

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

Vliv intravenosně podaného laktoferinu na časnou fázi infarktu
myokardu - histopatologická analýza
(rigorózní práce)

Vedoucí rigorózní práce:

Doc.RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Vedoucí katedry:

PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Březen, 2009

Mgr. Jan Škrle

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

SEZNAM ZKRATEK	4
1. ÚVOD	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. LAKTOFERIN	8
2.1.1. Struktura	8
2.1.2. Výskyt	9
2.1.3. Vazba železa	10
2.1.4. Účinek	11
2.1.5. Způsob podání	13
2.1.6. Využití	14
2.2. ŽELEZO	16
2.3. VOLNÉ RADIKÁLY A REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU	17
2.4. ISCHEMICKO-REPERFUZNÍ POŠKOZENÍ MYOKARDU	19
2.4.1. Reperfuzní paradox	19
2.4.2. Reaktivní formy kyslíku a reperfuzní poškození	19
2.4.3. Železo a reperfuzní poškození	20
2.4.4. Účinek antioxidantů na ischemicko-reperfuzní poškození	20
2.5. INFARKT MYOKARDU (IM)	22
2.5.1. Definice	22
2.5.2. Histologický obraz	22
2.5.3. Isoprenalinový model IM	23
3. CÍL PRÁCE	24
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1. METODICKÁ ČÁST	27
4.1.1. Zvířata	27
4.1.2. Isoprenalinový model	27
4.1.3. Chemikálie a přístroje	27
4.1.4. Provedení pokusu	28
4.1.5. Histologická analýza	28
5. VÝSLEDKY	29
6. DISKUSE	34
7. ZÁVĚR	37
8. ABSTRAKT	39
9. SUMMARY	41
10. LITERATURA	43

SEZNAM ZKRATEK

AIM	akutní infarkt myokardu
AK	aminokyselina
Apo- LF	apolaktoferin
CD 14	receptor na povrchu makrofágů
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FADH ₂	flavin-adenin-dinukleotid
H-E	Hematoxylin a eosin
Holo- Lf	hololaktoferin
IM	infarkt myokardu
i.v.	intravenosní
ISO	isoprenalin
LDL	lipoprotein o nízké molekulové hmotnosti
Lf	laktoferin
LIP	labilní zásoba železa (labile iron pool)
LPS	lipopolysacharid
NADH	nikotinamid-dinukleotid
NK buňky	natural killer buňky
p.o.	perorální
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
s.c.	subkutánní
W-G	Weigertův železitý hematoxylin- van Giesonův pikrofuchsin

1. ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění je příčinou zhruba 40 % úmrtí u dospělé populace v USA, Evropě a Japonsku. Spouštěcím mechanismem pro většinu z těchto onemocnění je ateroskleróza, jejíž etiologie je ovlivněna geneticky a vlivem prostředí. Hlavními rizikovými faktory jsou: věk, pohlaví, rodinná predispozice, hyperlipidemie, kouření, diabetes a stres.

Nejčastější příčinou morbidity a mortality je ischemická choroba srdeční a její nejzávažnější forma akutní infarkt myokardu, při kterém dochází k úplnému uzavření koronární tepny. Obnovení krevního zásobení je nezbytné pro zachování životnosti srdeční tkáně, avšak představuje také riziko tzv. reperfuzního poškození. Ve vzniku tohoto syndromu hraje důležitou roli produkce reaktivních kyslíkových radikálů tvořených za katalytického působení volného železa.

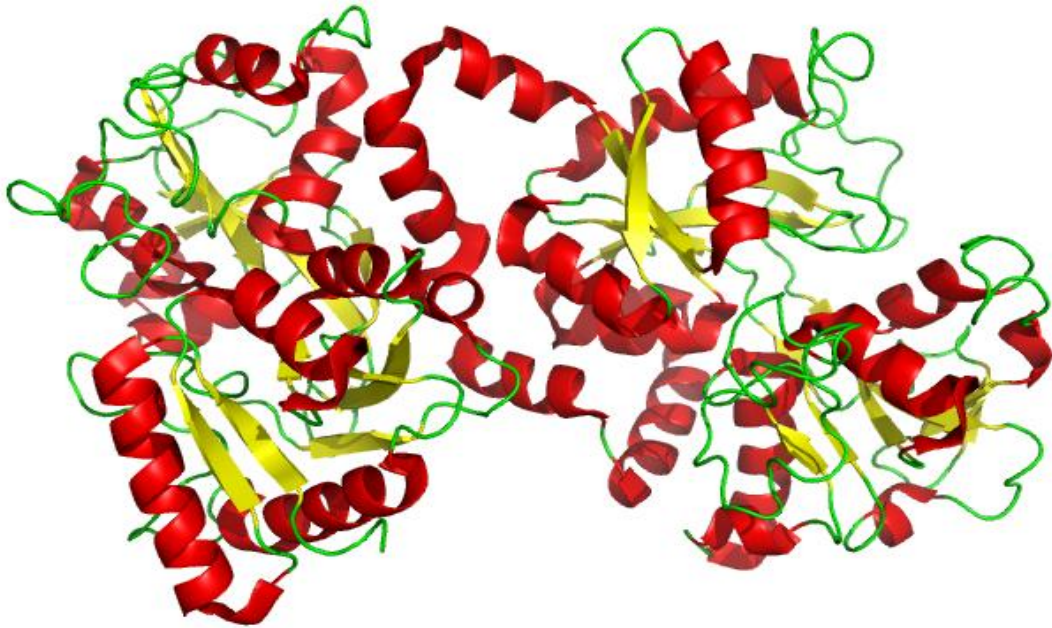
Laktoferin (Lf) je protein, který se přirozeně vyskytuje v organismu lidí a jiných živočišných druhů. Většina jeho účinků vychází ze schopnosti chelátovat trojmocné železo. Díky této vlastnosti je Lf schopen snižovat tvorbu kyslíkových radikálů, které vznikají reakcemi katalyzovanými ionty železa. V současné době je Lf studován jako potencionální léčivá látka, která by se mohla uplatnit např. v terapii kardiovaskulárních onemocnění.

2.TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Laktoferin

Laktoferin (Lf) je železo-vázající glykoprotein o molekulové hmotnosti 80 kDa. Společně s transferinem a ovotransferinem je řazen do rodiny transferinů. Poprvé byl izolován z mateřského mléka roku 1960 a od té doby je intenzivně zkoumán. (1)

2.1.1. Struktura



Obr.č.1.: Krystalová struktura hovězího laktoferinu podle Moora a kol. (29)

Protein je tvořen dvěma homologními globulárními podjednotkami (N a C). Každá z těchto podjednotek se skládá ze dvou domén (N1, N2 a C1, C2) a ty společně tvoří jedno vazebné místo pro Fe^{3+} . Obě podjednotky navzájem spojuje peptid tvořený z 10-15 aminokyselinových zbytků, které v molekule Lf tvoří 3 otáčky α helix. Zde nacházíme odlišnost od struktury sérového transferinu, který jinak vykazuje vysokou míru shody v sekvenci AK s Lf (pravděpodobně až 60 %). U transferinu je tato část tvořena nepravidelnou flexibilní strukturou. Spojovací řetězec hraje významnou roli v otevírání a zavírání domén. Sekundární strukturu proteinu ovlivňují disulfidické můstky mezi cysteinovými zbytky. (1, 3)

N-podjednotka (laktofericin) jak hovězího tak lidského Lf je silný kationický peptid, který je bohatý na argininové zbytky. Je schopen vázat mnoho kyselých molekul (LPS, lysosym, heparin a DNA). Předpokládá se, že N-podjednotka je zodpovědná za antibakteriální účinky Lf. (3)

Jednotlivé druhy laktoferinů (lidský, hovězí, vepřový, koňský, velbloudí, kozí, buvolí a myší) se shodují v primární struktuře přibližně ze 70 %. (1)

2.1.2. Výskyt

Laktoferin (Lf) se fyziologicky vyskytuje v lidském těle. Nachází se především v sekretech exokrinních žláz, např.: slzách, slinách, mléce, synoviální a seminální tekutině, žluči a pankreatické šťávě. Umístění Lf ve „vstupních branách“ do trávicího (buňky žaludeční mukósy, epitelální buňky duodena), dýchacího a reprodukčního systému může naznačovat jeho zapojení do obranyschopnosti organismu proti patogenům. (3, 4)

Dále se nachází v malé koncentraci v krvi. Tento plazmatický Lf je uvolňován ze sekundárních granul neutrofilů během zánětlivých procesů v těle. V malých množstvích byl Lf nalezen i v děloze a ve vzorcích moče a stolice. (3,4)

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

Tabulka č.1 – množství Lf v jednotlivých biologických tekutinách (3)

2.1.3. Vazba železa

1 mg laktoferinu je schopen vázat 1,4 μg železa. V přirozeném stavu je Lf z 15-20 % nasycen železem a má lososovitě růžovou barvu. Lf, který obsahuje méně než 5% železa se nazývá apolaktoferin (apo-Lf). Naopak Lf plně nasycený železem je hololaktoferin (holo-Lf). V mateřském mléce se Lf vyskytuje ve formě apo-Lf.

