud je transportován portální žilou a lymfatickými cestami do systémové cirkulace. (10,11,13) Receptor pro Lf je vysoce exprimován v tenkém střevě u narozených jedinců, kde slouží jako alternativní cesta pro transport železa. Zatímco u dospělých jedinců je mnohem méně exprimován a transport železa je zde zprostředkován DMT1. DMT1 je protein, který se nachází na lumenální straně enterocytů a transportuje dvojmocné kovy dovnitř buňky. (12)

2.2. Reaktivní formy kyslíku (ROS)

ROS zahrnují různé sloučeniny a volné radikály odvozené od molekuly kyslíku. Volné radikály jsou vysoce reaktivní molekuly díky přítomnosti nepárového valenčního elektronu. (18)

Za fyziologického stavu se kyslík (O_2) v mitochondriích redukuje na vodu (H_2O) tím, že přijímá 4 elektrony v dýchacím řetězci. Tato redukce není 100 % účinná a malá část molekul O_2 (1-4%) je nekompletně redukována na superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$). (20)



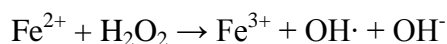
Při nízké tenzi O_2 nebo při poškození mitochondrií se zvyšuje a urychluje tvorba $O_2^{\cdot-}$, což vede primárně k tvorbě ROS během ischemie a reperfuze poškození. (18) Superoxidový radikál vzniká také při reakcích katalyzovaných xantin oxidázou, cytochromem P450 či jinými oxidázami. (20)

K tvorbě $O_2^{\cdot-}$ dochází i v jiných buněčných složkách např. v lysozomech, peroxisomech či plazmatické membráně. Fagocytující bílé krvinky (neutrofily, monocyty, makrofágy a eosinofily) záměrně produkují $O_2^{\cdot-}$, který se podílí na jejich mikrobicidním účinku. (20)

Většina $O_2^{\cdot-}$ je účinkem superoxid dismutázy rychle inaktivována za vzniku H_2O_2 :



Působením katalázy a glutathion peroxidázy je H_2O_2 redukován na H_2O a O_2 , pokud ale není rozložen, může reagovat s přechodnými kovy (zejména s Fe^{2+}) za vzniku hydroxylového radikálu při tzv. Fentonově reakci (18):



Kromě toho může peroxid vodíku a další ROS uvolňovat ionty železa z proteinů, kde je železo vázáno přes síru a tím se zvyšuje tvorba OH^\cdot . (23)

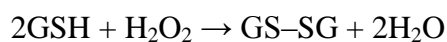
ROS jsou schopné zničit prakticky jakoukoliv biologickou sloučeninu (proteiny, DNA, lipidy). Peroxidace membránových lipidů narušuje uspořádání lipidové dvojvrstvy. Vznikají peroxideriváty nenasycených mastných kyselin, které se snadno štěpí, přičemž se uvolňuje malondialdehyd (MDA). (22) Oxidací DNA dochází k chemickým modifikacím purinových a pyrimidinových bází, k mutacím či zlomům v řetězci DNA. Oxidace aminokyselin v proteinech vede k nevratným fyziologickým změnám jako je fragmentace, agregace (denaturace) a zvýšená citlivost k proteolytickému štěpení. (21)

Na druhé straně mají ROS v organismu i fyziologické účinky. Aktivací receptorů pro cytokiny a receptorů spřažených s G proteinem na povrchu buněk, dochází k zvýšené produkci ROS. Tak se ROS podílejí na spouštění proliferace a hypertrofie buněk nebo jsou zahrnovány do kontroly kaskády apoptózy. (18)

Ochrana organismu před ROS

Organismus vlastní různé mechanismy, kterými může zabránit tvorbě kyslíkových radikálů, např. zmíněným působením superoxid dismutázy, katalázy, glutathion peroxidázy (tzv. enzymatická cesta) nebo působením glutathionu a vitamínů C, A a E (tzv. neenzymatická cesta). (18)

Glutathion peroxidáza (GPx) je enzym, který slouží k redukci peroxidů např. peroxidu vodíku:



Kofaktorem enzymu je glutathion (GSH). Jedná se o tripeptid složený z aminokyselin L-cysteinu, L-glycinu a L-glutamové kyseliny. GPx se vyskytuje v erythrocytech a ve většině tkání u savců. V erythrocytech chrání hemoglobin před oxidací peroxidem vodíku na methemoglobin. Erythrocyty produkují peroxid vodíku různými mechanismy např. reakci mezi kyselinou askorbovou a oxyhemoglobinem. (15, 31)

2.3. ŽELEZO

Železo je nepostradatelným prvkem pro základní buněčné funkce, jako je syntéza DNA, RNA a proteinů. Účastní se transportu kyslíku a elektronů a uplatňuje se v procesu buněčného dýchání. (33)

V těle zdravého dospělého člověka je obsaženo 3,5-4 g železa. 65-70 % železa je obsaženo v hemoglobinu erytrocytů a 4 % jsou v myoglobinu. Asi 1 % je vázáno v enzimech (cytochromy, cytochrom oxidáza, peroxidáza, kataláza aj.). Zásobní železo tvoří 15 – 30% a na transportní železo připadá 0,1 %. (32)

Železo přijaté z potravy se nachází ve dvou formách – hemové (Fe^{2+}) a nehemové (Fe^{3+}). Nehemové železo přijaté z rostlinné stravy tvoří až 95% denního příjmu železa, zbytek připadá na hemové železo obsažené v mase. (33)

Ionty Fe^{3+} jsou nejprve redukovány v kyselém prostředí žaludku na Fe^{2+} . Redukci usnadňuje přítomnost kyseliny askorbové či aminokyselin cysteinu a histidinu. Naopak fytyáty, vápenaté ionty či polyfenolycké sloučeniny inhibují vstřebání Fe^{2+} . K redukcii Fe^{3+} na Fe^{2+} dochází i v duodenu působením enzymu cytochromu b. (33)

