

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



Diplomová práce

**Ovlivnění modelu isoprenalinového poškození myokardu potkana
vybranými látkami s kardioprotektivním potenciálem**

Autor diplomové práce: **Jana Koulová**

Vedoucí diplomové práce: **Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.**

Hradec Králové, 2012

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Jana Koulová

V Hradci Králové dne

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala vedoucímu diplomové práce panu Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za věcné poznámky a obsahové usměrňování při sepisování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat kolegům z Katedry farmakologie a toxikologie, zejména panu Mgr. Tomáši Filipskému, za poskytnutá data a cenné informace pro praktickou část diplomové práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Jana Koulová

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Název diplomové práce: Ovlivnění modelu isoprenalinového poškození myokardu potkana vybranými látkami s kardioprotektivním potenciálem.

Kardiovaskulární choroby jsou jednou z hlavních příčin úmrtnosti. K objasnění patogeneze akutního infarktu myokardu (AIM) a výzkumu kardioprotektivních látek se využívá modelové poškození myokardu laboratorního potkana navozené isoprenalinem (ISO). Tato práce hodnotila kardioprotektivní potenciál intravenózně podaného rutinu v jednorázové dávce 11,5 mg/kg na myokard potkana, kterému byla později subkutánně podána jednorázová dávka ISO (100 mg/kg). Hlavním cílem v provedeném experimentu bylo sledování funkčních, biochemických a histologických změn objevujících se v myokardu laboratorního potkana po 2 hodinách od aplikace u ISO skupiny a u skupiny rutinu s ISO. Sledované změny byly porovnávány mezi sebou a také oproti kontrolní skupině, které bylo intravenózně aplikováno pouze rozpouštědlo NaHCO_3 v jednorázové dávce 4,6 ml/kg.

Funkční parametry v podobě tepové frekvence a krevních tlaků vykazaly po 2 hodinách od aplikace předpokládaný vývoj shodný s dosud provedenými studiemi ISO. Došlo tedy ke zvýšení tepové frekvence a ke snížení krevních tlaků. Podobný vývoj nastal i u skupiny potkanů, kterým byl podán rutin s ISO. Avšak při porovnání těchto dvou skupin nebyl vývoj statisticky významný. Biochemická analýza potvrdila podobně zvýšenou hladinu troponinu T u obou zmíněných skupin se statistickou významností oproti kontrolní skupině, ale markery oxidačního stresu (vitamin E a vitamin C) nezaznamenaly signifikantní změny po podání ISO ani po podání rutinu s ISO. Výsledky byly doplněny o histologickou analýzu, ve které nebyly zjištěny odlišnosti mezi strukturou myokardu po expozici samotného ISO a strukturou po expozici rutinu a ISO.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Jana Koulová

Supervisor: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Title of thesis: Influence of selected substances with cardioprotective potential on isoprenaline induced myocardial damage in a rat model.

Cardiovascular diseases are one of the major cause of mortality. To clarify the pathogenesis of acute myocardial infarction (AMI) and to research cardioprotective substances, an isoprenaline (ISO) model of rat myocardial damage is used. This study assessed the cardioprotective potential of intravenously administered rutin in a single dose 11.5 mg / kg in the rat myocardium, which was later given a single subcutaneous dose of ISO (100 mg / kg). The aim of the experiment was to study the functional, biochemical and histological changes occurring in the rat myocardium after 2 hours from application of ISO and rutin with ISO. Observed changes were compared among themselves and also compared to the control group, which was applied intravenously with solvent NaHCO₃ in a single dose of 4.6 ml / kg.

Functional parameters as heart rate and blood pressure after 2 hours from the application were consistent with the expected development presented in studies with ISO that have been made previously. That means an increase in heart rate and reduction of blood pressure were observed. A similar development occurred in the group of rats who received rutin with ISO. However the comparison of these two groups was not statistically significant. Biochemical analysis revealed similarly elevated levels of troponin T at both of these groups with statistical significance compared to the control group, but markers of oxidative stress (vitamin E and vitamin C) have not experienced significant changes neither after administration of ISO nor after administration of rutin with ISO. The results were supplemented by histological analysis in which no differences between the structure of the myocardium after exposure of ISO and rutin with ISO were found.

Obsah

Zadání a cíl diplomové práce.....	7
Úvod.....	8
Teoretická část	9
1 Ischemie a nekróza myokardu.....	9
1.1 Metabolismus.....	9
1.2 Koronární oběh.....	10
1.3 Ischemie.....	11
1.4 Nekróza	11
1.5 Laboratorní markery.....	12
1.5.1 Kreatinkináza (CK).....	13
1.5.2 Troponiny	13
1.5.3 Myoglobin.....	14
1.5.4 Aspartátaminotransferáza (AST), Laktátdehydrogenáza (LDH), kardiospecifický izoenzym LDH1	14
1.6 Reaktivní formy kyslíku (ROS)	14
2 Katecholaminový model kardiotoxicity	17
2.1 Isoprenalinový model.....	17
2.2 Funkční a biochemické změny po aplikaci ISO.....	18
2.3 Histologické změny po aplikaci ISO.....	18
3 Isoprenalin	20
3.1 Struktura.....	20
3.2 Účinky	20
3.3 Nežádoucí účinky.....	21
3.4 Indikace.....	21
3.5 Mechanismus účinku.....	22
3.6 Metabolismus.....	22
4 Flavonoidy	23
5 Rutin.....	24
5.1 Struktura.....	24
5.2 Vlastnosti	24

5.3 Účinky	25
5.4 Metabolismus.....	25
5.5 Indikace.....	25
Praktická část.....	26
6 Metodika provedení experimentu	26
6.1 Zvířata.....	26
6.2 Použité látky	26
6.3 Přístroje.....	27
6.4 Provedení experimentu	27
7 Metodika histologické analýzy.....	29
7.1 Postup zpracování preparátů.....	29
7.1.1 Fixace	29
7.1.2 Odvodnění, projasnění, prosycení, krájení a lepení.....	29
7.1.3 Barvení, odvodnění, projasnění a zamontování.....	30
7.2 Snímání preparátů.....	32
8 Výsledky	33
8.1 Funkční parametry	33
8.1.1 Střední tlak krve.....	35
8.1.2 Systolický tlak krve	36
8.1.3 Diastolický tlak krve.....	37
8.1.4 Tepová frekvence.....	38
8.2 Biochemické markery.....	39
8.3 Histologická analýza	42
Diskuze.....	49
Závěr	52
Seznam tabulek	53
Seznam grafů.....	53
Seznam obrázků	54
Seznam použitých zkratk.....	55
Seznam použité literatury	56

Zadání a cíl diplomové práce

Na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové se ve spolupráci s Katedrou biologických a lékařských věd dlouhodobě sleduje možnost kardioprotektivního působení přírodních i semisyntetických farmak na modelové poškození myokardu dospělého laboratorního potkana isoprenalinem.

Cílem této diplomové práce je porovnání funkčních, biochemických a histologických změn myokardu potkana, kterému byl aplikován isoprenalin. Změny budou sledovány v intervalu 0–2 hodin. Získané hodnoty budou porovnány se skupinou potkanů, kterým byl aplikován rutin ještě před expozicí isoprenalinu a tak hodnocen jeho vliv na poškození myokardu. Rutin bude hodnocen ve stejných intervalech jako isoprenalin. Výsledkem tedy bude, zda má rutin přímý ochranný účinek na snížení myokardiálního poškození.

Úvod

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou nejčastější příčinou úmrtí na světě [1] [2]. KVO postihují srdce a cévy a mohou mít mnoho podob, jako jsou například vysoký krevní tlak, ischemická choroba srdeční, onemocnění srdce a mozková mrtvice. Přední místo zaujímá ischemická choroba srdeční a to ve formě infarktu myokardu (IM). IM je vážné onemocnění způsobené náhlým přerušением dodávky kyslíku do srdečního svalu s následnou nekrózou části svalových vláken.

Pro to, abychom mohli zjišťovat vliv určitých látek na myokard, se již od roku 1959 používá model nekróz myokardu vyvolaných ISO [3]. Tento model se používá na experimentální modelování nekróz, které vzniká následkem ischemie [4]. Je třeba poznamenat, že nejde o IM, ale změny struktury myokardu jsou téměř stejné [5]. Touto problematikou změn struktury myokardu vyvolaných katecholaminy se zabývají výzkumná pracoviště. A právě na tomto modelu můžeme testovat účinek kardioprotektivních látek [6] [7].

1 Ischemie a nekróza myokardu

Činnost srdce je komplexní proces, který je ovlivňován jak unikátními vlastnostmi myokardu, tak vlivy extramyokardiálními, jako jsou např. objem krve, žilní návrat nebo odpor periferních cév.

Primární silou udržující průtok krve koronárními tepnami je aortální diastolický tlak, neboť maximum průtoku je během diastoly. V koronárních tepnách jsou převážně β -adrenergní receptory, které reagují na β -adrenergní stimulaci vazodilatací. Větší koronární tepny mají ve stěně i α -adrenergní receptory a na adrenergní stimulaci reagují smíšeně.

V srdci probíhá téměř výhradně aerobní metabolismus. Je-li zastavena dodávka kyslíku do myokardu, dochází k poruše jeho mechanické funkce [8].

1.1 Metabolismus

Srdce je aerobní orgán. Anaerobní kapacita srdce je minimální a myokard je plně závislý na přívodu kyslíku.

V aerobně pracujícím myokardu jsou hlavním energetickým zdrojem mastné kyseliny, kdežto za anaerobních podmínek, např. při vzniku ischemie myokardu, se stává nejdůležitějším zdrojem energie utilizace glukózy. Při vzniku ischemie myokardu dochází k přerušení aerobního citrátového cyklu v mitochondriích a energie je získávána z anaerobní glykolýzy probíhající v buněčném cytosolu. Tento pochod je energeticky

výrazně méně přínosný. Na druhé straně však i při nedostatku kyslíku může být pomocí anaerobní glykolýzy poměrně dlouhodobě produkováno množství ATP dostačující k přežití buněk za podmínek výrazného omezení jejich mechanické aktivity.

Myokard je schopen metabolizovat glukózu, laktát, pyruvát i mastné kyseliny. Spotřeba kyslíku myokardem je hlavním regulátorem průtoku krve myokardem. Klidová spotřeba kyslíku myokardem je kolem 70 $\mu\text{l O}_2/\text{min/g}$ tkáně [9].

1.2 Koronární oběh

Koronární oběh zajišťuje zásobení myokardu metabolickými substráty (klíčová je dodávka kyslíku) a odvádění metabolických zplodin. Na dostatečném koronárním průtoku závisí tvorba a vedení vzruchu, kontraktilita i relaxace myokardu. Velmi krátce po omezení perfúze dojde k vyčerpání zásob makroergních fosfátů a kardiomyocyt není schopen obnovit normální negativní klidový membranózní potenciál (s následnými elektrofyziologickými abnormalitami), klesá nabídka ATP k fosforylaci kontraktilních proteinů (porucha kontrakce) a porušena je též funkce iontových pump (přenos intracelulárních iontů dle gradientu extracelulárně). S pokračující anaerobní glykolýzou se hromadí laktát a vzniká tkáňová acidóza a již po několika desítkách minut se objevují první známky nevratného poškození. Dojde-li ke včasnému obnovení průtoku, zabrání se vzniku nekrózy, nicméně porucha stažlivosti může ještě přetrvávat (tzv. myocardial stunning, ochromení myokardu). Důležité je, že ischemie působí též na endotelie věnčitých tepen. Porucha souhry endoteliálních působků navodí vazospastickou pohotovost, aktivaci hemostázy a útlum přirozené fibrinolýzy.