Lf vykazuje 260x vyšší afinitu k železu než sérový transferin a na rozdíl od něj je schopen vázat železo i při nižším pH. K uvolnění železa z molekuly Lf dochází za normálních okolností v prostředí s hodnotou pH 3 zatímco u transferinu už při pH 5,5. Tento rozdíl je způsoben rigiditou spojovacího peptidu v molekule Lf. Lf je schopen vázat i jiné kationy kovů (např. : Cu^{2+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Zn^{2+}). (3,5,6)

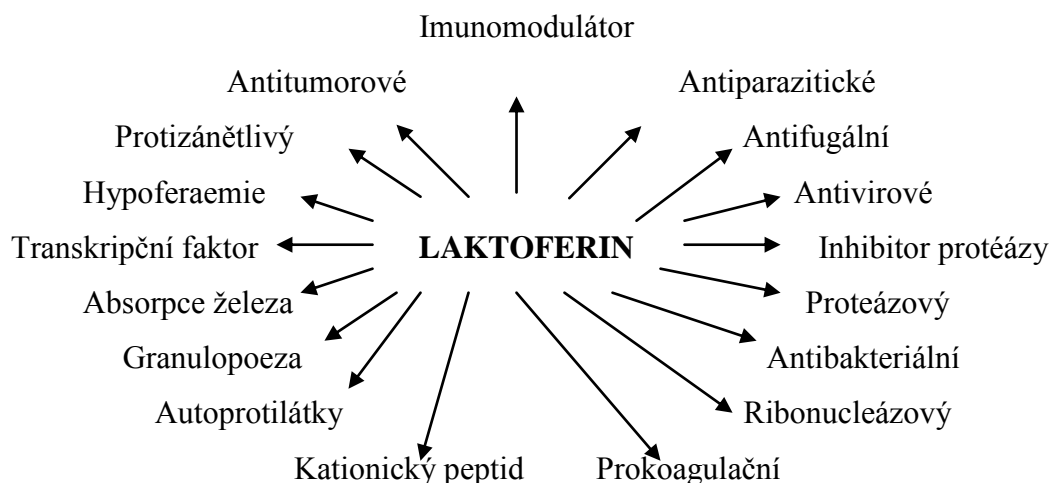
Molekula Lf umožňuje reverzibilní vazbu dvou molekul Fe^{3+} (v každé podjednotce se nachází jedno vazebné místo). Místo vazby tvoří dva tyrozinové zbytky, jedna kyselina asparagová a dva kyslíky ze synergicky vázaného anionu (CO_3^{2-}). Přítomnost bikarbonátového anionu je nezbytná pro vazbu železa, což je unikátní vlastností Lf. Z trojrozměrné struktury vyplývá, že nejprve dochází k vazbě CO_3^{2-} , který neutralizuje kladný náboj argininového zbytku v N-podjednotce a umožňuje propojení železa a čtyř ligandů (2 tyroziny a 2 kyslíky z CO_3^{2-}). Pokud není na protein navázané železo, jsou obě podjednotky většinou v otevřené konformaci. Konformační změny se uskutečňují za přispění hydrofobních interakcí a tvorby vodíkových můstků. (1)

Bylo zjištěno, že velká část železa je u kojenců vázána na Lf. Následné studie prokázaly přítomnost specifických receptorů pro Lf v kartáčovém lemu fetálních enterocytů. Tyto receptory zprostředkovávají vychytávání laktoferinem vázaného železa intestinálními epitelálními buňkami. To ukazuje, že by laktoferin mohl být důležitou transportní cestou pro železo v raném věku. (21)

Lf je schopen chelatovat volné železo a tím brání vzniku tkáňově toxických volných radikálů. (7)

2.1.4. Účinek

Ačkoliv je laktoferin (Lf) dnes intenzivně studován, jeho přesná úloha v organismu není zcela přesně definovaná. Strukturální a biochemická podobnost s transferinem naznačuje jeho možnou roli v metabolismu železa. Také jeho účinky ve velké míře souvisí se schopností vázat železo a jiné molekuly, např.: DNA, heparin. A právě díky posledně zmíněné vlastnosti má laktoferin i na železe nezávislé účinky. Usuzuje se, že celkové působení Lf má komplexní charakter. (3)



Obr.č.2.: Účinky laktoferinu (8)

Antibakteriální účinek

Zde nacházíme dvojí mechanismus účinku Lf.

- A) Lf má schopnost vázat železo a tím omezuje jeho přísun bakteriím. Při nedostatku železa dochází k pozastavení jejich růstu.(2) Laktoferin je dále schopen inhibovat agregaci bakterií a tvorbu biofilmu. Pod pojmem biofilm se rozumí skupina bakterií, které žijí ve spojení s povrchem a jsou uzavřeny do polymerní matrix. Takto žijící bakterie jsou mnohem více rezistentní než bakterie žijící samostatně. Mezi infekce způsobené biofilmem patří např.: endokarditida, osteomyelitida, infekce urinárního a bilárního traktu, zubní infekce. Bylo prokázáno, že v přítomnosti subinhibiční koncentrace Lf (20 µg/ml) bakterie nejsou schopny tvořit biofilm. Lf totiž vyvolává u bakterií „škubavý“ pohyb, který znemožňuje jejich shluknutí. Tento účinek je rovněž způsoben chelatací železa. (9)

B) Druhý mechanismus antibakteriálního působení je na železe nezávislý a je zprostředkován N-podjednotkou molekuly Lf. Dochází k poškození buněčné stěny bakteriální buňky. (8)

Antivirový účinek

Lf je schopen redukovat infektivitu různých virů hlavně in vitro. Mechanismus tohoto účinku pravděpodobně souvisí s blokováním interakcí mezi hostitelskou buňkou a virem. Tento účinek vyplývá ze schopnosti Lf vázat kyselé molekuly. (8)

Antifugální účinek

Lf působí na rod *Candida* díky své schopnosti vázat železo a díky přímé interakci s buňkami těchto organismů. Účinnost Lf byla testována v kombinaci s antifugálními léčivy. (10)

Antiparazitický účinek

Byla prokázána redukce aktivity při inkubaci sporozoitů *Toxoplasma gondii* a *Eimeria stiedai* s Lf. Pravděpodobně dochází ke snížení integrity membrány parazita. (8)

Protizánětlivý účinek

Laktoferin může přímo ovlivňovat zánětlivou odpověď. Inhibuje produkci cytokinů, které patří mezi mediátory zánětlivé odpovědi a dále inhibuje expresi adhezivních molekul na endoteliálních buňkách, které jsou nutné pro přestup imunitních buněk do místa zánětu. Inhibiční schopnost Lf je způsobena vazbou na lipid A, který je součástí LPS uvolněného z bakterií. Touto vazbou je znemožněno navázání LPS k CD14 receptorům na povrchu makrofágů a tím se zamezí rozvoji zánětlivé odpovědi. (7,11)

Imunomodulační účinek

V in vitro studii bylo zjištěno, že Lf může indukovat buněčnou proliferaci a maturaci tím, že slouží jako dárce železa pro T-buňky. Dále je schopen regulovat zrání a aktivaci lymfocytů. (12)

Po p.o. podávání Lf zdravým dobrovolníkům vzrostl počet nezralých neutrofilů v jejich krvi. (13)

Antitumorový účinek

Bylo provedeno mnoho studií na zvířatech, které prokázali, že Lf může inhibovat rozvoj experimentálních tumorů. Přesný mechanismus tohoto účinku však zatím není znám. Uvažuje se o regulaci aktivity NK buněk nebo o inhibici angiogeneze. (8)

2.1.5. Způsob podání

Perorální podání

Původně se předpokládalo, že v mléce obsažený laktoferin (Lf) se po p.o. podání absorbuje hlavně u novorozeňat a to pomocí receptoru pro Lf, který je vysoce exprimován v tenkém střevě narozených jedinců. Později se však ukázalo, že vstřebávání Lf do krevního oběhu po p.o. probíhá i u odstavených mláďat a mladého hovězího dobytka. S tímto souvisel i objev specifických receptorů pro Lf v duodenu, jejunu, ileu a colonu. Největší hustota těchto receptorů se vyskytovala hlavně v oblasti Peyerových plátů, což naznačovalo souvislost mezi transportem Lf a lymfatickým systémem. Aby byla ověřena tato domněnka, byl proveden pokus, ve kterém byl potkanům aplikován bovinní Lf přímo do duodena a to v dávce 1g/kg. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin. U jedné byla odebírána hrudní lymfa a u druhé skupiny ne. Plazmatická koncentrace bovinního Lf u skupiny, kde byla odebírána lymfa, nevzrostla po intraduodenálním podání. Rychle však vzrostla u skupiny, kde lymfa odebírána nebyla. Tento pokus jasně prokázal, že intraduodenálně podaný Lf je transportován do krevního oběhu u dospělých potkanů pomocí lymfatického systému. Takto resorbovaný Lf není okamžitě metabolizován v játrech a může být distribuován do všech orgánů v účinné dávce.