Železo se vstřebává ve formě Fe^{2+} v duodenu pomocí DMT1, což je protein, který transportuje dvojmocné kovy do enterocytů. V buňce může být železo po oxidaci na Fe^{3+} navázáno na apo-ferritin za vzniku feritinu (FR). Jedná se o protein sloužící k uskladnění železa v buňkách. Jedna molekula je schopna uchovat až 4500 Fe^{3+} iontů. (23) K uvolnění Fe^{3+} z feritinu může dojít při poklesu pH na hodnotu 6 např. při hypoxii tkání, činností fagocytů nebo v redukujícím prostředí. Pokud není železo navázané na FR, vytváří v buňce tzv. labilní intracelulární pool železa (LIP). (32) LIP tvoří nízkomolekulární sloučeniny (např. citrát, fosfát, karboxylát, polypeptidy, nukleotidy aj.), které mají nízkou afinitu k iontům železa (Fe^{2+} i Fe^{3+}). V homeostáze LIP hraje významnou roli FR. V prostředí bohatém na ionty železa je schopen FR vyvázat tyto ionty a tím chránit organismus před toxickým působením železa. Na druhé straně při nízké koncentraci iontů je FR zdrojem železa pro organismus. (23)

Další sloučeninou, která v buňce může uskládat železo, je hemosiderin. Jedná se o degradační formu feritinu, která se nachází v siderozomech (lysozomy obsahující železo). (32)

Z buňky je Fe^{2+} uvolňováno pomocí proteinu ferroportinu 1, který se nachází na bazolaterální straně enterocytů. Ferroportin 1 se nachází i na jiných buňkách v organismu např. v játrech, ledvinách a slezině. Po uvolnění je Fe^{2+} oxidováno na Fe^{3+} pomocí specifických proteinů a navázáno na protein apo-transferin za vzniku transferinu (TF), což je transportní forma železa. Železo vázané na TF je vycytováno pomocí receptoru pro transferin (TFR). Komplex TF- 2Fe^{3+} je po navázání na TFR vtažen endocytózou do buňky, kde je železo uvolněno a TFR opět dopraven na povrch buňky. (23)

Železo je z organismu eliminováno odlupováním enterocytů, případně při menstruačním krvácení. Průměrné ztráty železa bývají 1-2 mg za den.

Železo obsažené v červených krvinkách je v organismu znovu využito. Červené krvinky jsou na konci svého života pohlceny speciálními makrofágy, z hemoglobinu je uvolněno železo a vazbou na TF je vráceno zpět do oběhu a opět využito při syntéze hemoglobinu. (32)

Volné ionty železa se podílejí na tvorbě vysoce reaktivních kyslíkových radikálů, které poškozují molekuly (lipidy, proteiny, DNA) a tím se účastní na rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. (23)

Deferoxamin

Deferoxamin je sloučenina, která vytváří stabilní komplex s Fe^{3+} i Fe^{2+} a snižuje tak tvorbu volných kyslíkových radikálů. Byly provedeny mnohé studie na zvířatech, kdy po podání deferoxaminu došlo ke zlepšení kontraktálních funkcí a snížení dysrytmií během ischemicko-reperfúzního poškození. (18)

Deferoxamin je používán v klinické praxi pod názvem DESFERAL k léčbě chronického přetížení organismu železem a při akutní otravě železem. Je podáván u některých typů anémií, kde je pacientům často podávána transfúze železa což vede k nadbytku železa. (3)

Velmi často se vyskytuje bolestivost v místě injekce, prosáknutí, zduření, zarudnutí, pálení, svědění a vyrážka; vzácně se vyskytují puchýřky, místní otoky a zánět. Místní reakce jsou často doprovázeny i celkovou reakcí jako jsou bolesti kloubů, svalů, bolesti hlavy, kopřivkou, nevolností, teplotou, méně často zvracením, bolestí břicha nebo astmatickým záchvatem. (3)

Byla provedena studie, kde byl demonstrován protektivní účinek deferoxaminu na snížení volných kyslíkových radikálů. Pacientům byl podán i.v. infuzí po dobu 8 hodin roztok deferoxaminu v dávce 4g na 250 ml 5% roztoku dextrosy před transplantací koronárního arteriálního bypassu. U pacientů se sledoval účinek deferoxaminu na lipidovou peroxidaci a na jednotlivé funkce srdce před, v průběhu a po operaci. Před a v průběhu operace nebyly významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou s deferoxaminem. Po operaci došlo k významnému nárůstu volných kyslíkových radikálů v kontrolní skupině, ale ve skupině s deferoxaminem došlo ke zlepšení funkce levé komory, což souvisí s nižším poškozením tkáně myokardu v důsledku snížení volných radikálů. (19)

2.4. MYOKARD

2.4.1. Struktura a fyziologie

Myokard je dutý svalový orgán, který se skládá z cylindrických buněk uspořádaných ve sloupcích. Uprostřed buňky je uloženo vždy jedno jádro a vnitřek buňky vyplňují kontraktilní fibrilární bílkoviny – aktin a myozin. 30-50 % objemu buňky tvoří mitochondrie. Buňky jsou spojeny tzv. interkalárními disky, a proto srdce pracuje jako funkční syncytium. (24)

Základní kontraktilní jednotkou myofibril je sarkomera. Obsahuje paralelně uspořádaná silná vlákna myozinová a slabá aktinová, která se při kontrakci do sebe zasouvají. Aktinová vlákna obsahují dva regulační proteiny: troponin a tropomyozin. Vlákničitá molekula tropomyozinu je uložena mezi vlákny aktinu. Na každou molekulu tropomyozinu je navázaná molekula troponinu (Tn), která se skládá ze tří podjednotek: C, T a I. Na TnC se váží vápenaté ionty. TnT spojuje Tn s tropomyozinem. TnI zabraňuje tvorbě můstků mezi aktinem a myozinem v nepřítomnosti vápenatých iontů. TnI a TnT existují ve třech isoformách a pouze jedna z nich je typická pro výskyt v srdečních buňkách. Srdeční troponin I (cTnI) a T (cTnT) se tedy používají jako citlivé a specifické markery pro hodnocení poškození buněk myokardu. (24, 35)

Srdeční buňky získávají energii oxidací mastných kyselin (MK), glukózy a jejich metabolitů (např. laktátu či ketolátek). Glukóza a MK se metabolizují až na acetyl-CoA. Acetyl-CoA vstupuje do Krebsova cyklu, kde je oxidován a vznikají redukované formy jako NADH a FADH, které vstupují do dýchacího řetězce. Zde probíhá oxidační fosforylace, což vede k uvolnění energie, která je skladována ve formě ATP.