Pokles stažlivosti se projeví již při omezení perfúze o 10 až 20 %. V koronárním oběhu je již za klidových podmínek vysoká arteriovenózní diference, při zátěži tedy nelze uvolňování kyslíku výrazně zvýšit, větší metabolické nároky musejí být hrazeny zvýšeným koronárním průtokem. Koronární oběh proto musí pružně reagovat na měnící se potřeby myokardu [8].

1.3 Ischemie

Ischemie je nepoměr mezi spotřebou a dodávkou energie v oblasti myokardu s náhlým poklesem průtoku pod 20 % [10]. Je to tedy nerovnováha mezi metabolickou potřebou a možnostmi perfúze. Může být dána jak zvýšenými nároky myokardu, tak sníženým průtokem koronárním řečištěm [8]. Je vždy regionální (subendokardiální, netransmurální, transmurální) a komplexní (chybí nejen kyslík, ale i substráty a hromadí se metabolity, které mají škodlivý vliv na metabolismus s cirkulací).

Sled událostí v prvních 20 min až maximálně 40 min. je ischemie reverzibilní. Čím déle trvá, tím více buněk v centru ischemického ložiska je předurčeno k odumření [10].

Ischemie myokardu vzniká na podkladě patologického procesu v koronárním řečišti nejčastěji v důsledku aterosklerotického onemocnění koronárních tepen, ale zahrnuje i stavy, kdy nedostatečný přísun kyslíku má podklad nekoronární (sníženou transportní kapacitu krve pro kyslík, pokles perfúzního tlaku či patologicky zvýšenou metabolickou potřebu [8] [11]).

1.4 Nekróza

Po 20–40 min trvání se ischemie stává ireverzibilní. Ischemické ložisko propadne v následujících hodinách nekróze. Nekrotizace začíná v subendokardu, kde je ischemie vždy nejhlubší, a vlnovitě postupuje do subepikardu. Rozvoj nekrózy může být rychlý, dokončený během 3–6 h (60 % infarktů), nebo pomalý (6–12 h) a u menšiny infarktů vlivem extendování ještě delší [10].

Nejcitlivějším a nejspecifičtějším biomarkerem pro nekrózu myokardu se v poslední době staly troponiny T nebo I. Sérová pozitivita troponinu je odrazem nekrózy již od postižení 1 g srdeční tkáně. Jeho hladina stoupá během hodin po vzniku infarktu myokardu a zvýšená hodnota přetrvává až 10 dní. Pro diagnózu akutního infarktu myokardu postačuje za dodržení všech ostatních podmínek vzestup jedenkrát během 24 hodin nad normální hodnotu. Naproti tomu CK MB mass (množství enzymu) musí stoupat a klesat a jsou požadovány alespoň 2 po sobě jdoucí vzorky nad normální

hodnotu. Stanovení samotné CK a ani AST či LD není pro diagnostiku infarktu myokardu doporučeno. Pokud se ještě výjimečně používá, je nutné alespoň zvýšení na dvojnásobek normální hodnoty [9].

1.5 Laboratorní markery

Stanovení koncentrací tzv. kardiospecifických enzymů a proteinů pomáhají při zjišťování přítomnosti nekrózy myokardu. Z nekrotických myokardiálních buněk se uvolňuje do krve řada enzymů a stavebních proteinů, z nichž některé jsou přítomny pouze v myokardu. Již v prvních hodinách IM můžeme zjistit v plazmě proteiny uvolněné z kardiomyocytů viz Tabulka 1 [8].

Tabulka 1: Laboratorní diagnostika infarktu myokardu

	Počátek vzestupu	Maximum	Normalizace
Kreatinkináza	3–8 hodin	24–36 hodin	1.–4. den
Troponin	3–6 hodin	14–20 hodin	7.–10. den
Myoglobin	0,5–2 hodiny	5–12 hodin	8.–30. hodina

1.5.1 Kreatinkináza (CK)

CK je enzym. Stanovení aktivity CK v séru a její kardiospecifické myokardiální frakce (CK-MB) patří mezi nejspecifičtější testy pro myokard. Pro nekrózu kardiomyocytů svědčí jak zvýšení samotné CK-MB, tak poměr CK-MB:CK nad 2,5 [8]. CK má dva izoenzymy: M (v kosterních svalech) a B (v mozku). CK je přítomna v řadě orgánů a tkání. Z toho vyplývá nízká specifická samotného stanovení CK pro diagnózu akutního IM a nutnost současného stanovení jejího izoenzymu MB, který má vysokou specificku pro srdeční sval. Vzhledem k vysoké variabilitě normálních hodnot je pro diagnózu akutního IM vyžadováno minimálně dvojnásobné zvýšení plazmatické aktivity CK [12].

CK a její izoenzymy jsou lokalizovány v cytosolu svalových buněk a usnadňují pohyb vysokoenergetických fosfátů z cytosolu do mitochondrií a zpět. Frakce CK-MB je vysoce specifická pro poškození srdečního svalu, zvláště pokud nebyl porušen kosterní sval. Jelikož v procentech je zastoupení CK-MB v srdečním svalu výrazně vyšší než v kosterním svalu, je některými autory doporučováno jako diagnostické kritérium akutního IM podíl CK-MB na celkové hodnotě CK větší než 5 %. Lepším ukazatelem srdečního postižení než poměr CK-MB/CK se podle některých jeví absolutní hodnota CK-MB (CK-MB mass). Při stanovení CK-MB mass je výsledek uváděn přesněji v nanogramech/ml [12].

1.5.2 Troponiny

Jedná se o regulační proteiny, které řídí vazbu kontraktilních elementů s kalciumem. Právě toto stanovení komplexu troponinu je nejcitlivější a nejrychleji dostupné. Jednotlivé stavební podjednotky, tj. troponin T, C a I, mohou perzistovat v plazmě 1–2 týdny. Zvýšené hodnoty pomáhají odkrývat již mikroinfarkty [8].

Tyto proteiny řídí kalciumem zprostředkovanou interakci mezi aktinem a myosinem. Jsou v menší míře přítomny v cytosolu a jejich větší podíl (strukturální) je navázán na aktino–myosinový komplex. Kardiální formy těchto proteinů (cTnI resp. cTnT) jsou produkty specifických genů, které se nevyskytují jinde než v srdci. Zvýšení troponinu T a I může znamenat subakutní IM a je třeba posuzovat je současně se sta-

novením CK-MB a klinickými symptomy. Pro diagnózu akutního IM v subakutní fázi je vyžadována pozitivita troponinu T. Troponin I je naopak rozhodující pro časnou diagnózu [12].

Ukázalo se, že cTnT je vysoce specifický a citlivý biomarker poškození buněk myokardu. Je silným biomarkerem u laboratorních zvířat pro citlivou a specifickou detekci srdečních poranění způsobených z různých příčin [13].

1.5.3 Myoglobin

Myoglobin je protein méně specifický, ale rovněž rychle se uvolňující [8]. Je to další biomarker nekrózy myokardu používaný v současné době. Tento protein je nízkomolekulární s hemovým jádrem nacházející se v srdečním i skeletálním svalu. Je uvolňován během dvou hodin při vzniku akutního infarktu myokardu a zvýšení trvá po dobu 24 hodin. Stanovení plasmatické hladiny myoglobinu je velmi senzitivní v období 4–16 hodin po vzniku symptomů, normální hodnoty mohou vyloučit akutní infarkt myokardu [9].

1.5.4 Aspartátaminotransferáza (AST), Laktátdehydrogenáza (LDH), kardiospecifický izoenzym LDH1

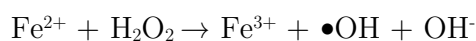
Určení těchto enzymů je méně spolehlivé, protože žádný z těchto enzymů není specifický pro myokard. Jakékoli poškození, resp. nekróza svalstva, může vést k elevaci jejich hodnot. Proto interpretace výsledků musí přihlížet k celému klinickému obrazu. Při hodnocení velikosti infarktového ložiska platí závislost mezi aktivitou enzymů a množstvím poškozených buněk [8].

1.6 Reaktivní formy kyslíku (ROS)

ROS jsou vysoce toxické vedlejší produkty aerobního metabolismu, reagují nepříznivě s okolními makromolekulami, což má za následek vážné poškození buněk a tkání. Zvýšené hladiny produktů lipoperoxidace poškozují krevní cévy, což způsobuje zvýšenou přilnavost a agregaci krevních destiček k poraněným místům [2].

Kyslíkové radikály představují nejvýznamnější třídu radikálních druhů vytvořených v živých systémech. ROS je kolektivní termín, který zahrnuje jak kyslíkové radikály a některé neradikály, která jsou oxidační činidla a/nebo jsou snadno přeměnitelné na radikály (HOCl, HOBr, O₃, ONOO⁻, O₂⁻ a H₂O₂). Všechny kyslíkové toxické druhy jsou ROS, ale ne všechny ROS jsou kyslíkové radikály. ROS mohou být vyrobeny jak z endogenních, tak z exogenních látek [14]. ROS jako je O₂⁻, H₂O₂ a •OH jsou vysoce toxické pro buňky. Buněčné antioxidační enzymy a zametači volných radikálů normálně chrání buňky od toxických účinků ROS. Nicméně když generace ROS převyšuje antioxidační obranu buněk, dochází k oxidačnímu poškození buněčných makromolekul (lipidy, proteiny a nukleové kyseliny). To nakonec vede k různým patologickým stavům. Peroxidace lipidů, oxidace proteinů a poškození DNA jsou dobře známé následky působení kyslíkových volných radikálů, což vede k buněčné patologii a nakonec k buněčné smrti [15].

Na patogenezi mnoha onemocnění včetně kardiovaskulárních chorob má významný vliv oxidační stres. Hlavní roli v rozvoji oxidačního poškození hrají ionty volného železa, které katalyzují tvorbu hydroxylových radikálů. Ty patří mezi nejreaktivnější a nejtoxičtější formy ROS [14]. Během AIM dochází k výraznému nárůstu volného železa a mědi, které jsou klíčovými katalyzátory ROS [7]. In vivo, velká část •OH pochází právě z kovu, který katalyzuje rozpad peroxidu vodíku podle Fentonovy reakce:



Jako prevence proti rozvoji oxidačního poškození tkání mohou být použity chelátory železa [14].

Oxidační stres v buňkách nebo tkáních má za následek zvýšenou tvorbu ROS a/nebo vyčerpání antioxidantů v obranném systému, čímž způsobuje nerovnováhu mezi prooxidanty a antioxidanty. Generace ROS je ve tkáních efektivně uklížena enzymatickými a neenzymatickými antioxidačními systémy. Pokles aktivity antioxidačních enzymů je v úzkém vztahu s indukcí lipoperoxidace.

Enzymy likvidující volné radikály (enzymové antioxidanty), jako je SOD, kataláza, GPx a GST jsou primární obranný systém proti oxidačnímu stresu [2].

Předpokládá se, že vitaminy C a E (neenzymové antioxidanty) pracují synergicky, aby chránily před peroxidací. Vitamin C je hlavní ve vodě rozpustný antioxidant, který může přímo uklízet singletový kyslík, superoxid a hydroxylové radikály. Byl navržen na snížení rizika kardiovaskulárních onemocnění snížením krevního tlaku, cholesterolu a vzniku oxidovaného LDL-cholesterolu [2]. Může být důležitý co-antioxidant. V určitých koncentracích a za přítomnosti přechodných kovů může mít pro-oxidační účinky, které podporují tvorbu volných radikálů [16]. Vitamin E se jeví jako nejúčinnější v tucích rozpustný antioxidant v biologickém systému. Inhibuje peroxidaci lipidů a obnovuje redukovaný vitamin C a GSH. Ochranou membrán myokardu a inhibicí oxidace lipoproteinů, vitamin E inhibuje peroxidativní poškození membrány a aterogenezi [2]. Antioxidační aktivita vitaminu E je zesílená nebo dokonce závislá na přítomnosti vhodných redukčních druhů, které jsou uvedeny jako spolu-antioxidanty [16].