Existují určité mezidruhové rozdíly v afinitě a počtu vazebných míst pro Lf v tenkém střevě. Např. afinita Lf- receptoru v tenkém střevě potkana k bovinnímu Lf je 7 krát nižší než u dospělého skotu. To může vysvětlit rozdílný účinek Lf u dospělých jedinců.(14)

Důležitým faktorem při p.o. podání je skutečnost, že Lf je odolný vůči proteolytické degradaci trypsinem a dalších trávicích enzymů.(15)

Intravenosní podání

Při intravenosním podání Lf dochází k jeho rychlé eliminaci z krevního oběhu (92.8 +/- 9.5% dávky do 5 minut po podání). Za tento proces jsou odpovědná játra, v jejichž parenchymálních buňkách se Lf koncentruje. Lf zde totiž kompetuje o vazebné místo s apolipoproteinem E. Významný podíl na kompetici má N-podjednotka Lf, jejíž AK sekvence je velice podobná apolipoproteinu E. Po vycytání játry je Lf transportován do lysosomů, kde je rozložen. (16)

2.1.6. Využití

Laktoferin (Lf) je poměrně stabilní látka. Nerozkládá se při pasteurizaci ani při dalších antimikrobních stabilizačních postupech, což umožňuje jeho zpracování jako potencionální léčivé látky. (3)

V současné době existuje na našem trhu několik výrobků s obsahem Lf, které vycházejí z jeho výše uvedených účinků. Jedná se o preparáty určené k podpůrné terapii.

Preventan Quatro

Jedná se o volně prodejný přípravek vyráběný firmou SVUS Pharma a.s., Hradec Králové. V jedné tabletě je obsaženo 44 mg Lf, 1mg účinné složky (nukleotidy, aminokyseliny, oligopeptidy), 3 mg silice máty peprné, 5 mg eukalyptové silice a pomocné látky. Přípravek je určen proti bolesti v krku a jeho účinnost spočívá v aktivaci slizniční imunity. Výrobce doporučuje dávkování je 2 tablety denně nechat volně rozplynout ústech. (17)

Imunoenzym

Výrobce tohoto přípravku je FAVEA spol. s.r.o. Kopřivnice. Jedna tableta obsahuje 20 mg laktoferinu, 60 mg vitamínu C, 25 mg rutinu, 15 mg enzymů (papain a bromelain). Tento výrobek je určen k posílení obranyschopnosti organismu a jako prevence onemocnění dýchacích cest. Doporučuje se užívat 1 tabletu denně v období zvýšeného výskytu bakteriálních a virových onemocnění. (18)

Medvíďata při kašli a nachlazení

Opět přípravek vyráběný firmou Favea s.r.o. určený na kašel a nachlazení a jako prevence zánětu středního ucha. Jedná se o tablety s obsahem 20 mg kolostra (zdroj laktoferinu), 500 mg xylitolu, 100 mg sorbitolu, 40 mg fruktózy a 20 mg manózy. Výrobce uvádí, že kombinace těchto látek účinně brání adhezi mikrobů a virů. Doporučené dávkování je vycucat 1-3 tablety denně. (18)

2.2. Železo

Železo je nepostradatelný biogenní prvek. Významně se uplatňuje v řadě metabolických procesů (syntéza DNA, RNA a proteinů, transport elektronů, respirace, proliferace, diferenciacie a regulace genové exprese). Závisí na něm reverzibilní vazba kyslíku na hemoglobin a další významné biochemické reakce. (20, 21) Díky své schopnosti odevzdávat a přijímat elektron je součástí mnoha enzymů. Za určitých podmínek může však být železo pro organismus nebezpečné a to svou účastí na tvorbě volných radikálů. (30)

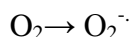
Homeostáza železa je děj, jehož se účastní celá řada různých proteinů. Na „rozcestí“ mezi jednotlivými metabolickými procesy (vychytávání, uskladnění) může vznikat určité množství volně přístupných iontů železa, které jsou někdy označovány jako labilní zásoba železa (labile iron pool: LIP). LIP je definována jako zásoba lehce chelatovatelného, tj. nevázaného nebo slabě vázaného, železa o nízké molekulové hmotnosti. Pravděpodobně obsahuje obě formy železa (Fe^{2+} a Fe^{3+}) spojené s různými ligandy. LIP představuje jen malý zlomek celkového buněčného železa (3-5 %). V in vitro studii LIP katalyzovala volnými radikály podmíněnou oxidaci LDL v endoteliálních buňkách, hladké svalovině a v makrofázích. To ukazuje přímou souvislost mezi oxidací LDL a metabolismem železa. (22)

2.3. Volné radikály a reaktivní formy kyslíku

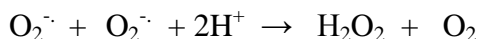
Volný radikál je samostatně existující jednotka obsahující jeden nebo více nepárových elektronů. Radikály vznikají ztrátou nebo přijmutím elektronu. Přítomnost nepárového elektronu činí tyto formy vysoce reaktivními.

Většina důležitých volných radikálů vzniká z molekuly kyslíku. Pokud tato molekula přijme jeden elektron (jako jeho zdroj slouží např. NADH a FADH₂), dojde ke vzniku superoxidového radikálu (O₂^{•-}). Radikály mají také své meziprodukty, např. peroxid vodíku (H₂O₂) nebo peroxinitrit (ONOO⁻), které jsou rovněž vysoce reaktivní a svými biologickými funkcemi se podobají volným radikálům, a proto je řadíme do skupiny reaktivních forem kyslíku (ROS).

Aby byla molekula kyslíku využita jako zdroj biologické energie, musí dojít k její úplné redukci. Tento proces probíhá v mitochondriích. Redukce však není 100 % a 1-4 % kyslíku se neúplně redukuje za vzniku superoxidového radikálu.



Tuto reakci katalyzuje NADH koenzym Q reduktáza. Velké množství O₂^{•-} vzniká hlavně při nadměrné koncentraci kyslíku nebo při poškození mitochondrií. Většina vzniklého superoxidu je pomocí superoxid-dismutázy přeměněna na peroxid vodíku (H₂O₂). Ten snadno difunduje přes mitochondriální membránu.



Peroxid vodíku je redukován na kyslík a vodu nebo reaguje s přechodnými kovy (hlavně s Fe²⁺) za vzniku hydroxylového radikálu (OH[•]). Tato reakce se nazývá Fentonova.



OH[•] je obzvláště reaktivní radikál, který je schopen reagovat se všemi biologickými molekulami. Na rozdíl od stabilnějších radikálů (např. O₂^{•-}) může takto reagovat pouze

na místě svého vzniku.(19) Volné kyslíkové radikály jsou za určitých podmínek pro organismus velmi škodlivé. Díky své vysoké reaktivitě mohou poškozovat proteiny (oxidace aminokyselin), DNA (změny ve struktuře, mutace) a lipidy (narušení soudržnosti lipidové dvojvrstvy). Proto má organismus vyvinutý svůj endogenní antioxidační systém, který ho chrání před možným poškozením. Mezi hlavní endogenní antioxidanty patří superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza, glutathion, koenzym Q10, vitamín C a E. (19)

2.4. Ischemicko-reperfuzní poškození myokardu

2.4.1. Reperfuzní paradox

Reperfuzní poškození je běžným klinickým paradoxem. Jedná se o náhlé znovuoobnovení krevního zásobení ischemické tkáně, které však může způsobit závažné poškození buněk a tkání. Setkáváme se s ním u ischemického myokardu, při mozkových onemocněních nebo po transplantacích bohatě prokrvených orgánů (např. jater). (22, 25)

2.4.2. Reaktivní formy kyslíku a reperfuzní poškození

ROS se podstatnou měrou uplatňují v patogenezi postischemického poškození srdce. Buněčná smrt při ischemicko-reperfuzním poškození je způsobena nekrózou a apoptózou. Ukázalo se, že ROS přímo indukují apoptózu při tomto poškození. Arytmie vzniklé při ischemicko-reperfuzním poškození jsou způsobené přímým elektrofyziologickým působením ROS na myokard.

Hlavním zdrojem ROS při reperfuzi ischemické tkáně je xanthin-oxidáza. Během ischemie jsou purinové prekurzory degradovány na hypoxanthin a xanthin a enzym xanthin-dehydrogenáza je přeměněn na xanthin-oxidázu. Xanthin-oxidáza katalyzuje oxidaci hypoxanthinu a xanthinu na kyselinu močovou a zároveň redukuje O_2 na O_2^- a H_2O_2 . (19)

Uvolnění ROS v průběhu reperfuze myokardu je považováno za hlavní důvod snížení činnosti srdce po proběhlé ischemii. Malé množství ROS se však uvolňuje i v průběhu ischemie a ty jsou signální molekulou při znovuoobnovení energetické bilance během reperfuze. Takto vzniklé radikály snižují energetický výdej při kontrakci během reperfuze. Byla provedena studie, ve které byly podávány antioxidantní látky před ischemií a během reperfuze. Bylo zjištěno, že pokud se podají antioxidanty před ischemií, dojde k inhibici obnovy produkce ATP během reperfuze. Závěrem je však nutno říci, že ani jeden způsob podání těchto látek neovlivnil postischemický pokles kontraktility myokardu. (26)

V sedmdesátých letech minulého století byl přijat i fyziologický význam ROS. Zjistilo se, že ROS jsou důležitými mediátory při přenosu signálu, který je spojený s činností myokardu. ROS jsou tvořeny jako odpověď na aktivaci receptotů na povrchu buňky (cytokiny a receptory spřažené s G-proteinem). Takto vytvořené ROS se podílí na regulaci apoptózy a buněčné proliferace. Tento objev ukázal, že ROS jsou významné pro regulaci buněčného života. (19)