Za klidových podmínek se MK podílejí na tvorbě energie ze 75 %, glukóza z 20 % a laktát z 5%.

2.4.2. Ischemická choroba srdeční (ICHS)

Ischémií se rozumí nedostatečný přívod kyslíku do tkáně a nedostatečné odplavování metabolitů v důsledku omezeného prokrvení. (24)

ICHS je ve většině případů způsobena aterosklerózou věnčitých tepen. Existují faktory, které mohou zvýšit pravděpodobnost vzniku ICHS. Mezi tyto rizikové faktory patří např. kouření, hyperlipidémie, hypertenze, diabetes melitus a dále věk, mužské pohlaví a genetická zátěž či hyperhomocysteinémie a zvýšení některých trombogenních faktorů. (25)

ICHS má široké spektrum klinických projevů. Jednotlivé klinické formy se mohou vzájemně různě kombinovat. Dělí se na akutní a chronické. Mezi akutní formy řadíme nestabilní anginu pectoris, akutní infarkt myokardu a náhlou smrt srdeční. Mezi chronické formy patří asymptomatická ICHS, angina pectoris, stav po infarktu myokardu, dysrytmická forma ICHS. (25)

Za normálních podmínek získává myokard energii z oxidační fosforylace a jsou využívány především MK. Při nedostatku kyslíku je Krebsův cyklus v mitochondriích zastaven a dochází pouze k odbourávání glukózy na laktát, snížení pH a malému zisku ATP, což nestačí k zajištění životnosti buněk. (24) Již za 8-10s po uzavěru průtoku je myokard cyanotický. (22)

V průběhu 30-60s ustávají kontrakce. (24) Díky nedostatku ATP se v buňce hromadí Na^+ (snížená aktivita $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPasy}$) a vzniká edém kardyomyocytů. Dále se hromadí Ca^{2+} v důsledku snížené aktivity $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPasy}$, odsunu iontů do sarkoplazmatického retikula (SR) a mitochondrií. Navíc dochází k uvolnění Ca^{2+} z mitochondrií a SR. Tyto změny jsou přesto zcela reverzibilní. Zajistí-li se dostatečný přísun kyslíku do postižené tkáně, obnoví se v ní fyziologický metabolismus. (22)

Neobnoví-li se průtok do 20 minut, dochází v některých buňkách k ireverzibilnímu poškození. Objevuje se agregace jadrového chromatinu, ztráta žíhání a dochází k zvětšení mitochondrií s obsahem granul. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} aktivuje

fosfolipásu A₂, která štěpí fosfolipidy membrán a nastává jejich fragmentace. V průběhu ischemie se zvyšuje tvorba kyslíkových radikálů, které se podílejí na poškození tkáně. (22)

2.4.3. Ischemicko-reperfúzní poškození

Reperfúzní poškození je stav, při kterém dochází k poškození tkáně při opětovném zásobování tkáně krví, která byla po určitou dobu ischemická. Nedostatek kyslíku a živin z krve vytváří podmínky, při kterých obnova cirkulace vyústí v zánět a oxidativní poškození díky indukci oxidativního stresu. (27)

Po obnově krevního zásobení (reperfúzi) dochází k dezorganizaci myofibril, intracelulárnímu otoku, ztrátě glykogenu a zvýšení koncentrace kalcia uvnitř mitochondrií. Vápník v mitochondriích brání tvorbě energie a v buňce aktivuje děje, které vedou k poškození membrány a nekróze buňky. (24)

Přestože je obnova průtoku krve velmi důležitá, dochází při něm paradoxně k poškození buněk a tkání v důsledku zvýšené tvorby volných radikálů. (23) Rozsah poškození závisí na délce trvání ischemie před reperfúzí. (24)

Volné kyslíkové radikály jsou produkovány během prvních minut reperfúze. Stimulují uvolnění destičkového aktivačního faktoru z endotelu, který aktivuje další neutrofilů. Z aktivovaných neutrofilů se uvolňují kyslíkové radikály a proteasy a tím se zhoršuje poškození tkáně. Vzrůstá produkce vazokonstrikčně působících látek jako je endotelin-1, které omezují proudění krve. (27)

Zvýšená tvorba H₂O₂ během reperfúze je způsobena zvýšenou aktivitou xantin oxidázy a dále sníženou aktivitou katalázy a glutathion oxidázy. Další zdrojem H₂O₂ jsou mitochondrie. Při reperfúzi dochází k poškození těchto organel, které produkují více H₂O₂ než mitochondrie za fyziologického stavu. H₂O₂ způsobuje zvýšené uvolnění iontů železa a tím se zvyšuje produkce OH·. Časná reperfúze může způsobit až 600% nárůst H₂O₂ v myokardu. (23)

2.4.4. Biochemická diagnostika

Již při silném poškození plazmatické membrány buněk myokardu dochází k vyplavení enzymů a určitých látek do krve, které se používají k hodnocení míry poškození myokardu. (25)

V současnosti nejrozšířenějším a nejspecifičtějším biochemickým markerem akutního infarktu myokardu (AIM) jsou specifické izoformy **troponinu T a I**, které se vyskytují pouze v myokardu. Plazmatické hladiny stoupají za 4-6 hodin od začátku infarktu a vrcholí za 24 hodin. Zvýšené hladiny však přetrvávají 10 až 14 dní, což umožňuje i pozdní diagnózu prodělaného infarktu. (25)

Dalším biochemickým markerem AIM je stanovení hladiny **kreatinkinázy (CK)** a především jejího izoenzymu, který je specifický pro myokard CK-MB. Celková CK stoupá v plazmě také při nekróze kosterního svalu nebo mozkové tkáně. Plazmatická aktivita celkové CK i CK-MB začíná stoupat za 4-6 hodin od začátku obtíží, vrcholí za 24 hodin a do 2-3 dnů se normalizuje. (25) K odlišení zvýšené koncentrace CK při poškození kosterního svalstva se používá určení aktivity **aspartát-aminotransferázy (AST)** či CK-MB. (24)