2 Katecholaminový model kardiotoxicity

Zvýšené hladiny endogenních katecholaminů jsou spojeny se srdečním zraněním a mohou vyvolat akutní infarkt myokardu (AIM). Ve skutečnosti je syntetický katecholamin ISO často používán k navození patologického stavu v mnoha ohledech podobných AIM. Mechanismus kardiotoxicity katecholaminů není zcela objasněn, ale zahrnuje nadměrné stimulace adrenergických receptorů a oxidativní stres. I relativně malé dávky ISO mohou způsobit ischemii myokardu, která je spojena s výrazným zvýšením volného železa a mědi, které jsou následně propuštěny do oběhu a podporují oxidační stres [7].

2.1 Isoprenalinový model

Model nekróz myokardu vyvolaných ISO se začal používat od roku 1959, kdy se zjistilo, že vysoké dávky ISO, podávané podkožně, vyvolávají nekrózu myokardu u potkanů [3]. Od té doby se tento model používá na vyvolání experimentálních lézí myokardu [5]. ISO indukovaný model by mohl být rozšířen pro jeho jednoduché ovládání, nízké náklady a reprezentativní patofyziologické změny [17].

Časový odstup 24 hodin od podání jedné injekce ISO až po usmrcení potkanů je nejvhodnější na vyhodnocování. Rozsah a závažnost lézí se dále nestupňuje, ale naopak po 48 hodinách se začíná vyrovnávat. Rozsah nekróz se dosáhne již po jednorázové dávce 25 mg/kg ISO. Dalším zvyšováním dávky ISO ani opakováním dávky (2·25 mg/kg, případně 2·50 mg/kg) se jeho nekrotický účinek nepotencuje. Naopak vzniká určitá odolnost myokardu proti této látce. Tedy jednou nebo několika malými dávkami ISO můžeme myokard uchránit před nekrotizujícím účinkem této látky.

Nekróza myokardu vzniká asi po hodinovém účinku ISO, kterým se vyvolá ischemie srdečního svalu a vznik dalších mechanismů zapříčiňující isoprenalinové kardiomyopatie. Dynamiku jemných změn postižených buněk myokardu (změny mitochondrií, myofibril, sarkoplazmatického retikula) od začátku ischemie až po zjevení se histologicky zjištěných nekróz můžeme zkoumat elektronovým mikroskopem [5].

2.2 Funkční a biochemické změny po aplikaci ISO

Zde jsou uvedeny vybrané změny, ke kterým dochází po podání ISO. Tyto změny se běžně využívají pro detekci myokardiálního poškození. Některé laboratorní markery a látky byly již zmíněny v rámci teoretické části této diplomové práce.

Po aplikaci ISO je první událost sledována již po 2 minutách od podání. Dochází ke zvýšení tepové frekvence a snížení diastolického a systolického krevního tlaku, čímž se vyvolá funkční hypoxie, která může vyústit v IM.

Časné změny zvýšených intracelulárních Ca^{2+} iontů a jejich následky jsou rozhodující při kardiotoxicitě ISO. Dlouhotrvající hypoxie a inotropní účinek ISO na srdeční sval pravděpodobně způsobí, že oxidační stres a zvýšení Ca^{2+} by mohly být zapojeny do mechanismu IM vyvolané ISO.

Oxidační stres je hodnocen studiem peroxidace lipidů, volných radikálů, antioxidačních enzymů a glutathionovým systémem. Dochází ke zvýšení ROS a snížení antioxidační obrany [18]. Plazmatické hladiny produktů lipoperoxidace, jako je malondialdehyd (MDA), je používán jako ukazatel bazálního oxidačního stavu [19].

2.3 Histologické změny po aplikaci ISO

Účinek ISO na strukturální integritu buněk je polyfaktoriální. Mezi dva nejvýznamnější faktory patří vliv primární hyperfunkce srdce následkem pozitivně inotropního a chronotropního účinku ISO a vliv ischemie myokardu.

Následkem primární hyperfunkce srdce v přežívajících buňkách myokardu vznikají tyto změny: myofibrily se zvětší v kontrahovaném stavu, často se vyskytují kontrakční svazky myofibril, mitochondrie jsou částečně, resp. nadměrně hydratované. Hydrataci mitochondrií je možné vysvětlit úbytkem ATP pro nadměrnou spotřebu při hyperfunkci srdce, čím se mitochondrie relaxují a absorbují vodu. S primární hyperfunkcí srdce pravděpodobně souvisí rozšíření sarkoplazmatického retikula.

Ischemií vznikají ostatní změny – edém základní sarkoplazmy, homogenizace krist mitochondrií a myofilamentů, degenerace mitochondrií, cytolýza a nekróza.

V myokardu se nacházejí buňky se širokou škálou kvalitativních změn – od normálních buněk až po buňky s degenerativními změnami a buňky s cytolýtickými místy, které tvoří kvalitativní hranici přechodu do nekrózy.

Po 30 minutách od aplikace ISO se v buňkách myokardu zřetelně zmnoží tukové kapky, zároveň mizí velká část glykogenových granul. Ribozomy a mitochondrie jsou v tomto čase ještě nezměněné. Myofibrily jsou převážně v kontrahovaném stavu, místy můžeme vidět kontrahované svazky myofibril.

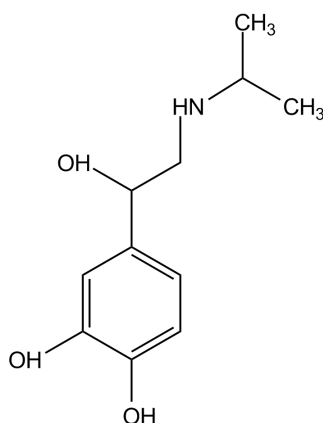
Po 2 hodinách od aplikace ISO se již struktura myokardu výrazně mění, ale histologicky ještě nemůžeme zjistit nějaké změny. Mitochondrie se degenerativně mění, vznikají velká místa cytolýzy. Na myofibrilách nacházíme často kontrahované svazky i ohniskové degenerace.

Po 24 hodinách od podání ISO jsou změny struktury myokardu v plném rozvoji, na vrcholu. Nápadným nálezem jsou kontrahované svazky myofibril, častá je homogenizace myofilamentů v myofibrilách. Mitochondrie většinou nejsou zduřené, místy však můžeme najít skupiny zduřených mitochondrií s tendencí k lýze obalových membrán a prasknutí. Vyskytuje se také lamelární degenerace mitochondrií. V některých mitochondriích můžeme najít malá tělíška podobná myelinu. Základní sarkoplazma je převážně hydratovaná, často až edematózně. Vyskytují se relativně rozsáhlá místa cytolýzy, která přecházejí do nekrotických celých buněk myokardu. Buňky se liší stupněm poškození. Jsou tu buňky dobře zachovalé bez výraznějších změn, část zachovalých buněk, ale s více příznaky degenerace až po vznik cytolýtických míst a nekrotických. V dobře zachovalých buňkách je mnoho parciálně hydratovaných mitochondrií, často byly nalezeny ve stádiu příčného dělení. Méně často se v tomto čase zaznamenala degenerace nebo edematózně zduřené mitochondrie. Sarkoplazmatické retikulum bylo nejrůzněji vakuolovitě nebo vřetenovitě rozšířené. Mnoho buněk bylo infiltrováno tukem. V tomto čase jsme zaznamenali již některé příznaky začínajícího se organizování nekrotických ložisek, do kterých pronikaly fibroblasty a endotelie [5].

3 Isoprenalin

Isoprenalin (isoproterenol), patřící mezi katecholaminy, je léčivo s β -sympatomimetickým účinkem [20]. Je to syntetická látka s neselektivním působením na receptory β (β_1 i β_2) a s nevýznamným účinkem na receptory α [21]. Způsobuje závažný oxidační stres v myokardu, což vede k nekróze srdečního svalu podobné infarktu [2].

3.1 Struktura



Obrázek 1: Isoprenalin

Isoprenalin (ISO) má na aminoskupině vázán isopropylový zbytek. Látky s vyšším alkylem než ethylem vázaným na aminoskupině, mají podstatně zvýšenou afinitu k β -receptorům a jejich α účinky jsou zpravidla zanedbatelné [22].

3.2 Účinky

Na srdce působí prakticky stejně silně jako adrenalin. Po infúzi ISO dochází ke snížení periferního odporu, především vazodilatace v kosterních svalech [21]. Působí pozitivně chronotropně a inotropně, a protože téměř výlučně aktivuje beta receptory, je účinný vazodilatátor. Jeho účinky vedou k značnému vzestupu srdečního výkonu provázené poklesem diastolického a středního arteriálního tlaku a k menšímu poklesu nebo lehkému vzestupu systolického tlaku [23]. Zlepšuje převod elektrických signálů

srdce [20]. Přehled působení na adrenergí receptory shrnuje Tabulka 2. Srdeční výdej je zvýšen a zvyšuje se spotřeba kyslíku myokardem [21].

Dříve byl také využíván jako účinné bronchodilatans [23].

Tabulka 2: Adrenergí receptory

α_1 -receptor	α_2 -receptor	β_1 -receptor	β_2 -receptor
vazokonstrikce cév (kůže, sliznice)	vazokonstrikce cév	↑ síly stahu srdce	dilatace bronchů
bronchokonstrikce	↓ vyplavování NA	↑ srdeční frekvence	dilatace děložního svalstva
↓ motility a tonu trávicího ústrojí	↓ sekrece inzulínu v pankreatu	↑ rychlosti vedení v srdci	dilatace cév
glykogenolýza v játrech		↑ sekrece reninu v ledvinách	↓ aktivita GITu
			glykogenolýza v játrech
			↑ sekrece inzulínu

3.3 Nežádoucí účinky

Kardiální účinky mohou vést k tachykardii, palpitacím a ke koronární insuficienci [21]. V extrémních případech vyvolává poruchy srdečního rytmu [20]. Velké dávky ISO (stejně jako dlouhodobá infúze noradrenalinu – NA) mohou vést k poškození cév a vyvolat nekrózu myokardu. ISO je rozkládán pomaleji než přirozené neurotransmitery sympatiku, a působí proto déle [21].

3.4 Indikace

ISO je lék užívaný k podpoře a zlepšení krevního oběhu. Je indikován při závažné bradykardii neodpovídající na terapii atropinem [8]. Ojedinele se podává intravenózně při náhlých a vážných poruchách srdce [20]. Někdy se využívá v akutní medicíně jako dočasné kardiostimulans (tj. před zavedením kardiostimulátoru – i. v. infúzí) při kardiopulmonální resuscitaci (srdeční zástava, síňo-komorové blokády vyššího stupně

nereagující na atropin, Adamsův–Stokesův syndrom, šokové stavy např. po kardiochirurgických zákrocích) [21].

Dříve se užíval i jako bronchodilatans, ale pro vysoké riziko kardiálních nežádoucích účinků, především tachyarytmií, se dnes již v této indikaci neužívá [21].