2.4.3. Železo a reperfuční poškození

Byla provedena studie na ischemickém myokardu potkana, která prokázala 600 % nárůst produkce peroxidu vodíku při náhlé reperfuzi. Je známo, že peroxid vodíku dokáže ovlivnit uvolnění iontů železa z proteinů, kde je železo vázáno společně se sírou. To způsobí nárůst intracelulární LIP, která může být uvolněna z buňky. Mimoto byla pozorována masivní mobilizace iontů železa a mědi při prolongované srdeční ischemii. Redoxně aktivní je obzvláště tzv. „volné“ železo a měď. Způsob, jakým se oba kovy podílí na poškození tkáně popisuje kovy katalyzovaná Fentonova reakce. (22)

2.4.4. Účinek antioxidantů na ischemicko-reperfuční poškození

Exogenní podání látek s antioxidačním účinkem bylo intensivně sledováno za účelem snížení poškození myokardu při ischemicko-reperfučním ději. Můžeme sem zařadit látky, které vychytávají ROS (superoxiddismutáza, deferoxamin, vitamin C a E) a látky, které zabraňují tvorbě ROS (deferoxamin, laktoferin, allopurinol). Ačkoliv pokusy provedené na zvířecích modelech měly pozitivní výsledky, nepotvrdil se tento účinek v klinických studiích. To mohlo být způsobeno např. neúspěšným transportem léčiva do poškozené tkáně nebo nízkou buněčnou permeabilitou. (19)

Deferoxamin

Deferoxamin je přirozeně se vyskytující látka, která se izoluje ze *Streptomyces pilosus*. V lékařství se běžně využívá jako chelátor železa. Chemicky se jedná o trihydroxamovou kyselinu. Každá molekula deferoxaminu reaguje s jedním atomem železa. Jeho nevýhodou je, že musí být podán parenterálně.

Bylo prokázáno, že deferoxamin příznivě ovlivňuje vasodilataci arterií u pacientů s poškozením srdečních cév. Jedná se o vasodilataci vyvolanou endotelem produkovaným oxidem dusnatým. Snížení cévní funkce díky zvýšené koncentraci iontů

železa může vysvětlit souvislost mezi kardiovaskulárním poškozením a ionty železa. Snížená cévní činnost se běžně projevuje u pacientů s aterosklerózou, kde endoteliální poškození je klíčem ke vzniku akutního ischemického poškození. (27)

Díky svým chelatačním schopnostem snižuje dostupnost iontů železa v reakci podílející se na tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů (ROS). Dále je schopen také přímo vychytávat volné radikály. Provedené studie prokázaly jeho protektivní účinek při ischemicko-reperfučním poškození. (19)

Ioannis A. Paraskevaidis a jeho kolegové provedli pokus, ve kterém chtěli zjistit účinek i.v. podaného deferoxaminu na reperfuční poškození u pacientů podstupujících koronární bypass. Je totiž známo, že znovuoobnovení koronárního průtoku při reperfuzi je spojeno se sníženou funkcí levé komory a pomalým návratem do plného funkčního stavu. To je způsobeno volnými radikály, které jsou produkovány v průběhu reperfuze a mohou vést až poškození myocytů. Srdce je chráněno vlastním antioxidačním mechanismem, ale pokud dojde k rozsáhlému oxidačnímu stresu, tento vnitřní mechanismus je nedostatečný a je třeba užít exogenně podaný antioxidant. V této studii byl prokázán příznivý účinek deferoxaminu na zlepšení činnosti levé komory srdeční po proběhlé ischemii a to hlavně u pacientů se slabou srdeční funkcí. (28)

Laktoferin

Shigeto Shimmura a jeho spolupracovníci provedli studii, ve které chtěli ověřit protektivní účinek laktoferinu (Lf) u reperfučního poškození rohovky. Použili epitelální buňky lidské rohovky, které vystavili přechodně ischemii a poté znovu obnovili přísun kyslíku. Bylo ověřeno, že právě reperfuze vede k velkému poškození buněk a to v důsledku tvorby volných kyslíkových radikálů (ROS) při tomto ději. Lf, jako hlavní protein vyskytující se v slzách prokázal schopnost snižovat poškození epitelálních buněk rohovky při reperfučním poškození díky své schopnosti chelatovat železo. To se uplatňuje při vzniku ROS. Bylo zjištěno, že Lf je vychytáván buňkami rohovky a působí zde jako transportér železa a zároveň jako účinný antioxidant. (25)

2.5. Infarkt myokardu (IM)

2.5.1. Definice

Akutní infarkt myokardu (AIM) je ložisková ischemická nekróza srdečního svalu, která vzniká náhlým uzávěrem věnčité tepny zásobující příslušnou oblast. U naprosté většiny nemocných (asi 95 %) je příčinou akutního uzávěru věnčité tepny koronární ateroskleróza. Mechanismus vzniku akutního uzávěru může být dvojitý: a) dojde k ruptuře nestabilního plátu, na který nasedá intrakoronární trombus, b) stabilní aterosklerotický plát se pozvolna zvětšuje a vede k těžkému zúžení průsvitu věnčité tepny. Ischemická nekróza myokardu začíná již za 20-30 minut po uzávěru věnčité tepny. Rozsah infarktu je dán především velikostí povodí uzavřené tepny a přítomností kolaterálního cévního zásobení. Při postižení více než 20 % myokardu levé komory se obvykle rozvíjí dysfunkce levé komory, což se klinicky projeví známkami srdečního selhání. (23)

Ateroskleróza je jednou z hlavních příčin uzavření krevního zásobování známého jako ischemie a je zodpovědná za 40 % úmrtí v USA, Evropě a Japonsku. Etiologie aterosklerózy je ovlivněna geneticky a vlivem prostředí. Hlavními rizikovými faktory jsou: věk, pohlaví, rodinná predispozice, hyperlipidemie, kouření, diabetes a infekce. Převládající hypotézou popisující etiologii aterosklerózy je „zánětlivá teorie“, která popisuje tuto chorobu jako proliferaci hladkého svalu cévní stěny jako důsledek různých poškození. (22)

2.5.2. Histologický obraz

Histologická analýza časného infarktu myokardu pomocí světelné mikroskopie je poměrně složitá, protože mnoho buněk přežívá i hodinu trvající ischemii. Diagnostickým znakem buněčné smrti jsou až sekundární změny vyvolané nekrotizací (ty se ve většině tkání objevují po 6-8 hodinách).

Bylo však prokázáno, že akutní ischemie myokardu je provázena protaženými a zvlněnými svalovými vlákny, které se vyskytují na hranici oblasti zasažené infarktem. Tento jev se zdá být charakteristickým znakem časného infarktu myokardu (vytváří se do jedné hodiny od ischemie). Zvlněná vlákna jsou tenká a protažená. Jejich vznik je popsán následovně: svalová vlákna v oblasti zasažené ischemií se přestanou pohybovat,

ale díky svému napojení na vlákna se zachovalou pohyblivostí, jsou při každé systole vystaveny silnému tahu. Tím dojde k jejich protažení a následnému ohýbání následkem mechanické síly. (24,31)

Po 4-8 hodinách od proběhlé ischemie vzniká edém intersticia a za 12-24 hodin se začíná vyvíjet koagulační nekróza myokardiálních buněk- plazma dostává eozinofilnější zbarvení a jádro buď bledne (karyolýza) nebo se svrášťuje a tmavne (pyknóza). Posléze jsou buňky změněny ve svráštělé, silně eozinofilní bezjaderné útvary bez příčného pruhování. Kolem 24. hodiny se v intersticiu začínají objevovat neutrofilní leukocyty (2.-3. den je infiltrát nejvýznamnější). Třetí až sedmý den po ischemii dochází k rozpadu mrtvých buněk a v infiltrátu se objevují makrofágy. Poté dochází k náhradě nekrotického myokardu granulační tkání. Kolem 10. dne již bývá takto nahrazena větší část infarktu. Zhruba během 6 týdnů se granulační tkáň změní v pevnou kolagenní jizvu. (32)

2.5.3. Isoprenalinový model IM

Isoprenalin (synonymum isoproterenol) je syntetická látka s neselektivním působením na receptory β (β_1 i β_2) a s nevýznamným účinkem na receptory α . Stimulací β_1 -receptorů v myokardu dochází ke zvýšení srdeční frekvence (positivně chronotropní účinek), zesílení srdeční kontrakce (positivně inotropní účinek), urychluje se vedení vzruchu (positivně dromotropní účinek) a zvyšuje se srdeční dráždivost (positivně batmotropní účinek). Díky svým účinkům byl někdy využíván jako dočasné kardiostimulans při kardiopulmonální resuscitaci. (33)

V určitých dávkách je isoprenalin schopen navodit na zvířecím modelu poškození podobné infarktu myokardu. Poškození je nejvíce patrné v oblastech svaloviny, která je nejcitlivější k hypoxii (subendokardium levé srdeční komory). Isoprenalinem navozená β -adrenergní kardiostimulace způsobí nárůst oxidativního metabolismu v srdci. Koronární cirkulace pak není schopná zajistit dostatečné množství kyslíku pro myocyt. Energetická nestabilita společně s množstvím biochemických (masivní influx vápníku, agregace krevních destiček, stimulace systému adenylát-cyklázy a tvorba reaktivních kyslíkových radikálů) a strukturálních změn (ovlivnění propustnosti membrán) přispívá k patogenezi destrukce myocytu (apoptóza a nekróza).(34)

3. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce je stanovit účinky intravenosně podaného chelátoru železa laktoferinu na histologický obraz časně fáze modelového akutního infarktu myokardu u potkana.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Metodická část

4.1.1. Zvířata

K experimentům byli použiti samci potkanů kmene Wistar (Bio Test s.r.o. Česká republika) o průměrné hmotnosti 350g. Zvířata byla chována ve viváriu Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové se zajištěním ventilace vzduchu pro otevřenou chovu, teplotou v rozmezí 22-24°C, s volným přístupem ke standardní peletizované stravě a pitné vodě. K pokusům byla zvířata použita po čtrnáctidenní době aklimatizace. 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. Isoprenalinový model

Pro studium infarktu myokardu jsme použili isoprenalinový model. Je totiž známo, že v určitých dávkách je isoprenalin schopen na zvířecím modelu navodit poškození podobné infarktu myokardu (podrobněji viz. Kapitola 2.5.3).