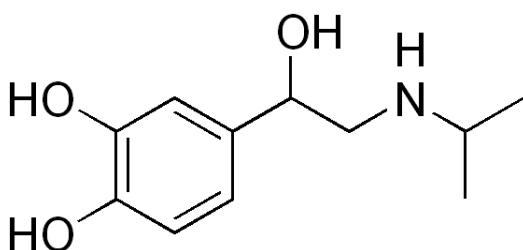
AST je enzym přítomen v mitochondriích i cytoplazmě buněk jater, myokardu a kosterního svalstva. Hladina v séru stoupá za 4-10 hodin, maximální hodnoty je dosaženo za 24-36 hodin a do 4. dne hladina klesá k výchozí hodnotě. (24)

Laktátdehydrogenáza (LD) je enzym vyskytující se prakticky ve všech tkáních, a proto je stanovení plazmatické aktivity málo spolehlivé. Pro myokard je specifický izoenzym LD1, ale stanovení se většinou rutinně neprovádí. Hladina LD se zvyšuje přibližně za 24 hodin od začátku obtíží, vrcholí kolem 3. dne a přetrvává minimálně 7 dní. (25)

Myoglobin je nízkomolekulární protein, který se uvolňuje z poškozených kardiomyocytů velmi časně. Jeho hladina v krvi stoupá již po 2-4 hodinách. Je rychle vylučován do moči a jeho hladina se nejdéle do 24 hodin normalizuje. Myoglobin je velmi citlivý marker a jeho význam je zejména v časně diagnostice AIM. (24)

2.5. ISOPRENALIN (ISO)

Obr.č.1: Struktura isoprenalinu



ISO je syntetická látka s neselektivním působením na β -receptory (β_1 a β_2) a s nevýznamným účinkem na α -receptory sympatického nervového systému. (28)

Stimulací β_1 -receptorů v myokardu dochází k zvýšení srdeční frekvence (pozitivně chronotropní účinek), zesílení srdeční kontrakce (pozitivně inotropní účinek), urychluje se vedení vzruchu (pozitivně dromotropní účinek) a zvyšuje se srdeční dráždivost (pozitivně batmotropní účinek). Zvyšuje se tím i spotřeba kyslíku myokardem a velké dávky i dlouhodobé podávání ISO mohou vést k poškození cév a nekróze myokardu. Již 2 minuty po i.p. podání ISO se objevuje zvýšená kontrakce a otok mitochondrií. Postupně dochází ke snižování zásob ATP, vychytávání kalcia do mitochondrií což vede k rozpojení oxidativní fosforylace. Zvýšená koncentrace kalcia se dále podílí na rozvoji nekrózy. (28, 29)

Stimulací β_2 -receptorů dochází k vazodilataci v kosterních svalech a tím k snížení periferního odporu a k poklesu diastolického tlaku. (28)

ISO je pomaleji rozkládán monoaminoxidásou (MAO) a působí proto déle než přirozené neurotransmitery sympatického nervového systému. (28)

V současné době je klinický význam ISO malý a používá se spíše v experimentální farmakologii k vyvolání ischemie u zvířat. V minulosti se podával jako dočasný kardiostimulans před zavedením kardiostimulátoru a jako bronchodilatans v léčbě astmatu. (28)

3. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo objasnění vlivu intravenózně podaného laktoferinu na katecholaminový model akutního infarktu myokardu u potkanů. Tento účinek byl zkoumán zejména pomocí vybraných biochemických parametrů.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. METODICKÁ ČÁST

4.1.1. Zvířata

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

4.1.2. Chemikálie

Urethan (Sigma-Aldrich, USA)

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

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

Isoprenalin (Sigma-Aldrich, USA)

Laktoferin – hovězí (DMV Internacional, USA)

4.1.3. Provedení experimentu

Experimentální zvířata byla náhodně rozdělena do 4 skupin:

- Kontrolní skupina (**kontrola**) – zahrnovala 7 zvířat, byl podán fyziologický roztok 2 ml/kg s.c
- Skupina s isoprenalinem (**ISO**) – zahrnovala 13 zvířat, byl podán vodný roztok isoprenalinu 100 mg/kg s.c.
- Skupina s laktoferinem (**LA**) – zahrnovala 7 zvířat, byl podán vodný roztok laktoferinu 50 mg/kg i.v.

- Skupina s laktoferinem a isoprenalinem (**LA+ISO**) – zahrnovala 11 zvířat, byl podán vodný roztok laktoferinu 50 mg/kg i.v. a za 5 min byl podán vodný roztok isoprenalinu 100 mg/kg s.c.

Fyziologický roztok i Lf byl aplikován do postranní ocasní žíly pomocí kanylky a Valusetu. Pro usnadnění aplikace byly žíly dilatovány nahříváním ocasu v horké vodě. Látky byly aplikovány 24 hodin před měřením. Měření bylo prováděno v celkové anestezii navozené i.p. podáním 20% vodného roztoku urethanu (1.2 g/kg). Krev k biochemické analýze byla odebrána do heparinizované zkumavky. Zvířata byla po provedení experimentu usmrcena i.v. podáním vodného roztoku KCl (1mM). Ze zvířat byla odebrána srdce, která byla zmrazena na -20 °C a následně použita pro stanovení koncentrace vápníku.

4.1.4. Biochemické parametry

Ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové byly ze vzorků odebrané krve získány hodnoty srdečního troponinu T v séru, celkového glutathionu v krvi a glutathion peroxidázy v erytrocytech.

Srdeční troponin T (cTnT) byl stanoven v séru pomocí elektrochemiluminiscenční metody (Elecsys 2010, Roche Diagnostics) s použitím specifických monoklonálních protilátek proti cTnT.

Celkový glutathion (GSH) byl pomocí kapilární elektroforézy separován z plazmy a následně stanoven UV detekcí (System P/ACE 5100, Beckman) při vlnové délce 200 nm.

Glutathion peroxidáza (GPx) byla stanovena nepřímo v erytrocytech pomocí komerčního kytu (Ransel, Randox, UK) spektrofotometricky snížením absorbance při vlnové délce 340 nm (Cobas Mira, Roche, Switzerland).