3.5 Mechanismus účinku

Základní mechanismus účinku ISO na myokard je vysvětlován rozporem mezi zvýšenou potřebou kyslíku, protože myokard vykonává větší práci a na druhé straně menším množstvím dodaného kyslíku následkem periferní vazodilatace a spazmu koronárních cév [5]. Zjistilo se, že už 30 minut po jednorázové dávce 25 mg/kg ISO vzniká v srdci pokusných zvířat v důsledku kontrakce koronárních cév ischemie [24].

3.6 Metabolismus

Biologický poločas ISO se pohybuje v rozmezí jedné až několika minut. Metabolizace katechol-O-methyltransferázou na methylované deriváty (zejména 3-O-methylisoprenalin) probíhá pomaleji než u přirozených mediátorů sympatiku. Odehrává se v játrech, plicích i jiných tkáních. Tyto deriváty jsou však jen málo aktivní a společně s nemetabolizovaným isoprenalinem se do 24 hodin vyloučí močí ve formě sulfátových konjugátů [25].

4 Flavonoidy

Flavonoidy jsou skupinou polyfenolických sloučenin různého chemického složení a vlastností [2]. Patří mezi nejhojnější antioxidanty, které se vyskytují v běžné stravě. V potravinách bylo zjištěno více než 4000 různých flavonoidů. Hlavními zdroji jsou jablka, cibule, borůvky, čokoláda, červené ovoce, citrusové plody, ořechy a nápoje jako je čaj, pivo a víno [26]. Strava bohatá na přírodní antioxidanty je spojena s nižším rizikem výskytu srdečních onemocnění [13].

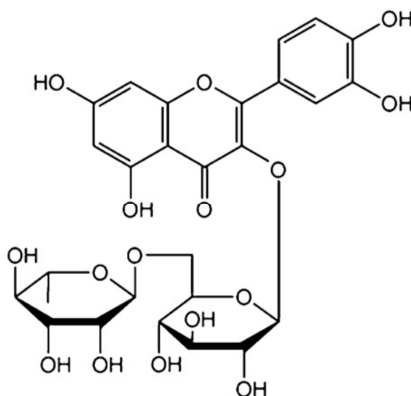
Jsou to přirozeně se vyskytující sekundární metabolity rostlin. V posledních desetiletích byly rozsáhle zkoumány, protože se tvrdilo, že mají antioxidantní, protizánětlivé, antialergické, antidiabetické, kardio-, hepato- a gastroprotektivní, antivirové a anti-neoplastické vlastnosti [27]. Tyto navrhované pozitivní farmakologické aktivity byly většinou přičítány chelatačním účinkům a schopnosti flavonoidů likvidovat volné radikály darováním atomu vodíku [7]. Mohou ničit volné hydroxylové a peroxylové radikály a mohou reagovat se superoxidem přes transfer jednoho elektronu [28].

Existuje velké množství důkazů, které vyplývají z epidemiologických studií, že dlouhodobé podávání flavonoidů může snížit, nebo alespoň mají tendenci ke snížení výskytu kardiovaskulárních chorob a jejich následků. Avšak výsledky z těchto studií musí být interpretovány s velkou ostražitostí. To platí zejména, pokud chybí informace týkající se současné farmakoterapie nebo další faktory, jako je příjem vitamínů, současné choroby nebo kouření [26].

5 Rutin

Rutin (rutosid, quercetin-3-rutinosid) je přírodní flavonoidní glykosid [21] [7].

5.1 Struktura



Obrázek 2: Rutin

5.2 Vlastnosti

Rutin je prakticky nerozpustný ve vodě. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů [29]. Velmi jemné částice lyofilizovaného rutinu mohou být kompletně dispergovány ve vodě [30]. Proniká do buněk v malém rozsahu. Pravděpodobně kvůli jeho hydrofilicitě a následné zanedbatelné rozpustnosti v membránách erytrocytů. Hydrofilní charakter rutinu může představovat základ pro rozlišování mezi jeho účinky a účinky lipofilního aglykonu-quercetinu, který proniká lipofilními bariérami [28]. Rutin se zdá být více aktivní v inhibici oxidativního poškození v hydrofilním okolí, zatímco quercetin v lipofilním. Kromě toho lipofilita koreluje s ochrannými antioxidačními účinky polyfenolů [7] [31].

5.3 Účinky

Rutin likviduje volné radikály a chelatuje železo a měď. Proto může být užitečný při snížení kardiotoxicity katecholaminů, jak bylo dříve prokázáno po jeho dlouhodobém perorálním podání [7]. Brání peroxidaci lipidů. Stabilizuje membrány [32] a snižuje permeabilitu stěny vén a kapilár [21]. Jsou hlášeny i účinky na imunitní a zánětlivé buněčné funkce a dokonce i účinky antikarcinogenní [33] [34] [35].

5.4 Metabolismus

Klinické a experimentální studie jasně doložily, že rutin je štěpen ve slepém střevě na různé metabolity střevními bakteriemi a není absorbován jako původní látka. Není zcela zřejmé, zda lze příznivý účinek připsat přímo rutinu, jeho metabolitům, a nebo přizpůsobením některých dalších změn [7].

5.5 Indikace

Jako jiné flavonoidy má i rutin chelatační a antioxidační aktivitu. Na základě známého patologického mechanismu se jeví jako užitečný lék ke snížení kardiotoxicity katecholaminů [7]. Rutin je obecně používán jako venotonikum [21].

6 Metodika provedení experimentu

6.1 Zvířata

K experimentu bylo použito 9 dospělých potkaních samců kmene Wistar (Biotest s.r.o., ČR). Potkani byli umístěni v klecích ve speciální klimatizované místnosti s pravidelnými cykly světlo – tma po dobu dvou týdnů. Během tohoto období měli potkani volný přístup ke standardní peletizované stravě pro hlodavce a k pitné vodě. Po aklimatizační době, byli zdraví potkani o hmotnosti 362-480 g použiti pro experiment a náhodně rozděleni do 3 skupin.

Studie byla povolena Etickou komisí Karlovy Univerzity v Praze, Farmaceutické Fakulty v Hradci Králové.

6.2 Použité látky

Při provádění experimentu modelového poškození ISO byly použity tyto látky:

- Uretan (Sigma-Aldrich, USA)
- Heparin (Zentiva, Czech Republic)
- Fyziologický roztok (Braun, Germany)
- Isoprenalin (Sigma-Aldrich, USA)
- KCl (Sigma-Aldrich, USA)
- NaHCO₃ (Lachema, Czech Republic)
- cTnT (Elecsys 2010, Roche Diagnostics)
- Vitamin C
- Vitamin E

6.3 Pístroje

Při provádění experimentu modelového poškození ISO byly použity tyto pístroje:

- Tlakový snímač MLT0380/D (AdInstruments, Australia)
- PE katetr (0.5/1.0 mm naplněný heparinizovaným fyziologickým roztokem 50 IU/ml)
- Tlakově-objemový mikromanometrový katetr (Millar pressure-volume catheter SPR-838 2F, 4E, 9mm, Millar Instruments Inc., USA)
- EKG končetinové svody II MLA1215 (AdInstruments, Australia)
- PowerLab se softwarem LabChart 7 (AdInstruments, Australia)
- Elecsys Troponin T STAT Immunoassay (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)
- HPLC systém HP1050 (Hewlett Packard, Německo)

6.4 Provedení experimentu

Zvířata byla rozdělena do tří skupin: kontrolní (KS), isoprenalinové (ISO) a rutinové (RUI). Po 12ti hodinovém lačnění byli potkani znecitlivěni intraperitoneální injekcí obsahující vodný roztok uretanu v dávce 1,2 g/kg.

Levá kyčelní tepna byla připojena k tlakovému snímači prostřednictvím PE katetru. Tlakově-objemový mikromanometrový katetr byl vložen do levé srdeční komory přes pravou karotidu. Jak tlakový snímač, tak tlakově-objemový katetr se subkutánními elektrodami pro EKG končetinové svody byly připojeny k pístroji PowerLab.

Následujících 15 minut ustavování rovnováhy byla kalibrace paralelního objemu potřebná pro odhad skutečného objemu krve v levé komoře, prováděna 20 μ l 25% w/w roztoku NaCl s 900 IU/ml heparinu – hypertonická kalibrace.

Pět minut po kalibraci byla kontrolní skupině provedena intravenózní aplikace 4,6 ml/kg NaHCO_3 . Isoprenalinové skupině byla provedena intravenózní aplikace NaHCO_3 4,6 ml/kg + po 5 minutách subkutánně aplikován ISO v dávce 100 mg/kg. Rutinové skupině byl nejprve intravenózně aplikován rutin v dávce 11,5 mg/kg, poté rozpouštědlo NaHCO_3 2,3 ml/kg + po 5 minutách subkutánně ISO v dávce 100 mg/kg.

Hemodynamické a EKG monitorování pokračovalo po dobu 2 hodin od podání léku. Po 2 hodinách byla provedena dodatečná kalibrace hypertonickým fyziologickým roztokem. Na konci experimentu byl odebrán vzorek krve z břišní aorty do heparinizované zkumavky (170 IU/10ml) a vodivostní signál byl kalibrován za použití kyvet se známými objemy.

Po experimentu byla všechna zvířata, která přežila, bezbolestně usmrcena v anestezii intravenózní aplikací 1 ml 1M vodného roztoku KCl. Srdeční komory byly odstraněny, zváženy a zmrazeny na -20 °C. Každý vzorek byl označen číslem, pod kterým byl zaevidován. Tyto preparáty byly poté použity pro histologickou analýzu.

Sledovány byly tyto funkční parametry: střední tlak krve, systolický tlak krve, diastolický tlak krve a tepová frekvence.

Stanovení biochemických hodnot proběhlo ve spolupráci s Ústavem klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové (ÚKBD FN HK)

Srdeční troponin T (cTnT, stanovený v $\mu\text{g/l}$), vitamin E (mmol/l) a vitamin C (mmol/l) byly měřeny v séru. Koncentrace cTnT byla stanovena elektrochemiluminiscenční imunoanalýzou pomocí setů Elecsys Troponin T STAT Immunoassay na analyzátoru Elecsys 2010. Tento test zaměstnává dvě monoklonální protilátky specificky zaměřené proti cTnT. Analýza vitaminu E (α -tokoferol) byla po deproteinaci provedena pomocí HPLC s fluorimetrickou detekcí. Stanovení vitaminu C (kyselina askorbová) bylo po deproteinaci biologického materiálu provedeno pomocí kapilární elektroforézy (CE).

7 Metodika histologické analýzy

Tkáň odebraná pro histologické vyšetření musí být nejprve označena číslem, pod kterým je vzorek evidován. Po označení je odebraný materiál dále zpracováván. Tento postup zahrnuje fixaci odebrané tkáně, její odvodnění, projasnění, prosycení, zalití do parafinu, krájení na mikrotomu, lepení řezů na podložní sklíčka, barvení, zamontování do montovacích médií a následné pozorování a hodnocení zhotovených preparátů pod mikroskopem.

7.1 Postup zpracování preparátů

7.1.1 Fixace

Fixace se provádí z důvodu zabránění samovolnému rozkladu tkáně (autolýze) podmíněného působením enzymů. Podstatou fixace je rychlé vysrážení bílkovin protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky. Tyto prostředky musí splňovat 3 základní požadavky: musí umožnit zachování co nejlepší struktury tkáně, musí být schopny do tkáně rychle pronikat a musí zachovat barvitelnost tkáně.