4.1.3. Chemikálie a přístroje

urethan (ethylurethan, Sigma-Aldrich, USA)

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

isoprenalin (ISO, Sigma-Aldrich, USA)

laktoferin (DMV International, USA)

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

4.1.4. Provedení pokusu

Pokus probíhal ve spolupráci s kolegy z Katedry farmakologie, kteří hodnotili biochemické parametry poškození myokardu. Nejprve jsme zvířata náhodně rozdělili do čtyř skupin:

1. Kontrolní skupina („C“, 7 zvířat), aplikace fyziologického roztoku (1 ml kg^{-1}) s.c.
2. Isoprenalinová skupina („I“, 13 zvířat), aplikace ISO (100 mg kg^{-1}) s.c.
3. Laktoferinová skupina („La“, 7 zvířat), aplikace laktoferinu (50 mg kg^{-1}) i.v.
4. Laktoferin + Isoprenalin („LaI“, 11 zvířat) i.v. aplikace laktoferinu (50 mg kg^{-1}) 5 minut před s.c. podáním isoprenalinu (100 mg kg^{-1})

Aplikace jednotlivých látek byla provedena 24 hodin před chirurgickým výkonem. Tomu vždy předcházelo 12 hodinové lačnění zvířat a následná anestezie intraperitoneálně podaným urethanem ($1,2 \text{ g kg}^{-1}$). Součástí pokusu bylo měření hemodynamických funkčních parametrů. Pokus byl ukončen po 35 minutách i.v. podáním KCl (1 mM). Poté byl odebrán myokard pro následnou histologickou analýzu.

4.1.5. Histologická analýza

Vyšetření byl podroben příčný řez levé a pravé komory myokardu. Tkáň odebranou pro histologickou analýzu jsme zpracovali standardními histologickými postupy (fixace, odvodnění, projasnění, prosycení parafínem a zalití do parafínu). Z parafínových bločků jsme připravili histologické řezy ($7 \mu\text{m}$ silné), které jsme dále nabarvili. Jako základní techniku barvení preparátů jsme použili hematoxylin a eosin. Obarvené preparáty jsme zamontovali do Solakrylu. Po zaschnutí byly vzorky připraveny pro analýzu světelnou mikroskopií (metodika histologického zpracování byla podrobně popsána v diplomové práci: Škrle 2007. (35))

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

5. VÝSLEDKY

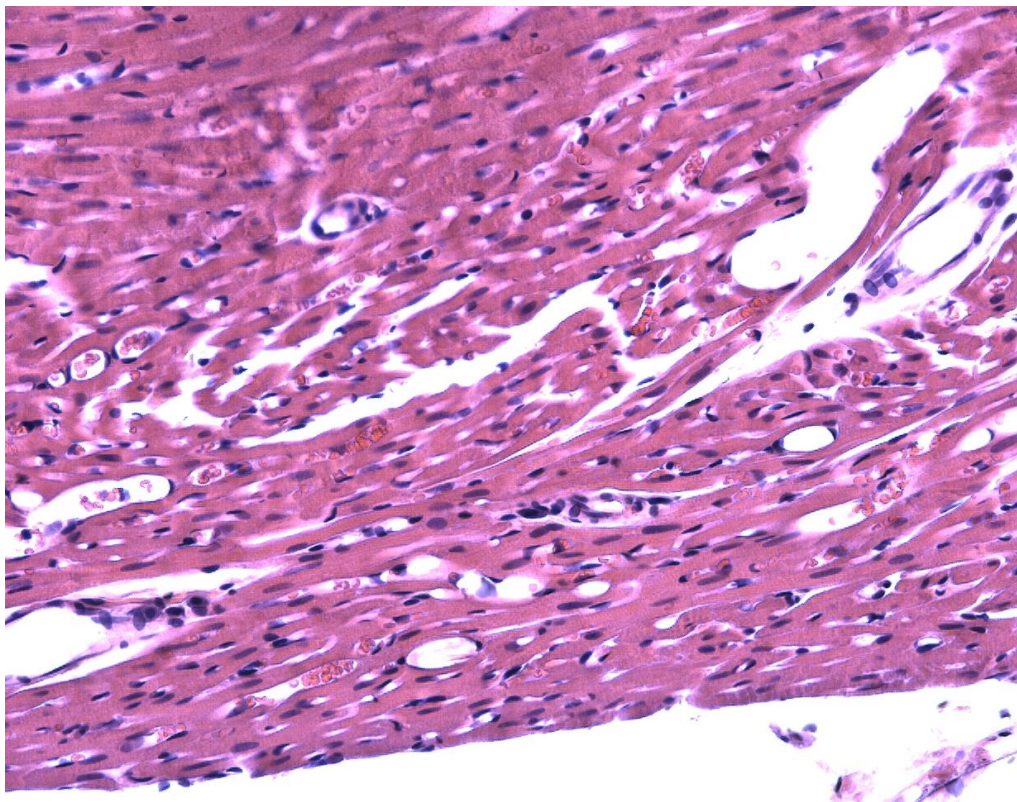
V průběhu pokusu nedošlo k úmrtí žádného zvířete z kontrolní skupiny ani z tzv. „laktoferinové“ skupiny. V obou zbývajících skupinách („I“ a „LaI“) byla srovnatelná mortalita (4 a 3 zvířata)

Pomocí příčných i podélných řezů celým vypreparovaným myokardem jsme ověřovali histologické změny, které nastaly po experimentálním podání laktoferinu (Lf) na isoprenalinový model infarktu myokardu u potkana.

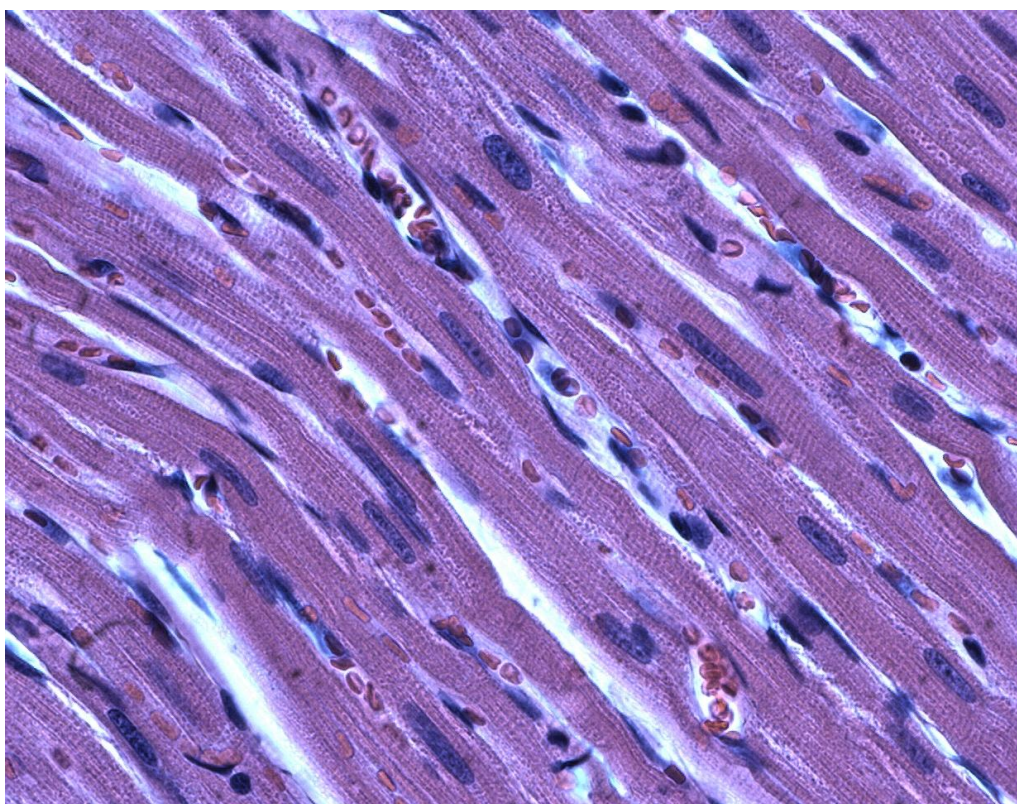
V kontrolní („C“) i v laktoferinové („La“) skupině jsme shodně pozorovali nepoškozenou stavbu myokardu. Kardiomyocyty tvořily kompaktní strukturu. Jádra buněk měla doutníkovitý tvar a byla uložena centrálně (Obr.č.3,4). Na detailnějším zobrazení bylo dobře patrné žihání svalových buněk (Obr.č.4).