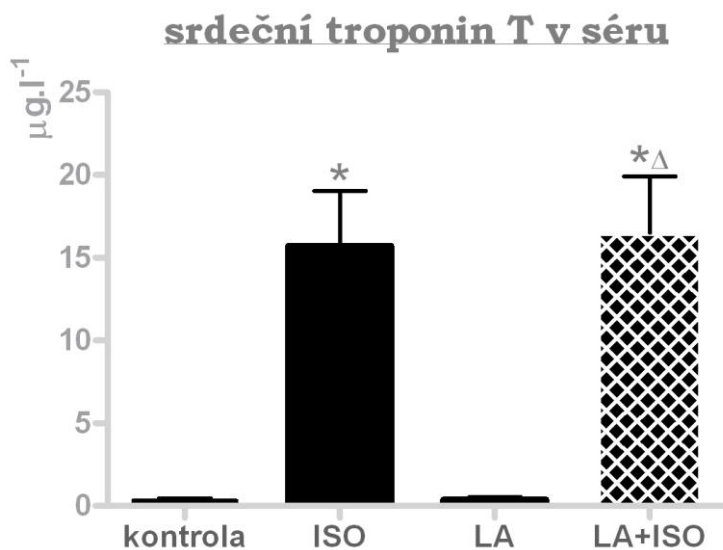
4.1.5. Vápník v srdci

Ze vzorku tkáně myokardu byly získány hodnoty koncentrace vápníku v srdci. Zmražené vzorky tkáně myokardu byly vysušeny, zváženy a za použití kyseliny dusičné a peroxidu vodíku byly připraveny ke stanovení hladiny vápníku. Koncentrace vápníku byla stanovena fotometricky pomocí plamenového fotometru (Eppendorf, Efox 5053, Germany). Výsledky byly vyjádřeny v $\mu\text{mol/g}$.

4.1.6. Statistická analýza

Statistické rozdíly mezi skupinami byly testovány pomocí T-testu za využití softwaru GraphPad Prism verze 4.00 pro Windows, GraphPad Software, (San Diego California USA). Za hladinu statistické významnosti byla považována $P \leq 0,05$.

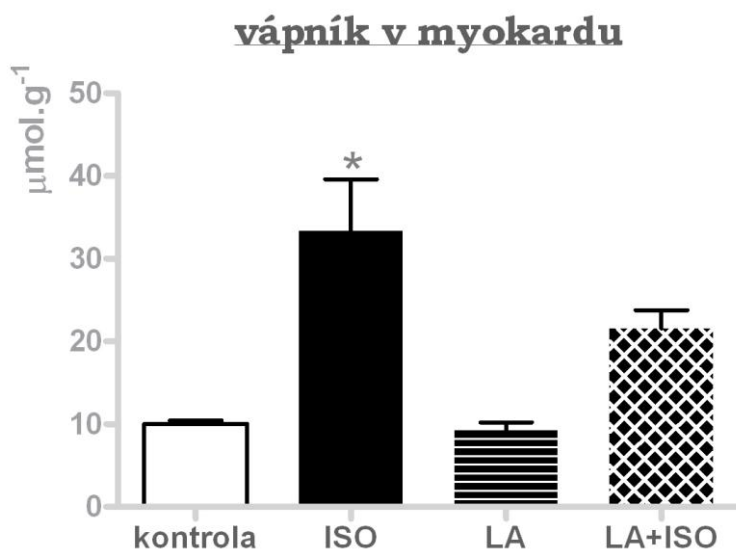
5. VÝSLEDKY



Obr.č.2. Srdeční troponin T v séru.

* $P < 0,01$ vs. kontrola + $P < 0,01$ vs. LA

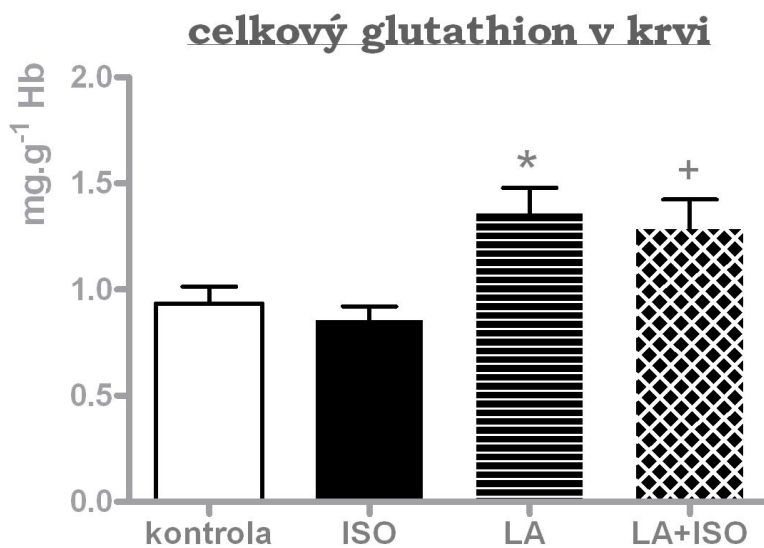
Je zřejmé, že u kontrolní skupiny a skupiny, kde byl podán laktoferin jsou hodnoty cTnT téměř nulové. Při podání isoprenalinu došlo k výraznému zvýšení hladiny cTnT v plazmě v porovnání s kontrolní skupinou. Ve skupině, kde byl podán laktoferin a isoprenalin došlo taktéž k masivnímu k vyplavení cTnT. Hladina cTnT dosahovala podobných hodnot jako ve skupině s podaným isoprenalinem.



Obr.č.3. Vápník v myokardu.

* P < 0,01 vs. kontrola

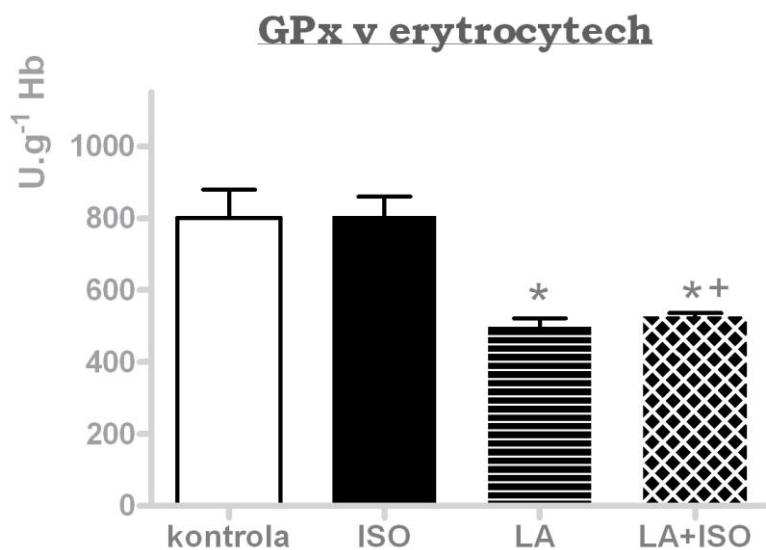
U kontrolní skupiny a skupiny, kde byl podán laktoferin nebyly nalezeny významné rozdíly v koncentraci vápníku v myokardu. Po podání isoprenalinu došlo k výraznému nárůstu koncentrace vápníku v srdci. Podání laktoferinu před isoprenalinem dokázalo alespoň částečně snížit vzestup vápníku způsobený isoprenalinem.