Tkáň resp. vzorek tkáně je nutno vložit do fixační tekutiny co nejrychleji po odebrání. U celých orgánů se fixační roztok aplikuje přímo do cév. V tomto experimentu byl pro fixaci použit 4% paraformaldehyd rozředěný PBS. Minimální doba fixace je 24 hodin (záleží na velikosti vzorku)

7.1.2 Odvodnění, projasnění, prosycení, krájení a lepení

Odvodnění bylo provedeno pomocí vzestupné alkoholové řady a acetonu. Doba trvání je 6–24 hodin.

Projasnění se provádí za účelem odstranění etanolu, ve kterém se později použítý parafin nerozpouští. K tomuto kroku byl použit xylen. Ten je vhodný z důvodu jeho mísitelnosti s etanolem a zároveň schopnosti rozpouštět parafin. Doba trvání je 1–6 hodin.

Poté byl vzorek prosycen parafinem (teplota parafinu nesmí překročit 58 °C) a následně byl do tohoto nejčastěji používaného zalévacího média zalit. Z těchto parafinových bločků byly pomocí automatického sáňkového mikrotomu typu LEICA DSC 1 připraveny podélné a příčné histologické řezy srdečních komor o tloušťce 2–5 µm. Ty byly poté přeneseny do kapky vody na podložním sklíčku, které bylo již předem potřeno směsí glycerolu a bílku, aby se řez na sklíčko přilepil a zůstal fixován pro další zpracování. Doba trvání je 1–3 hodiny.

7.1.3 Barvení, odvodnění, projasnění a zamontování

Jelikož se k barvení histologických preparátů používají většinou vodné roztoky barviv, bylo třeba řezy před barvením odparafinovat postupem xylen – sestupná alkoholová řada – destilovaná voda. Po vlastním barvení se řezy odvodní vzestupnou alkoholovou řadou a projasní xylenem.

Pro zvýraznění buněčných struktur byly v tomto experimentu využity dva typy barvení: Hematoxylin s eosinem a zelený trichrom podle Goldnera.

1. Hematoxylin a eosin (H-E)

Hematoxylin s eosinem se používají jako nejčastější a základní barvení pro světelnou mikroskopii. Hematoxylin je zásadité barvivo barvící kyselé (bazofilní) buněčné struktury. Eosin je naopak barvivo kyselé, ke kterému mají výraznou afinitu zásadité komponenty buněk.

Výsledkem postupu barvení pomocí H-E jsou:

- Jádra buněk zbarvená modře
- Kolagenní vazivo zbarvené růžově
- Svalovina zbarvená červeně

Roztok hematoxylinu byl připraven z: hematoxylinu, jodičnanu sodného, síranu hlinitého, destilované vody, ethylenglykolu a kyseliny octové. Eosin byl použit ve formě svého 1% roztoku v destilované vodě.

Proces barvení zahrnoval hematoxylin, pramenitou vodu, poté byla sklíčka otřena. Pak následoval eosin a nakonec bylo sklíčko opláchnuto destilovanou vodou.

Po vlastním barvení bylo provedeno odvodnění. Nejprve dvojitým opláchnutím v 96% ethanolu, poté aplikováním ethanolu a xylenu v poměru 2:1 a nakonec aplikováním ethanolu a xylenu v poměru 1:2.

K projasnění byl použit xylen, do kterého byly preparáty ponořeny třikrát po sobě na dobu 3 minut. Posledním krokem vedoucím ke vzniku preparátu bylo zamontování obarvených řezů do kanadského balzámu.

2. Zelený trichrom podle Goldnera

Vedle základního barvení preparátů pomocí H-E bylo využito ještě barvicí metody zeleným trichromem podle Goldnera. Výhodou tohoto barvení je zvýraznění struktur, které nejsou při klasickém barvení jasně patrné nebo mohou být zastíněny.

Výsledkem postupu barvení pomocí zeleného trichromu jsou:

- Kolagenní vazivo obarvené zeleně
- Jádra obarvená modře
- Svalovina obarvená cihlově červeně
- Erytrocyty obarvené oranžově
- Hyalinní vazivo obarvené červeně

Roztok Goldner I:

ponceu de xyloidin, koncentrovaná kyselina octová, destilovaná voda, oranž G, Fuchsin S.

Roztok Goldner II:

byl připraven jako 1% vodný roztok kyseliny fosfowolframové.

Roztok Goldner III:

světlá zeleň, kyselina octová ledová, destilovaná voda.

Postup barvení byl proveden v následujících krocích:

- 1) První krok zahrnoval odparafinování zhotovených řezů, které proběhlo stejným způsobem jako před barvením H-E (viz výše).
- 2) Po odstranění parafinu byly řezy ponořeny na 4 minuty do roztoku Hematoxylinu.
- 3) Poté byly opláchnuty v 70% alkoholu a diferencovány v kyselém alkoholu.
- 4) Následovalo opláchnutí pod tekoucí vodou (modření).
- 5) Dalším krokem bylo vložení řezů do roztoku Goldner I. na 10 minut s následným oplachem destilovanou vodou.
- 6) Do roztoku Goldner II. byly řezy ponořeny také na dobu 10 minut a poté opět opláchnuty v destilované vodě.
- 7) Goldner III. byl aplikován jako v předchozích dvou případech po dobu 10 minut a znovu následoval oplach destilovanou vodou.
- 8) Nakonec byly řezy odvodněny a zamontovány do Solakrylu.

7.2 Snímání preparátů

Histologické preparáty byly pozorovány pomocí mikroskopu OLYMPUS AX-70 (Olympus Ltd., Japonsko), snímány kamerou ProgRes CT3 (Jenoptik, Německo) a zpracovány pomocí zobrazovacího programu NIS –ELEMENTS AR 3.2.

8 Výsledky

Byly sledovány následující tři skupiny potkanů, každé skupině byly aplikována odlišná sada látek:

- Skupina KS – i.v. aplikace NaHCO_3 4,6 ml/kg (kontrolní skupina)
- Skupina ISO – i.v. aplikace NaHCO_3 4,6 ml/kg + po 5 min s.c. aplikace isoprenalinu 100mg/kg
- Skupina RUI – i.v. aplikace rutinu 11,5 mg/kg, NaHCO_3 2,3 ml/kg + po 5 min s.c. aplikace isoprenalinu 100mg/kg

8.1 Funkční parametry

Byly sledovány následující funkční parametry:

- střední tlak krve
- systolický tlak krve
- diastolický tlak krve
- tepová frekvence.

Získané experimentální hodnoty shrnuje Tabulka 3.

Tabulka 3: Experimentální data funkčních parametrů.

Řada	Potkan	Čas [min]	střední tlak krve [mmHg]	systolický tlak krve [mmHg]	diastolický tlak krve [mmHg]	tepová frekvence [tep/min]
KS	KS 4	0	86	109	73	335
		120	75	105	57	408
	KS 5	0	80	85	75	339
		120	63	66	60	418
	KS6	0	93	119	69	384
		120	100	126	73	485
ISO	ISO 1	0	103	125	87	369
		120	40	47	32	499
	ISO 5	0	118	125	110	429
		120	38	43	33	590
	ISO7	0	89	101	77	517
		120	49	54	44	584
RUI	RUI 114	0	71	97	56	509
		120	53	63	45	603
	RUI 116	0	97	117	81	356
		120	37	49	30	540
	RIU 117	0	100	124	82	461
		120	62	79	49	543

Pro každou skupinu byly dále spočteny průměrné hodnoty a chyby průměru jednotlivých funkčních parametrů pro časy 0 a 120 minut. Tyto hodnoty shrnují tabulky 4–7.

Získané údaje jsou dále názorně prezentovány v grafech 1–4. Každý z grafů obsahuje funkční parametry pro všechny 3 skupiny na začátku experimentu (v čase 0 minut) a na konci experimentu (v čase 120 minut).

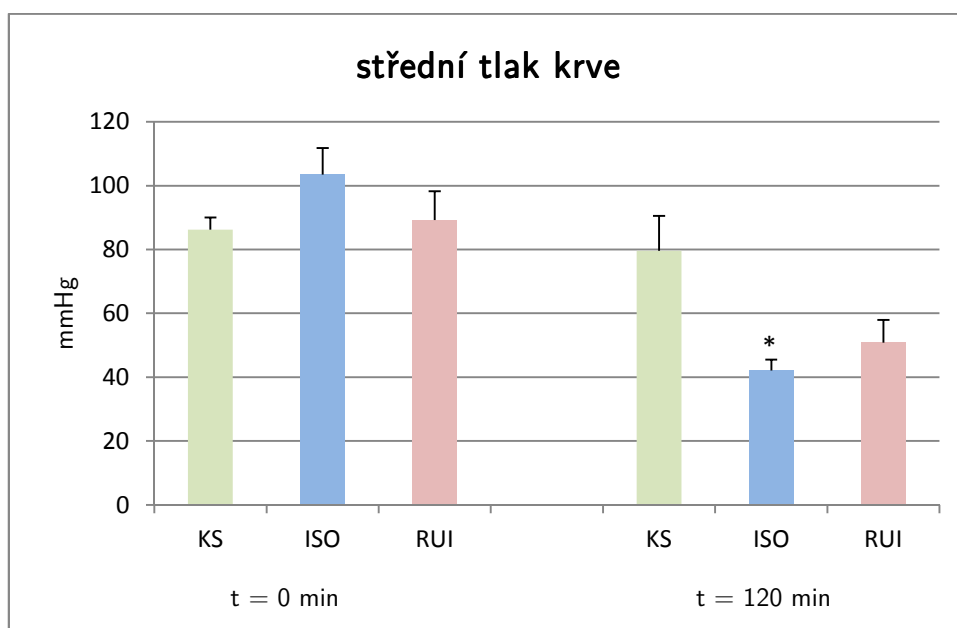
K výpočtu statistických hodnot funkčních parametrů a ke zpracování grafů byl použit program GraphPad a jeho statistická metoda two-way ANOVA.

8.1.1 Střední tlak krve

Tabulka 4: Střední tlak krve – průměrné hodnoty a chyba průměru (S.E.)

Čas	Průměr						S.E.					
	t = 0 min			t = 120 min			t = 0 min			t = 120 min		
	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI
střední tlak krve [mmHg]	86,2	103,4	89,2	79,6	42,1	50,8	3,8	8,3	9,0	11,0	3,4	7,1

Graf 1: Závislost středního tlaku krve na čase



Statistická významnost odlišnosti průměrů středního tlaku krve.: KS vs. ISO při 120 min, $P < 0,05$; ostatní nevýznamné.

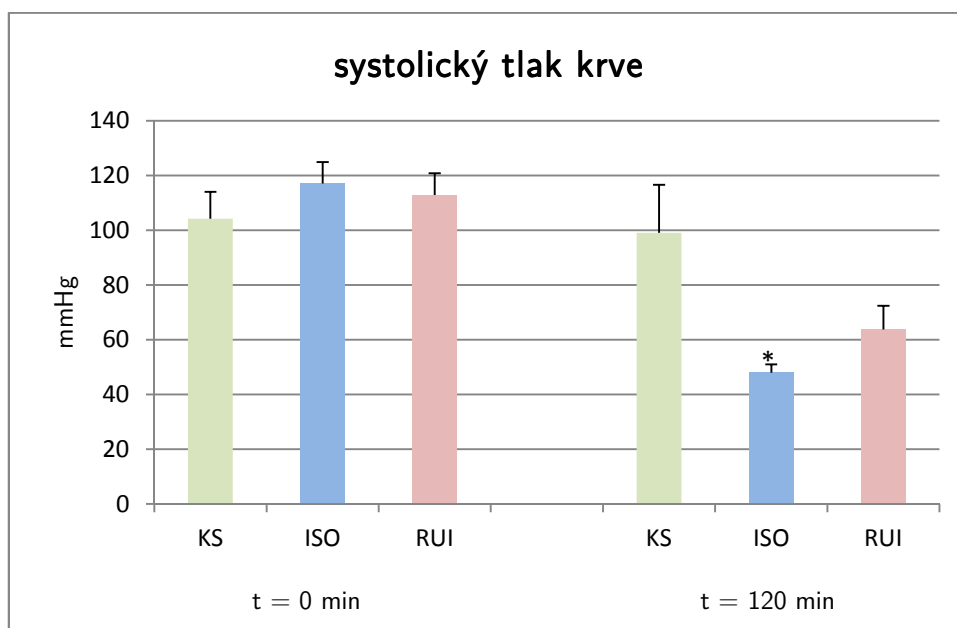
U skupin ISO a RUI došlo po uplynutí 2 hodin od aplikace ke znatelnému snížení středního tlaku krve oproti stavu před aplikací. Pokles tlaku u ISO a RUI byl výrazný i proti KS skupině po 2 hodinách od aplikace, a to v případě ISO statisticky významně.