U obou zbývajících skupin („I“, „LaI“) bylo možné pozorovat ischemické poškození myokardu, které mělo difuzní charakter s největší intenzitou v subendokardiální oblasti. V čase 24 hodin od expozice isoprenalinem (případně kombinace Iso + Lf) byly patrné znaky časně fáze infarktu myokardu. Pozorovali jsme zvětšené intersticiium se známky edému a neutrofilním infiltrátem (obr.č.5,6). Cytoplasma myocytů byla silně eosinofilní s pozorovatelnými změnami jader. Ta byla vybledlá (karyolýza) nebo svráštělá a ztmavlá (pyknóza) (obr.č.7). To ukazuje na vývoj koagulační nekrózy myokardiálních buněk. V některých preparátech se vyskytovali drobné hemorrhagie (obr.č.7) Na obrázku č.8 je dobře patrný přechod mezi tkání zasaženou nekrózou (vpravo dole) a tkání nepostiženou (vlevo nahoře). Postižené buňky jsou neohraňované, bez příčného pruhování, vyskytují se u nich jaderné změny a vakuolizace cytoplazmy.

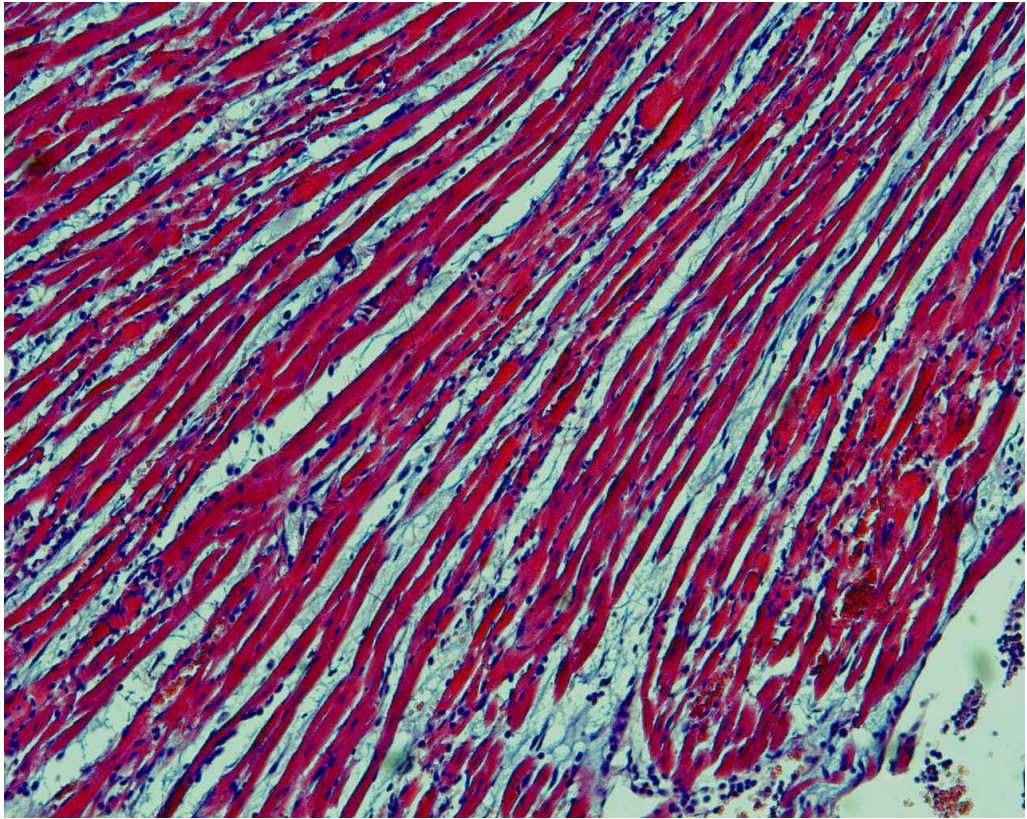
Ve skupině, ve které byl podán laktoferin 5 minut před isoprenalinem jsme nepozorovali významný protektivní účinek na poškození stavby myokardu oproti skupině, kde byl isoprenalin podán samostatně. V některých preparátech mělo poškození sice mírnější charakter, avšak tento trend se vyskytoval náhodně.



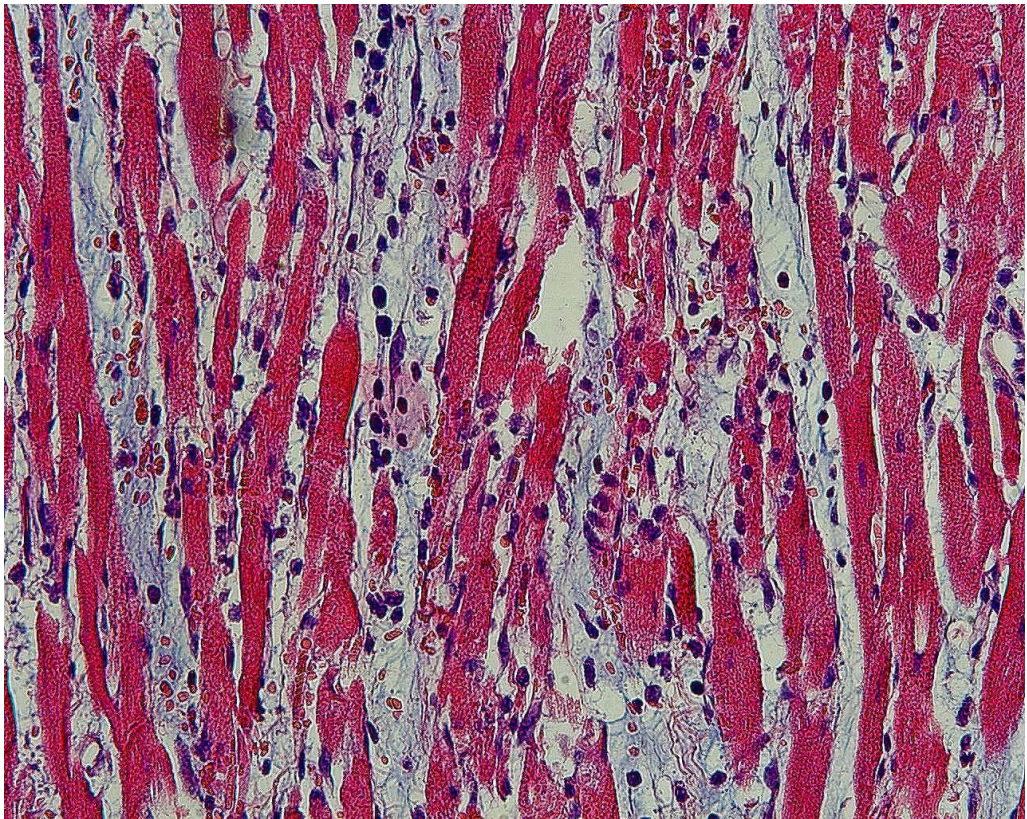
Obr.č.3- La- myokard- barveni H-E, zv.200x



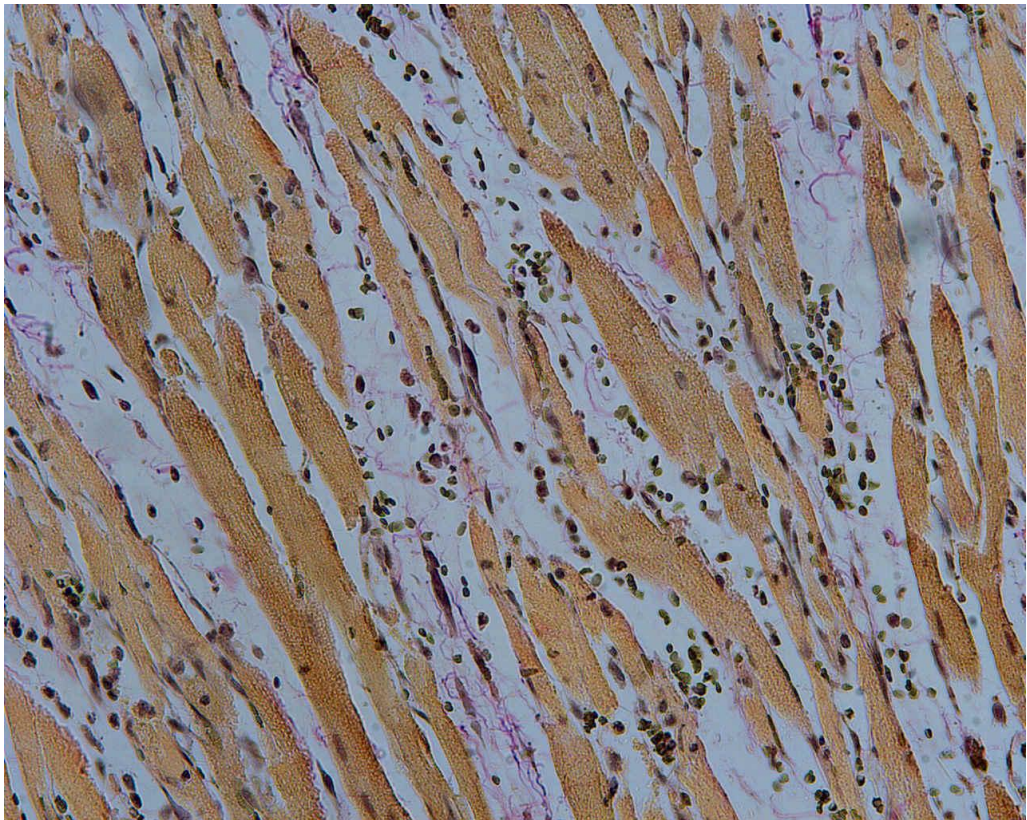
Obr.č.4- La-myokard- barvení H-E, zv. 400x