Obr.č.4. Celkový glutathion v krvi

* $P < 0,05$ vs. kontrola + $P < 0.05$ vs. ISO

Laktoferin statisticky významně zvýšil hladinu celkového glutathionu v krvi ve srovnání s kontrolní skupinou. Ve skupině, kde byl podán laktoferin s isoprenalinem, došlo k statisticky významnému zvýšení hladiny celkového glutathionu proti skupině, kde byl podán samotný isoprenalin.



Obr.č.5. Glutathion peroxidázy v erytrocytech

* $P < 0,05$ vs. kontrola + $P < 0.05$ vs. ISO

Laktoferin statisticky významně snížil hladinu glutathion peroxidázy v erytrocytech u zdravých zvířat proti kontrolní skupině. Isoprenalin neměl žádný vliv na tento parametr. Ve skupině, kde byl podán laktoferin s isoprenalinem, došlo k statisticky významnému snížení hladiny glutathion peroxidázy v erytrocytech, jak vzhledem ke kontrolní skupině tak i k isoprenalinové skupině.

6. DISKUZE

Laktoferin (Lf) je glykoprotein, který se vyskytuje přirozeně v tkáních a sekretech lidského organismu. V organismu vykazuje široké spektrum účinků. Některé jsou závislé na schopnosti vázat železo, jiné jsou na železe nezávislé. Přesto je jeho role v organismu zatím neznámá a je předmětem neustálého zkoumání. V současné době je Lf studován jako potenciální léčivá látka, která by se mohla uplatnit v léčbě zánětu, rakoviny a jiných onemocnění

Je schopen chelatovat trojmocné železo a jeho afinita k železu je 260krát vyšší než u transferinu. Železo katalyzuje reakce, při kterých vznikají volné kyslíkové radikály. Lf díky schopnosti chelatovat železo snižuje tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů a tím omezuje poškození tkání. (1,2)

V současné době probíhá studium přírodních i syntetických látek, které mohou snížit tvorbu ROS a tak zmírnit ischemicko- reperfuční poškození myokardu. V klinické praxi se používají látky, které jsou schopné vychytávat železo a jiné přechodné kovy (např. deferoxamin)

V naší studii byl sledován protektivní účinek i.v. podaného Lf na ischemický myokard. Ischemie byla vyvolána s.c. podáním isoprenalinu v dávce 100 mg/kg. Je známo, že podání ISO ve vysokých dávkách vyvolává tachykardii, zvyšuje se spotřeba kyslíku myokardem, což vede postupně k ischemii a následnému poškození srdeční tkáně. Rozvíjí se stav podobný infarktu myokardu u člověka. Velmi citlivým ukazatelem poškození buněk myokardu je stanovení koncentrace cTnT v plazmě. Fyziologické hodnoty cTnT jsou v krvi velmi nízké, pohybují se v rozmezí 0-0,18 µg/l. (34) U kontrolní skupiny a skupiny, kde byl podán Lf jsou hodnoty cTnT téměř nulové. Nedošlo k žádnému poškození myokardu. Naopak po podání isoprenalinu došlo k poškození celého myokardu, které zapříčinilo masivní zvýšení hladiny cTnT. Hodnoty se blížily 16 µg/l.

Podobných hodnot dosahovala hladina cTnT i ve skupině, kde byl podán laktoferin s isoprenalinem. Z těchto výsledků vyplývá, že podání Lf nesnížilo poškození myokardu navozené podáním isoprenalinu a nedošlo k ochraně myokardu před ischemickým působením isoprenalinu.

U kontrolní skupiny a skupiny, kde byl podán laktoferin nejsou statistické rozdíly v koncentraci vápníku v myokardu, ale při podání isoprenalinu došlo k výraznému nárůstu koncentrace vápníku v srdci. Bloom a kol. uvádí zvýšení koncentrace vápníku v srdci již několik minut po i.p. podání isoprenalinu. Toto zvýšení je pravděpodobně způsobeno více mechanismy (ischemie, β -adrenergní stimulace). Vápník je vychytáván z plazmy do kardiomyocytů a následně do mitochondrií, kde aktivuje aktinomyosinovou ATPasu, tím se sníží hladina ATP a dojde k rozpojení oxidativní fosforylace. V mitochondriích navíc vápník tvoří deposita, která přispívají spolu s rozpojením oxidativní fosforylace k poškození těchto organel a následně i kardiomyocytů. (29)

Ve skupině, kde byl podán laktoferin s isoprenalin, snížil laktoferin hladinu vápníku v srdci navozenou podáním isoprenalinu. Tento efekt byl pravděpodobně způsoben inhibicí tvorby reaktivních kyslíkových sloučenin díky chelataci volného železa laktoferinem.

Podání isoprenalinu jen nevýznamně snižuje hladinu celkového glutathionu v krvi. Naopak laktoferin statisticky významně zvýšil hladinu celkového glutathionu v krvi proti kontrolní skupině a tento nárůst zůstal zachován i po podání isoprenalinu. Vysvětlení ani význam tohoto účinku není znám.

Laktoferin statisticky významně snížil hladinu glutathion peroxidázy v erytrocytech u zdravých zvířat proti kontrolní skupině. Tento nálezn bude spíše artefaktem, jelikož je známo, že erytrocytální enzymy jsou málo náchylné k akutním změnám, což ukazuje i nezměněná koncentrace tohoto enzymu po podání isoprenalinu. Je spíše možné, že laktoferin, který je schopen vazby na povrchové molekuly a interakce s krevními elementy (26,30), ovlivnil měření. Tato domněnka bude muset být ověřena dalšími experimenty.