8.1.2 Systolický tlak krve

Tabulka 5: Systolický tlak krve – průměrné hodnoty a chyba průměru (S.E.).

Čas	Průměr						S.E.					
	t = 0 min			t = 120 min			t = 0 min			t = 120 min		
	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI
systoli.tlak krve [mmHg]	104,2	117,0	112,8	99,0	48,0	63,8	9,9	7,8	8,0	17,5	3,0	8,6

Graf 2: Závislost systolického tlaku krve na času



Statistická významnost odlišnosti průměrů: KS vs. ISO při 120 min, $P < 0,05$; ostatní nevýznamné

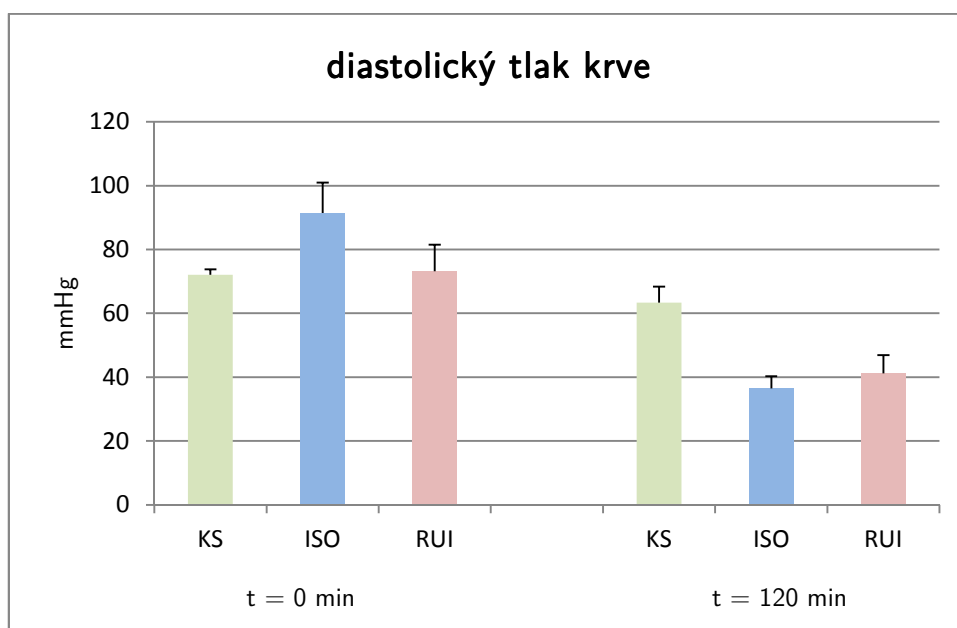
U skupin ISO a RUI došlo po uplynutí 2 hodin od aplikace ke znatelnému snížení systolického tlaku krve oproti stavu před aplikací. Pokles tlaku u ISO a RUI byl výrazný i proti KS skupině po 2 hodinách od aplikace, a to v případě ISO statisticky významně.

8.1.3 Diastolický tlak krve

Tabulka 6: Diastolický tlak krve – průměrné hodnoty a chyba průměru (S.E.).

Čas	Průměr						S.E.					
	t = 0 min			t = 120 min			t = 0 min			t = 120 min		
	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI
diastolický tlak krve [mmHg]	72,1	91,4	73,2	63,4	36,4	41,2	1,7	9,5	8,4	4,9	3,8	5,7

Graf 3: Závislost diastolického tlaku krve na času



Statistická významnost odlišnosti průměrů: neprokázána.

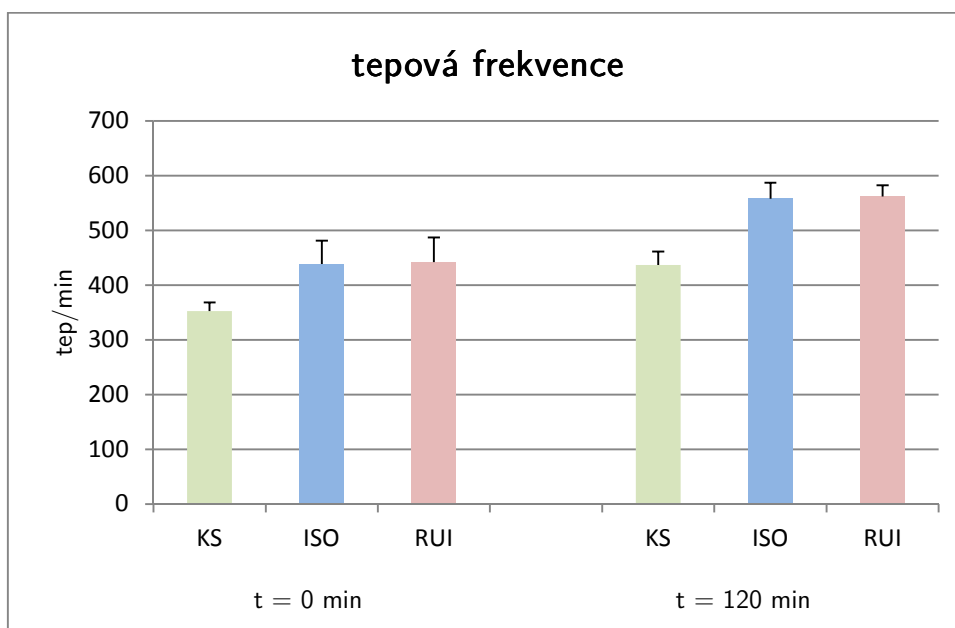
U skupin ISO a RUI došlo po uplynutí 2 hodin od aplikace ke znatelnému snížení diastolického tlaku krve oproti stavu před aplikací. Pokles tlaku u ISO a RUI byl výrazný i proti KS skupině po 2 hodinách od aplikace, statistická významnost však prokázána nebyla.

8.1.4 Tepová frekvence

Tabulka 7: Tepová frekvence – průměrné hodnoty a chyba průměru (S.E.).

Čas	Průměr						S.E.					
	t = 0 min			t = 120 min			t = 0 min			t = 120 min		
	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI
tepová frekvence [tep/min]	352,7	438,3	442,0	437,0	557,7	562,0	15,7	43,0	45,2	24,2	29,4	20,5

Graf 4: Závislost tepové frekvence na času



Statistická významnost odlišnosti průměrů: neprokázána.

Nárůst tepové frekvence po 2 hodinách od aplikace je téměř stejný u ISO i RUI skupiny. V porovnání s hodnotami v čase 0 došlo k nárůstu tepové frekvence u všech skupin včetně kontrolní KS. Statistická významnost v čase 2 hodiny nebyla prokázána.

8.2 Biochemické markery

Biochemické markery, tedy srdeční troponin T (cTnT), vitamin E a vitamin C byly měřeny v séru v čase 120 minut. Tabulka 8. obsahuje naměřené experimentální údaje. Pro každou skupinu byly dále spočteny průměrné hodnoty a chyby průměru jednotlivých markerů, tyto parametry shrnuje Tabulka 9.

Tabulka 8: Experimentální data biochemických markerů.

Řada	Potkan	cTnT [$\mu\text{g/l}$]	vitamín E [mmol/l]	vitamín C [mmol/l]
KS	KS 4	0,786	14,90	78,68
	KS 5	0,944	7,4	52,80
	KS 6	1,39	7,05	97,80
ISO	ISO 1	13,89	17,78	52,70
	ISO 5	9,28	10,38	79,70
	ISO 7	12,38	11,48	107,78
RUI	RUI 114	15,38	9,12	80,30
	RUI 116	8,13	8,05	89,70
	RUI 117	10,97	6,14	87,60

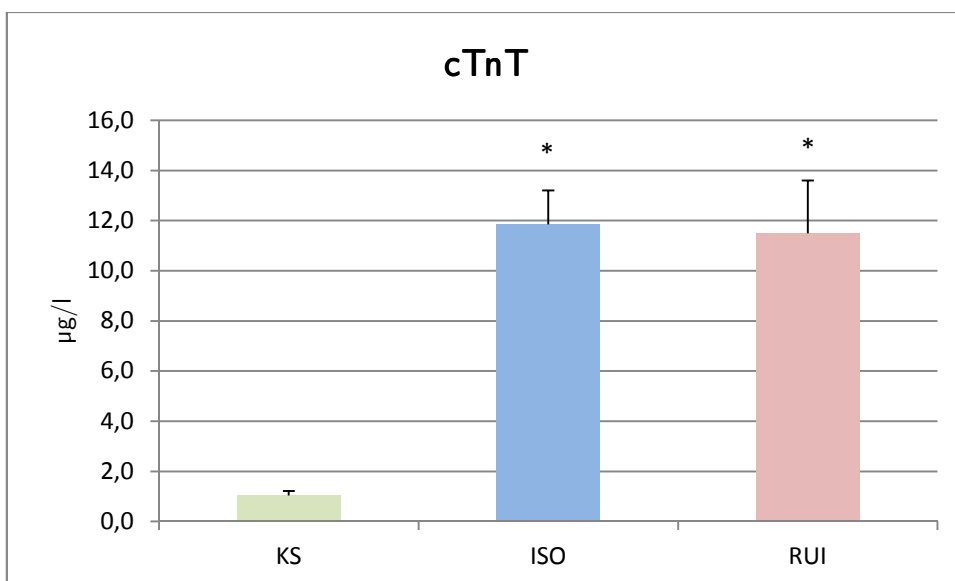
Tabulka 9: Biochemické markery. Průměrné hodnoty a chyba průměru (S.E.)

Čas 120 min	Průměr			S.E.		
	KS	ISO	RUI	KS	ISO	RUI
cTnT [$\mu\text{g/l}$]	1,0	11,9	11,5	0,2	1,4	2,1
vitamín E [mmol/l]	9,8	13,2	7,8	2,6	2,3	0,9
vitamín C [mmol/l]	76,4	80,1	85,9	13,0	15,9	2,8

Ke zpracování grafů a výpočtu statistických hodnot biochemických markerů byl použit program GraphPad a jeho statistická metoda one-way ANOVA.

Údaje hodnot biochemických markerů po 2 hodinách od aplikace dané látky, které uvádí Tabulka 9, jsou graficky znázorněny v grafech 5–7.

Graf 5: Hodnota cTnT v čase 120 minut.