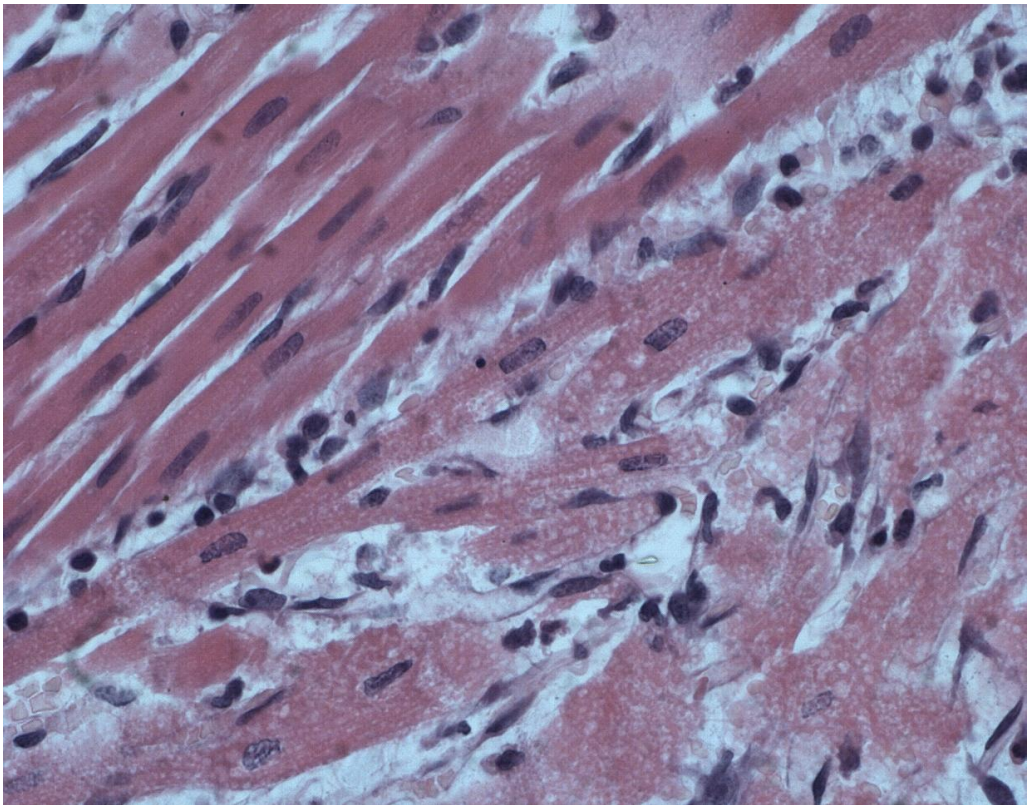
Obr.č.5- LaI-myokard- barvení H-E, zv. 200x



Obr.č.6- LaI- myokard- barvení H-E, zv. 400x



Obr.č.7 – LaI- myokard- barvení W-G, zv. 400x



Obr.č.8- LaI- myokard- barvení H-E, zv. 400x

6. DISKUSE

Laktoferin (Lf) je železo-vázající glykoprotein o molekulové hmotnosti 80 kDa. Fyziologicky se vyskytuje v mnoha tkáních, orgánech i tekutinách lidského těla. Ačkoliv je intenzivně studován, není jeho funkce v organismu zcela objasněná. (3)

Většina účinků Lf je spojována se schopností vázat železo. Oproti transferinu vykazuje 260x vyšší afinitu k tomuto iontu. Železo se uplatňuje jako katalyzátor reakcí, při kterých vznikají pro organismus nebezpečné ROS. Díky svým železo-chelatačním účinkům může Lf potlačovat tvorbu těchto škodlivých látek. (3,7)

ROS se podstatnou měrou uplatňují v patogenesi postischemického poškození srdce. Uvolňují se v průběhu reperfuze a přímo způsobují poškození myokardu (apoptóza, nekróza, arytmie).(19) Exogenní podání látek s antioxidačním účinkem je intenzivně sledováno za účelem snížení poškození myokardu při ischemicko-reperfuzním ději. Díky svému biologickému původu a silné vazbě železa se předpokládá, že i laktoferin by mohl pozitivně působit při tomto poškození. V in vitro studii na buňkách rohovky prokázal Lf schopnost snižovat poškození epiteliálních buněk navozené reperfuzí. (25)

V našem experimentu jsme se zaměřili na studium vlivu intravenózně podaného Lf na časnou fázi infarktu myokardu. Konkrétně jsme se zabývali histopatologickou analýzou. Vycházeli jsme z antioxidačních a chelatačních účinků Lf a předpokládali snížení tvorby ROS a následně i menší ischemicko-reperfuzní poškození tkáně. Pro sledování protektivních účinků Lf byl využit isoprenalinový model. Exogenní podání katecholaminů (ve větších dávkách) navozuje totiž podobný stav jako u infarktu myokardu.

Podání laktoferinu nebylo spojeno s žádnými viditelnými změnami v histologickém obraze myokardu. Histologický nález byl neodlišitelný od kontrolní skupiny. Isoprenalinem navozená ischemie se projevila negativně na stavbě tkáně. Pozorovali jsme změny charakteristické pro časnou fázi infarktu myokardu. Zaznamenali jsme difúzní charakter poškození myokardu s největší intenzitou v subendokardiální oblasti. Časté bylo zejména zvětšené intersticiium se známkami edému a neutrofilním infiltrátem. To ukazuje na aktivaci imunitního systému a zánětlivou reakci. V buňkách jsme často pozorovali jaderné změny (karyolýza, pyknóza) a eozinofilní cytoplazmu s vakuolizacemi, což je charakteristické pro vývoj koagulační nekrózy. Některé buňky již

neměly zachované příčné pruhování. Drobné hemorrhagie mohly být způsobeny náhlou reperfuzí nebo manipulací při odběru.

Podání laktoferinu 5 minut před aplikací isoprenalinu („LaI“) nedokázalo zmírnit poškození myokardu. Pozorovali jsme podobný obraz jako po podání isoprenalinu. Neschopnost laktoferinu navodit protekci mohlo být způsobeno několika faktory. 1) Po i.v. podání je značná část Lf do pěti minut vycytána játry.(16) 2) Poškození myokardu navozené ISO má komplexní charakter (nejen produkce ROS, ale i adrenergní stimulace).(36) 3) Malá schopnost Lf pronikat do buněk díky hydrofilnímu charakteru molekuly.

Vzhledem k velkému chelatačnímu potenciálu Lf by bylo vhodné pokračovat ve studiu této látky ve vztahu k poškození myokardu. Je třeba zhodnotit dávkovací schéma a případnou modifikaci struktury k dosažení příznivější farmakokinetiky. Díky poznatkům o p.o. podání je třeba uvažovat i o této možnosti aplikace Lf.

7. ZÁVĚR

Intravenosní podání laktoferinu v dávce 50 mg.kg^{-1} nemělo protektivní účinek na patologické změny navozené podáním isoprenalinu v dávce 100 mg.kg^{-1} . Isoprenalinem navozené poškození připomíná časnou fázi AIM. Přesto, že jsou do patofyziologie akutních fází AIM zapojeny ROS produkované za katalatického přispění volného železa, nebyl laktoferin, jako endogenní chelátor železa, schopen tento proces zmírnit.

8. ABSTRAKT

Laktoferin (La) je železo vázající glykoprotein o molekulové hmotnosti 80 kDa. Jeho struktura vykazuje vysokou míru shody v sekvenci aminokyselin a v trojrozměrném uspořádání se sérovým transferinem. Afinita Lf k železu je 260x vyšší než u transferinu. Lf se fyziologicky vyskytuje v exokrinních sekretech: např. slzy, sliny, mateřské mléko, synoviální a seminální tekutina. Dále se vyskytuje v sekundárních granulech neutrofilů. Přesná funkce Lf v organismu je velmi často diskutována. Pravděpodobně má komplexní charakter. V uskutečněných studiích byl popsán antimikrobiální, protizánětlivý a antitumorový účinek Lf. Tento efekt stejně jako inhibice tvorby hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí souvisí s chelatací volného železa.

Katecholaminový model poškození myokardu, navozený podáváním syntetického katecholaminu isoprenalinu (ISO), se v mnoha patofyziologických ohledech podobá akutnímu infarktu myokardu (AIM). Jedinou možností obnovy tkáně srdeční svaloviny při AIM je její perfuze. Tento proces je však provázen uvolněním velkého množství hydroxylových radikálů, které vznikají Fentonovou reakcí za katalýzy volného železa. Hydroxylové radikály se významně podílejí na poškození srdeční tkáně. Díky svým schopnostem se předpokládá, že by Lf mohl mít pozitivní efekt na srdeční poškození navozené podáním katecholaminů.