7. ZÁVĚR

Premedikace i.v. podaného laktoferinu v dávce 50 mg/kg nezmírnila poškození myokardu po s.c. podání isoprenalinu v dávce 100 mg/kg. Byl pouze pozorován pozitivní účinek laktoferinu na snížení hladiny vápníku v srdci. Laktoferin statisticky významně zvýšil hladinu celkového glutathionu v krvi a statisticky významně snížil hladinu glutathion peroxidázy v erytrocytech, ale neovlivnil hladinu cTnT v séru. Laktoferin jako chelátor železa nedokázal ovlivnit patofyziologii AIM, ve které se významně uplatňuje železem katalyzovaná produkce ROS.

8. ABSTRAKT

Laktoferin (Lf) je glykoprotein vázající železo o molekulové hmotnosti 80-kD. Vyskytuje se přirozeně v sekretech exokrinních žláz (v slzách, slinách, mléce, sinoviální a seminální tekutině) a v sekundárních granulech neutrofilů. Je známo, že Lf vykazuje v organismu antibakteriální, protizánětlivé a antitumorové účinky. Jeho funkce v organismu je pravděpodobně komplexní a je předmětem vědeckého zkoumání. Díky schopnosti chelátovat železo, snižuje Lf tvorbu hydroxylových radikálů při tzv. Fentonově reakci. Afinita Lf k železu je asi 260krát větší než u transferinu.

V experimentu byl použit isoprenalin (ISO) jako modelová sloučenina k vyvolání stavu podobnému akutnímu infarktu myokardu u člověka. Podání nekrotických dávek ISO způsobuje ischemii následovanou poškozením myokardu. Reperfúze ischemického myokardu představuje jedinou možnost, jak zachovat srdeční tkáň při akutním infarktu myokardu, ale tento proces je spojen s poškozením tkáně v důsledku zvýšené tvorby hydroxylových radikálů v tzv. Fentonově reakci, která je katalyzována volnými ionty železa.

Potkani kmene Wistar byli náhodně rozděleni do čtyř skupin podle přijaté medikace: kontrola (fyziologický roztok), isoprenalin (ISO, 100mg/kg s.c.), hovězí laktoferin (La, 50 mg/kg i.v.) a kombinace La+ISO v již zmíněných dávkách (La byl podán 5 min před podáním ISO). Po 24 hod byly odebrány vzorky krve a myokardu pro analýzu vybraných parametrů.

Při s.c. podání isoprenalinu zdravému zvířeti došlo k výraznému poškození tkáně myokardu, což se projevilo zvýšením sérové hladiny cTnT a zvýšením hladiny vápníku v srdci. Naopak celkový glutathion a GPx nebyly významně ovlivněny. Samotný laktoferrin statisticky významně zvýšil hladinu celkového glutathionu a statisticky významně snížil hladinu glutathion peroxidázy v erytrocytech, ale nevedl k uvolnění cTnT v séru a nezvýšil hladinu vápníku v srdci.

Premedikace laktoferinem před podáním isoprenalinu snížila hladinu vápníku v srdci proti skupině, kde byl podán samotný isoprenalin. Hladina cTnT dosahovala podobných hodnot jako ve skupině s isoprenalinem.

Kromě snížení hladiny vápníku v srdci neměla premedikace laktoferinem žádný pozitivní vliv na poškození myokardu po s.c. podání vysokých dávek isoprenalinu. Tento pozitivní vliv laktoferinu je založen na schopnosti inhibovat volné kyslíkové radikály díky chelataci volného železa.

Tato práce vznikla za podpory grantu GAUK 94/2006/C/Faf

9. SUMMARY

Lactoferrin (Lf) is an 80-kDa iron-binding glykoprotein. Lf is present physiologically in exocrine secretions, eg. tears, saliva, milk, sinovial fluid, seminal fluid and in the secondary granules of neutophils. The precise function of Lf in organism is considered to be very complex and it is still a hot subject of scientific disputation. Lf was documented to act as antimicrobial, antiinflammatory and antitumoral agent. Another of its properties is ability to inhibit hydroxyl radical formation via Fenton reaction. Afinity of Lf to iron is about 260times higher than that of transferrin.

Isoproterenol (ISO) has been used as a model compound to induce infarct-like lesions in the rat and various other animal species. Administration of necrotic dose of ISO caused ischaemia followed by damage of the myocardium. Ischaemia alters iron homeostasis and redox-active free iron, which catalyses ROS-generation. The only possibility for myocardial tissue recovery in acute moycardial infarction represents the reperfusion of ischemic myocardium. But the whole process is associated with damage of myocardium due to burst of hydroxyl radical catalyzed by free iron (Fenton reaction).

In our experiment we studied the effects of Lf in a catecholamine model of myocardial injury. We had four experimental groups divided according to the received medication: control (saline), isoprenaline (ISO, 100 mg/kg s.c.), bovine lactoferrin (La, 50 mg/kg i.v.) and the combination of La+ISO in the above-mentioned doses (La was administered 5 min before ISO). After 24 h a sample of blood was withdrawn and the heart was removed for analysis of various parameters.

Control and lactoferrin treated animals had negligible levels of serum cTnT and there was no statistical difference between myocardial calcium levels in these groups. Isoprenaline brought about a marked cTnT release and myocardial calcium overload. Lactoferrin premedication did not affect the release of cTnT, however, it decreased calcium overload caused by ISO. Lactoferrin significantly elevated levels of total glutathione while significantly decreasing glutathion peroxidase in erythrocytes.

Our experiment did not show the prophylactic administration of bovine laktoferin on myocardial injury caused by s.c. administration of necrogenic dose of ISO. The partial protective effect of lactoferrin is based on inhibition of ROS formation due to chelation of free iron. Our experiment was under the grant GA UK 94/2006/C/Faf.