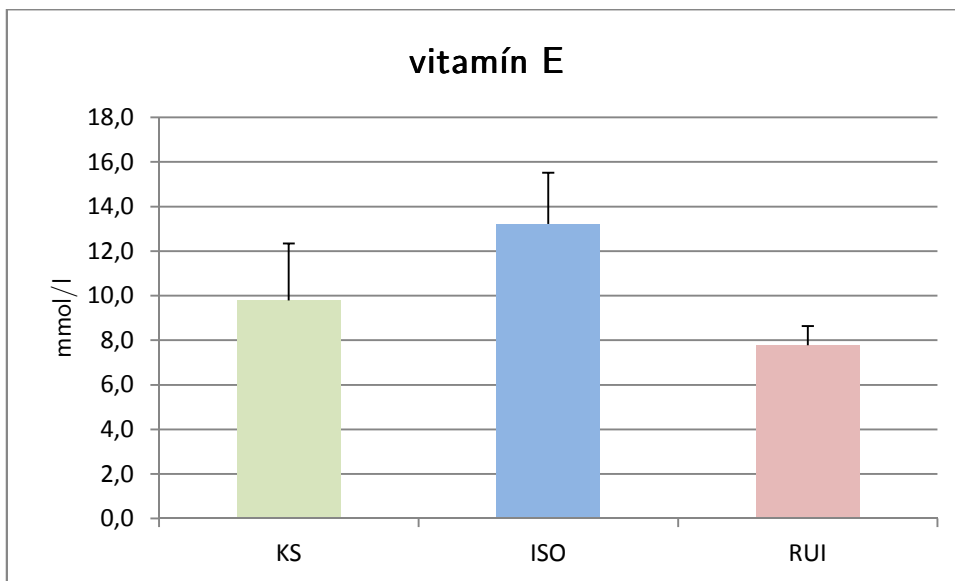
Statistická významnost odlišnosti průměrů cTnT:

KS vs. ISO, $P < 0,05$,

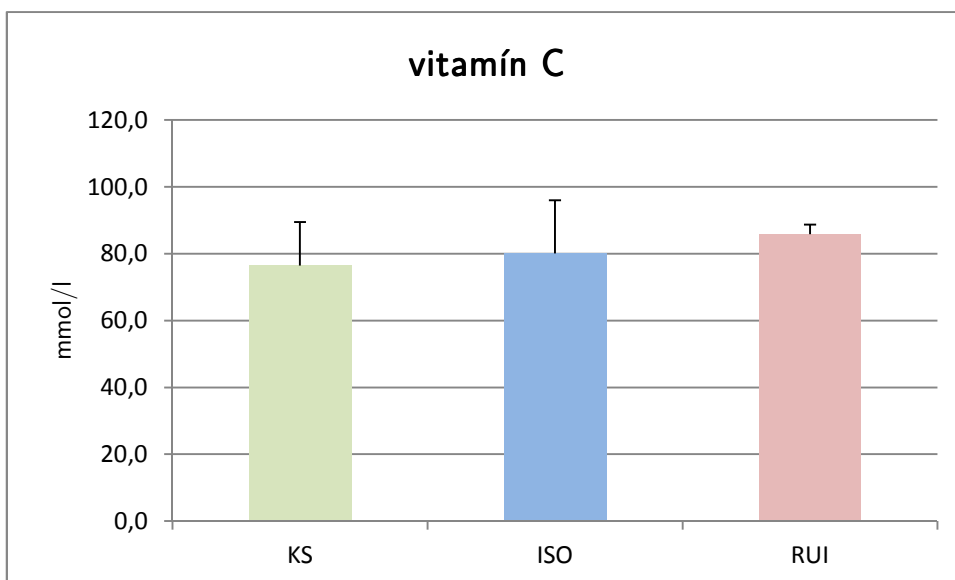
KS vs. RUI, $P < 0,05$

Ve skupině ISO a RUI došlo k podobnému výraznému zvýšení hladiny cTnT v séru oproti skupině KS, a to u obou skupin statisticky významně.

Graf 6: Hodnota koncentrace vitamínu E v čase 120 minut.



Graf 7: Hodnota koncentrace vitamínu C v čase 120 minut.



Změny hladin markerů oxidačního stresu (vitamin E, vitamin C) nebyly po zpracování naměřených dat prokázány jako statisticky významné.

8.3 Histologická analýza

K analýze byly použity podélné i příčné řezy levé a pravé srdeční komory. Snímky prezentované v této práci (obrázek 3-12) byly vybrány podle charakteristických nálezů u jednotlivých zvířat. Pro porovnání byly také zahrnuty snímky nepoškozeného myokardu a isoprenalinového modelu po 24 hodinách.

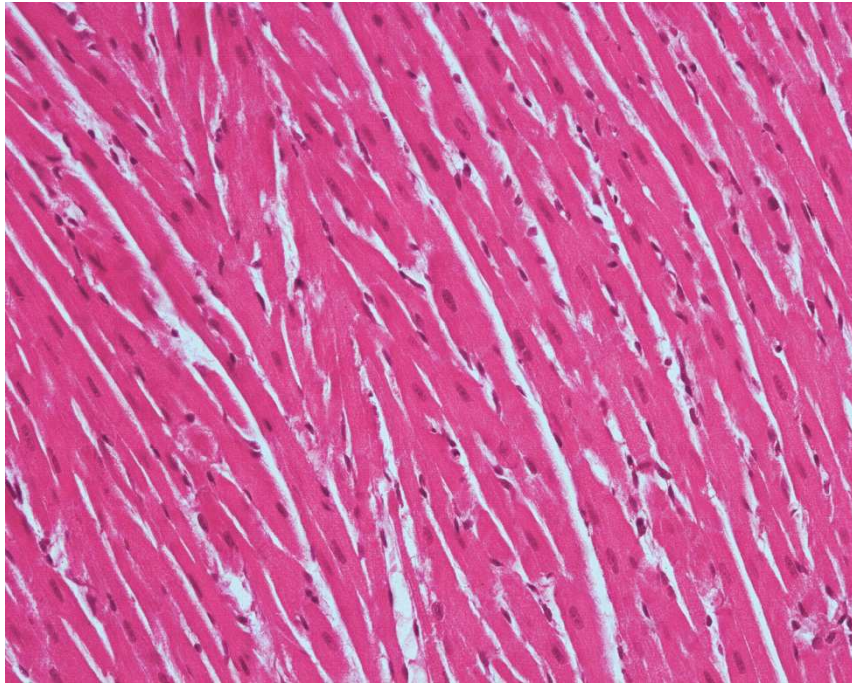
K hlavním znakům fyziologického myokardu patří jasně viditelné příčně pruhované myofibrily, úzké intersticiální prostory mezi kardiomyocyty, oválná a protáhlá jádra, interkalární disky a krevní cévy uložené ve vazivovém intersticiu. Obrázek 3 znázorňuje strukturu kontrolního myokardu bez aplikovaného ISO nebo rutinu.

Na snímcích endokardu, myokardu a epikardu po expozici ISO byly pozorovány patrné dilatace intersticiálních prostorů mezi trámci kardiomyocytů způsobené edemem intersticia a překrvenými cévami s infiltrací zánětlivých buněk (leukocytů). Fragmentace buněk myokardu a postupné mizení jader kardiomyocytů svědčí o nekrotických změnách. Pozorované změny se směrem od endokardu k epikardu zmenšují. Tyto snímky jsou zde prezentovány jen pro porovnání. Výrazné histologické změny jsou viditelné právě až po delším časovém úseku než je tomu po 2 hodinách od aplikace ISO. Po 24 hodinách od podání ISO jsou změny struktury myokardu v plném rozvoji, na vrcholu. Snímky znázorňující histologické změny po 2 hodinách od aplikace ISO nejsou znázorněny.

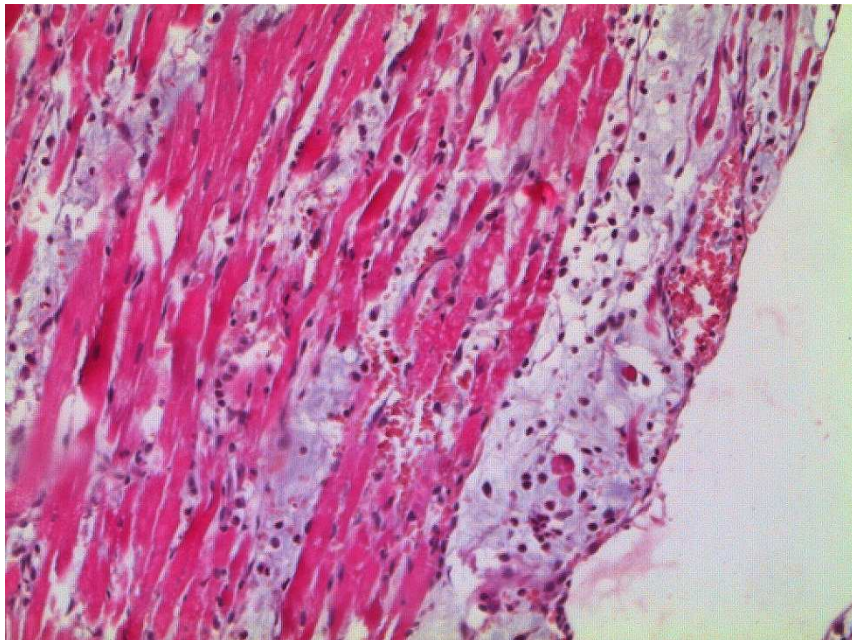
Obrázek 7 nejdetailněji zobrazuje fragmentaci kardiomyocytů s infiltrací zánětlivých buněk.

Na snímcích znázorňující změny po aplikaci rutinu s ISO byly patrné podobné nálezy, jako při podání samotného ISO po 2 hodinách. Výraznější změny byly především v endokardu a myokardu. Byla zde především hyperemie, edem, přítomnost zánětlivého infiltrátu a myofibrily byly kontrahované. Místy jsme mohli vidět i počínající fragmentaci myofibril. V epikardu byla většina buněk zachovalých bez výrazných změn.

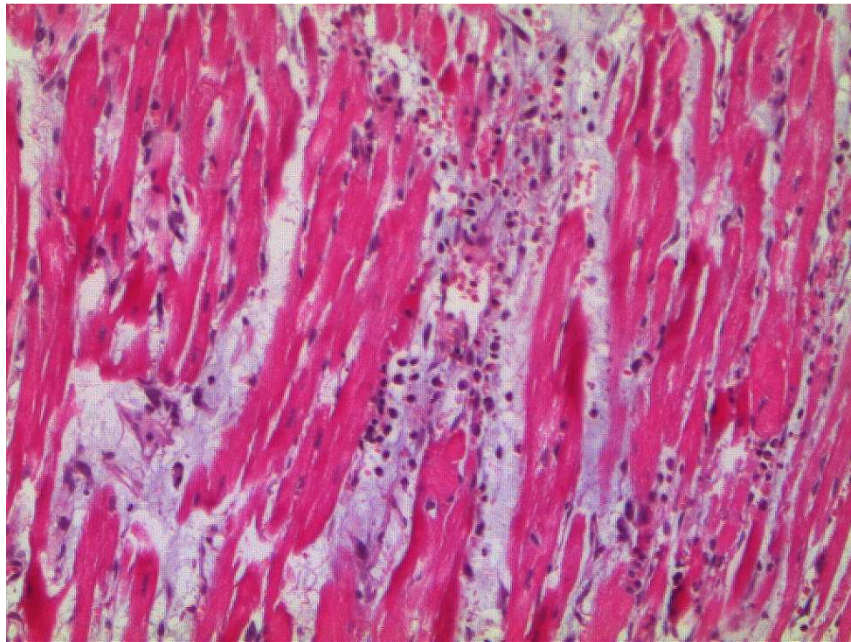
Obrázek 3: *Struktura myokardu (kontrolní), barvení H-E, zv. 200x*