V našem experimentu jsme sledovali vliv Lf na histologickou strukturu myokardu u ISO modelu AIM navozeném na potkanovi. Zvířata jsme náhodně rozdělili do čtyř skupin: kontrolní skupina (roztok NaCl 1ml kg⁻¹), ISO skupina (ISO s.c. 100 mg kg⁻¹), La skupina (La i.v. 50 mg kg⁻¹), La+ISO skupina (i.v. La 5 min. před s.c. aplikací ISO). Na konci experimentu byl odebrán myokard pro histopatologickou analýzu. V kontrolní a v La skupině jsme pozorovali normální strukturu myokardu. Významné patologické změny v celém myokardu jsme našli ve skupině ISO a La+ISO. Pozorovali jsme intersticiální edém, zánětlivý infiltrát, myocyty s eosinofilní cytoplazmou a jadernými změnami (pyknósa). Závěr, který jsme z našeho pokusu vyvodili je, že La nedokázal zmírnit ISO navozené poškození struktury myokardu.

Výsledky našeho experimentu mohou být užitečné pro další sledování protektivního účinku La na ischemicko-reperfuzní poškození myokardu. V dalších studiích by bylo vhodné zaměřit se na zlepšení farmakokinetických parametrů Lf. Pro tuto práci byly využity prostředky z grantu GA UK 94/2006/C/Faf.

9. SUMMARY

Lactoferrin (Lf) is an 80-kDa iron-binding glykoprotein. It shares a high degree of homology at amino acid sequence level and also the three dimensional conformation level with transferrin. Afinity of Lf to iron is about 260times higher than that of transferrin. 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 is still a hot subject of scientific disputation. Lf was documented to act as antimicrobial, antiinflammatory and antitumoral agent. These effects are probably based on its iron chelating properties. Similarly La inhibits hydroxyl radical formation via Fenton reaction due to chelation of free iron.

The catecholamine model of myocardial injury, represented by administration of synthetic catecholamine isoprenaline (ISO), posseses many pathophysiological similarities with acute myocardial infarction (AMI). The only possibility for myocardial tissue recovery in AMI represents the reperfusion of ischaemic myocardium. But this process is associated with tissue derangement due to burst of hydroxyl radical catalyzed by free iron (Fenton reaction). Therefore La has been proposed to have potentially positive effects in a catecholamine model of myocardial injury.

In our experiment we studied the influence of Lf on histological features of rat catecholamine model of myocardial injury. Animals were randomly divided into four groups: Control group (saline 1ml kg^{-1}), ISO group (ISO s.c. 100 mg kg^{-1}), La group (La i.v. 50 mg kg^{-1}), lactoferrin+isoprenaline group (i.v. lactoferrin 5 min. before s.c. application of isoprenaline). The myocardial tissue was removed at the end of the experiment and histopathologically analyzed. Normal structure of myocardium was observed in the control group and in the lactoferrin group. Significant pathological changes of the whole myocadium was found in both isoprenaline and isoprenaline+lactoferrin treated groups. We observed interstitial oedema, inflammatory infiltrate, myocytes with eosinophilic cytoplasm and nuclei changes (pyknosis). The conclusion was, that administration of lactoferrin did not affect morphological changes in myocardium induced by isoprenaline.

The results of our work can be usefull for further study of protective effect of Lf on ischemia-reperfusion injury. It could be useful to improve the farmacokinetics of Lf. The work was supported by Charles University, grant No 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. *Bio Metals* 2004; 17: 209-216
2. 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
3. STEIJNS J.M.,VAN HOODONK A.C.M.: Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition* 2000; 84 Suppl 1: 11-17
4. MASON D.Y., TAILOR C.R.: Distribution of transferrin, ferritin and lactoferrin in human tissues. *Journal of Clinical Pathology* 1978; 31: 316-327
5. NAGASAKO Y., SAITO H., TAMURA Y., SHIMAMURA S., TOMITA M.: Iron binding properties of bovine lactoferrin in iron rich solution. *J Dairy Sci* 1993; 76: 1876-1881
6. ABDALLAH F. B., EL HAGE CHANINE J. M.: Transferrins: iron release from lactoferrin. *J. Mol. Biol.* 2000; 303: 255-266
7. 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
8. BROCK J.H. : The physiology of lactoferrin. *Biochem. Cell Biol.* 2002; 80:1-6
9. SINGH P. K.: Iron sequestration by human lactoferrin stimulates *P. aeruginosa* surface motility and blocks biofilm formation. *Bio Metals* 2004; 17: 267-270
10. VALENTI P., BERLUTTI F., CONTE M.P., LONGHI C., SEGANTI L.: Lactoferrin functions. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 127-129

11. CONNEELY O. M.: Antiinflammatory activities of lactoferrin. *Journal of the American College of Nutrition* 2001; 20: 389-395
12. LEGRAND D., ELASS E., PIERCE A., MAZURIER J.: Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *Bio Metals* 2004; 17: 225-229
13. ZIMECKI M., SPIEGEL K., WLASZCYK A., KUBLER A., KRUZEL M. L.: Lactoferrin increase the output of neutrophil precursors and attenuates the spontaneous production of TNF- α and IL-6 by peripheral blood cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz.)* 1999; 47 (2): 113-118
14. TAKASHI TAKEUCHI, HIROSHI KITAGAWA AND ETSUMORI HARADA: Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats. *The Physiological Society* 2004; 263-270.
15. IYER S., LÖNNERDAL B.: Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *European Journal of Clinical Nutrition* 1993; 47: 232-241
16. 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
17. Příbalový leták výrobku Preventan Quatro
18. Oficiální stránky společnosti Favea: <http://www.favea-trade.cz>
19. LEO G. KEVIN, ENIS NOVALIJA AND DAVID F. STOWE: Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: The relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg* 2005; 101: 1275-1287.
20. TROJAN S. A KOL.: *Lékařská fyziologie*, Grada Praha 1999, 105-109

21. PAUL SHARP, SURJIT KAILA SRAI: Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World Journal of Gastroenterology* 2007; 13(35): 716-724.
22. KRUSZEWSKI M.: The role of labile iron pool in cardiovascular diseases. *Acta Biochimica Polonia* 2004, 51: 471-480.
23. HRADEC J., SPÁČIL J.: Kardiologie, angiologie (Vnitřní lékařství. Svazek II), Galén 2001, 61-63
24. STANĚK A KOL.: Infarkt myokardu, Avicenum Praha 1986, 18
25. SHIGETO SHIMMURA, MASARU SHIMOYAMA, MAKI HOJO, KUMIKO URAYAMA AND KAZUO TSUBOTA: Reoxygenation injury in a cultured corneal epithelial cell line protected by the uptake of lactoferrin. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1998; 39: 1346-1351.
26. PAUL F. KLAWITTER, HOLT N. MURRAY, THOMAS L. CLANTON AND MARK G. ANGELOS: Reactive oxygen species generated during myocardial ischemia enable energetic recovery during reperfusion. *American Journal Physiology-Heart Circulation Physiology* 2002; 283: 1656-1661.
27. STEPHEN J. DUFFY, ELIZABETH S. BIEGELSEN, MONIKA HOLBROOK, JUDSOND. RUSSELL, NOYAN GOKCE, JOHN H. KEANEY, JOSEPH A. VITA: Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2799-2804
28. IOANNIS A. PARASKEVAIDIS, EFSTATHIOS K. ILIODROMITIS, DEMETRIOS VLAHAKOS, DIMITRIOS P. TSIAPRAS, ATHANASSIOS NIKOLAIDIS, AIKATERINI MARATHIAS, ALKIVIADIS MICHALIS AND DIMITRIOS TH. KREMASTINOS: 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.

29. MOORE, S.A., ANDERSON, B.F., GROOM, C.R., HARIDAS, M., AND BAKER, E.N.: Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8. Å resolution, *J. Mol. Biol.* 1997; 28: 222-236.
30. MLADĚNKA P., HRDINA R., HUBL M., ŠIMŮNEK T.: The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2005; 48 (3-4): 127-135.
31. BOUCHARDY B. AND MAJNO G.: Histopathology of myocardial infarcts. *American Journal of Pathology* 1974; 74: 301- 330.
32. POVÝŠIL, STEINER ET AL.: Speciální patologie, Universita Karlova v Praze, 2007, 1. díl, 2. vydání, 430
33. LINCOVÁ D., FARGHALI H. ET AL.: Základní a aplikovaná farmakologie, Galén 2002, 84.
34. ZHANG J., KNAPTON A., LIPSHULTZ S.E., WEAVER J., HERMAN E.H.: Isoproterenol-induced cardiotoxicity in Sprague-Dawley rats: correlation of reversible and irreversible myocardial injury with release of cardiac troponin T and roles of iNOS in myocardial injury. *Toxicologic Pathology* 2008; 36: 277-288.
35. ŠKRLE J.: Účinek laktoferinu na makroskopický a mikroskopický obraz různých tkání u potkana II. Játra a ledviny, Diplomová práce, 2007.
36. DIAZ-MUNOZ M, ALVAREZ-PEREZ MA, YANEZ L, VIDRIO S, MARTINEZ L, ROSAS G, YANEZ M, RAMIREZ S, A DE SANCHEZ VC. Correlation between oxidative stress and alteration of intracellular calcium handling in isoproterenol-induced myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 2006; 289: 125-136., a Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 291-306