10. LITERATURA

1. BAKER H.M, BAKER E.N.: Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *BioMetals* 2004; 17: 209-216
2. KANYSHKOVA T.G., BABINA S.E., SEMENOV D.V., ISAEVA N., VLASSOV A. V., NEUSTROF K.N., BUNEVA V.N., NEVINSKY G.: Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin. *Eur. J.Biochem.* 2003; 270: 3353-3361
3. AISLP 2009: SPC přípravku Desferal[®], RNDr. Bohuslav Škop, CSc
4. VOGEL J.H., SCHIBLI J.D., JING W., LOHMEIER-VOGEL E.M., EPAND R.F., EPAND R.M.: Towards a structure- function analysis of bovine lactoferricin and related tryptophan- and arginine- containing peptides. *Biochem. Cell Biol.* 2002; 80: 49-63
5. NAGASAKO Y., SAITO H., TAMURA Y., SHIMAMURA S., TOMITA M.: Iron binding properties of bovin lactoferrin in iron rich solution. *J Dairy Sci* 1993; 76: 1876-1881
6. STEIJNS J.M.,VAN HOOIJDONK A.C.M.: Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition* 2000; 84 Suppl 1: 11-17
7. MASON D.Y., TAILOR C.R.: Distribution of transferrin, ferritin and lactoferrin in human tissues. *Journal of Clinical Pathology* 1978; 31: 316-327
8. TERAGUCHI S., WAKABAYASHI H., KUWATA H., YAMAUCHI K., TAMURA Y.: Protection against infections by oral lactoferrin: Evaluation in animal models. *BioMetals* 2004; 17: 231-234
9. BROCK J.H. : The physiology of lactoferrin. *Biochem. Cell Biol.* 2002; 80:1-6

10. LEGRAND D., ELASS E., CARPENTIER M., MAZURIER J.: Lactoferrin: A modulator of immune and inflammatory responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005; 62: 2549-2559
11. IYER S., LÖNNERDAL B.: Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *European Journal of Clinical Nutrition* 1993; 47: 232-241
12. LOPEZ V., SUZUKI Y. A., LÖNNERDAL B.: Ontogenic changes in lactoferrin receptor and DMT1 in mouse small intestine: implications for iron absorption during early life. *Biochem. Cell Biol.* 2006; 84: 337-344
13. KITAGAWA H., YOSHIZAWA Y., YOKOYAMA T., TAKEUCHI T., TALUKDER M.J.R., SHIMIZU H., ANDO K., HARADA E.: Absorption of bovine lactoferrin from the intestinal lumen into the systemic circulation via the portal vein and the mesenteric lymphatics in growing pigs. *J.Vet.Met.Sci.* 2003; 65 (5): 567-572
14. ZIERE G.J., VAN DIJK M.C.M., BIJSTERBOSH M.K., VAN BERKEL T.J.C.: Lactoferrin uptake by the rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 11229-11235
15. AWASTHI C.Y., BEUTLER E., SRIVASTAVA K.S.: Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 1975; 250 : 5144-5149
16. MLADĚNKA P., SEMECKÝ V., BOBROVOVÁ Z., NACHTIGAL P., VÁVROVÁ J., HOLEČKOVÁ M., PALICKA V., MAZUROVÁ Y., HRDINA R.: The effects of lactoferrin in a rat model of catecholamine cardiotoxicity. *Biometals* 2008, , in press
17. LEGRAND D., ELASS E., PIERCE A., MAZURIER J.: Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *BioMetals* 2004; 17: 225-229

18. KEVIN L.G., NOVALIJA E., STOWE D.F.: Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection : the relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg* 2005; 101: 1275-87
19. PARASKEVAIDIS I.A., ILIODROMITIS E.K., VLAHAKOS D., TSIAPRAS D.P, NIKOLAIDIS A., MARATHIAS A., MICHALIS A., KREMASTINOS D.TH.: Deferoxamine infusion during coronary artery bypass grafting ameliorates lipid peroxidation and protects the myocardium against reperfusion injury: immediate and long-term significance. *European Heart Journal* 2005; 26:263-270
20. HUTCHENS T.W. ET AL.: Lactoferrin: structure and function. Plenum Press, New York 1994; 143-156
21. GRINNA L.S.: Age related changes in the lipids of the microsomal and the mitochondrial membranes of rat liver and kidney. *Mech.Ageing Dev.* 1977; 6: 197-205
22. MUSIL J.: Molekulové základy klinické biochemie. Grada, Praha, 1994, 130-131
23. KRUSZEWSKI M.: The role of labile iron pool in cardiovascular diseases. *Acta Biochemica Polonica* 2004; 51: 471-480
24. STANĚK V. A KOL.: Infarkt myokardu. Avicena, Praha, 1986, 47, 54-56, 61-64
25. HRADEC J., SPČIL J.: Kardiologie, Angiologie. Galén, Praha, 2001, 35-39
26. BRITIGAN B.E., SERODY J.S., COHEN M.S.: The role of lactoferrin as an anti-inflammatory molecule. *Adv Exp Med* 1994; 357: 146-156

27. VERMA S., FEDAK P.W.M., WEISEL R.D., BUTANY J., RAO V., MAITLAND A., LI R-K., DHILLON B., YAU T.M.: Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; 21:2332-2336
28. LINCOVÁ D., FARGALI H. A KOL.: Základní a aplikovaná farmakologie. Galén, Praha, 2002, 76-79,84
29. BLOOM S., DAVIS L.D.: Calcium as mediator of isoproterenol-induced myocardial necrosis. *American Journal of Pathology* 1972; 69:459-479
30. BRITIGAN J.H.: The physiology of lactoferrin. *Biochem Cell* 2002; 80: 1-6
31. MULLER F.L., LUSTARGEN M.S., JANG Y., RICHARDSON A., VAN REMMEN H.: Trends in oxidative aging theories. *Free radic. Biol. Med.* 2002; 43: 477- 503
32. MLADĚNKA P., HRDINA R., HŮBL M., ŠIMŮNEK T.: The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Medica* 2005; 48: 123-135
33. SHARP P., SRAI S.K.: Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World Journal of Gastrology* 2007; 13(35): 4716-4724
34. ZHANG J., KNAPTON A., LIPSHULTZ E.S., WEAVER L.J., HERMAN E.H.: Isoproterenol- unduced cardiotoxicity in sprague- dawley rats: Correlation of Reversible and irreversible myocardial injury with release od cardiac troponin T and roles of iNOS in myocard injury. *Toxicologic Pathology* 2008; 36:277-288
35. ADAMCOVÁ M., PELOUCH V.: Isoforms of troponin in normal and diseased myocardium. *Physiological Research* 1999; 48: 235- 257