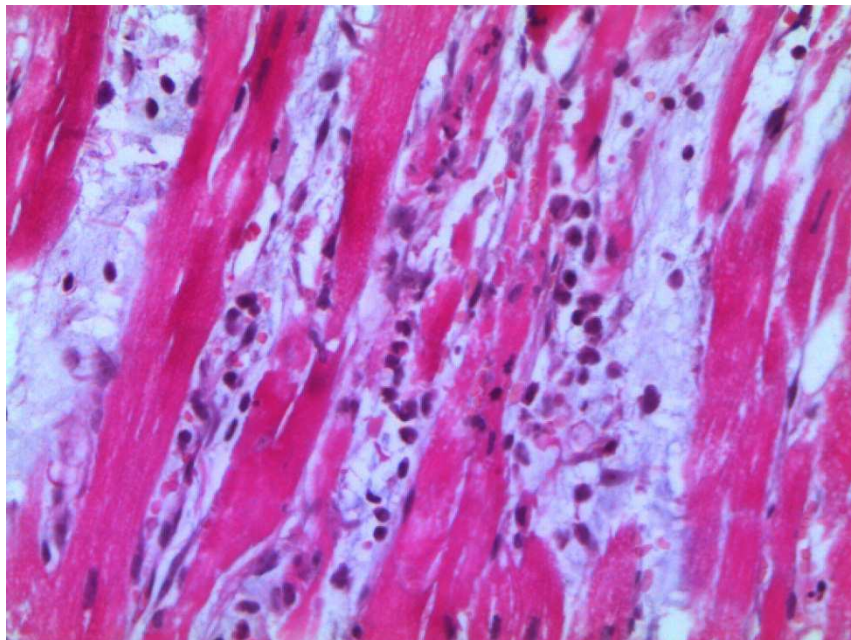
Obrázek 4: *Struktura endokardu po 24 hodinách od podání ISO, barvení H-E, zv. 100x*



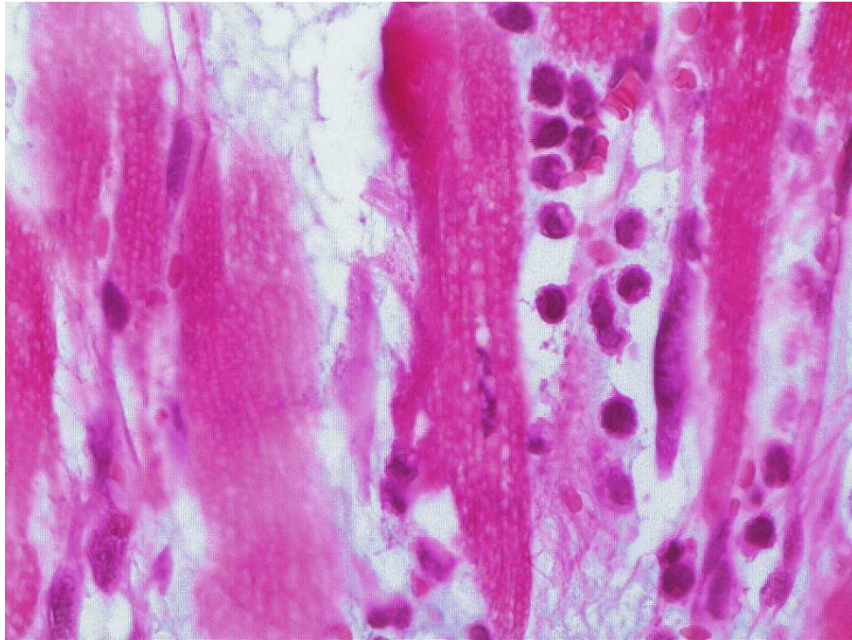
Obrázek 5: Struktura endokardu po 24 hodinách od podání ISO, barvení H-E, zv. 100x



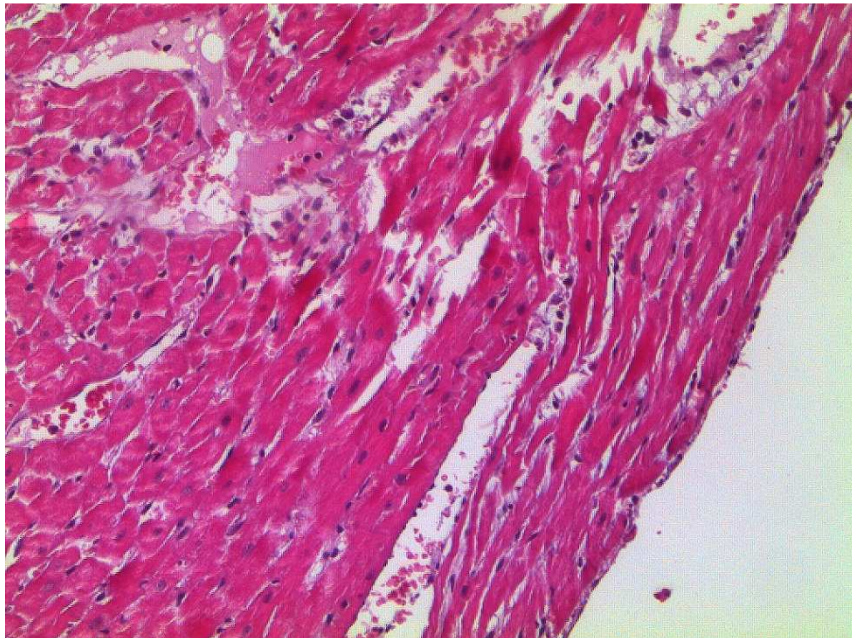
Obrázek 6: Struktura myokardu po 24 hodinách od podání ISO, barvení H-E, zv. 200x



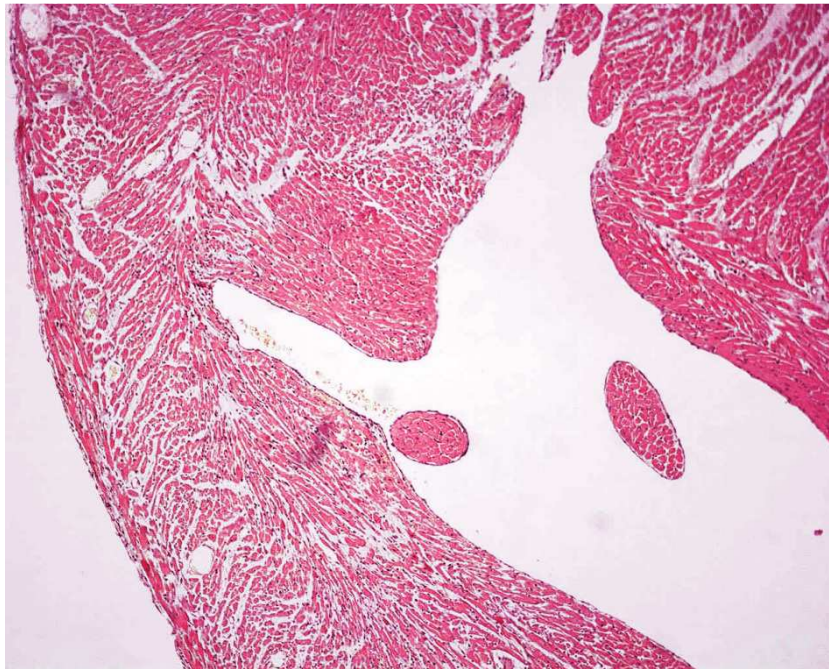
Obrázek 7: Struktura myokardu po 24 hodinách od podání ISO, barvení H-E, zv. 400x



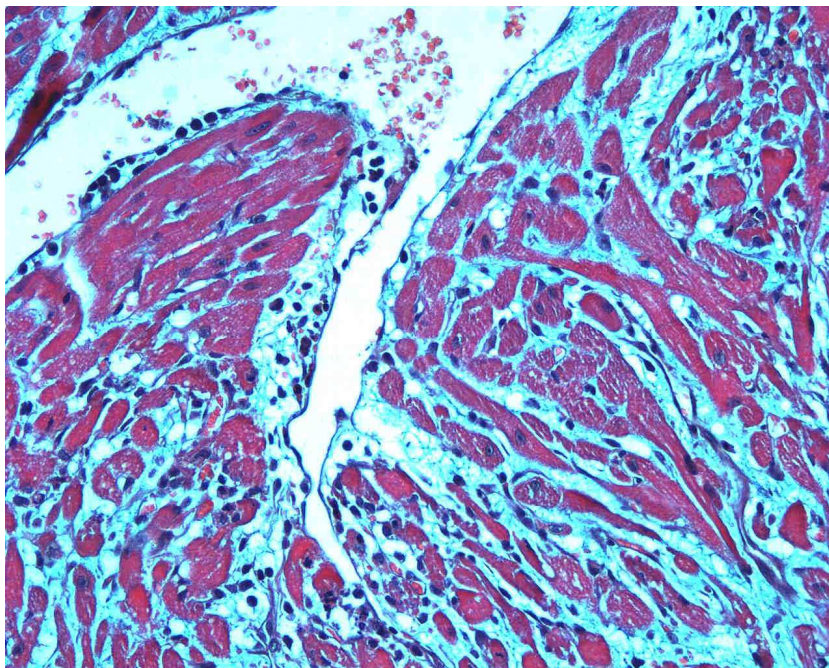
Obrázek 8: Struktura epikardu po 24 hodinách od podání ISO, barvení H-E, zv. 100x



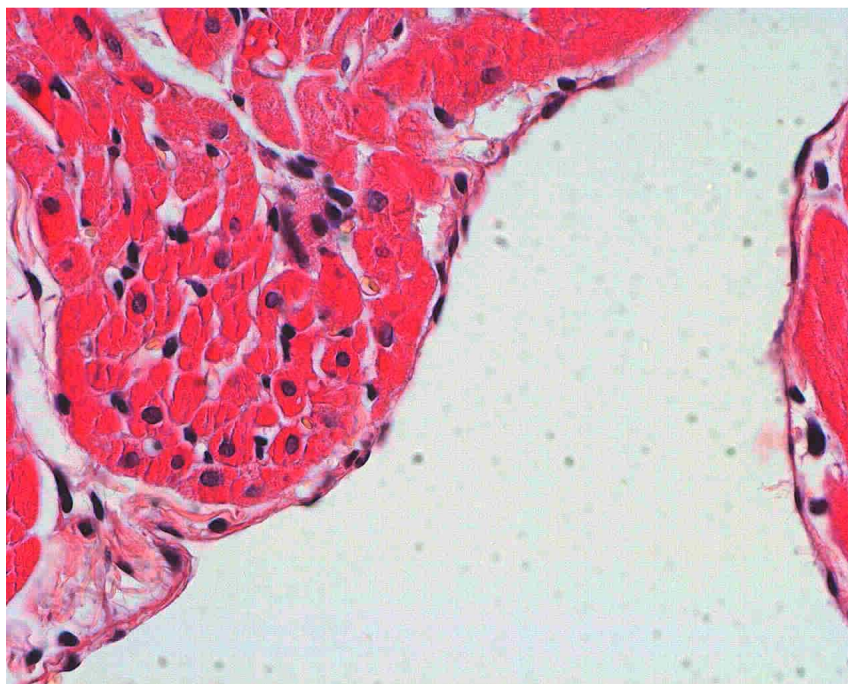
Obrázek 9: Struktura pravé a levé komory srdeční po 2 hodinách od aplikace rutinu a ISO, barvení H-E, zv. 40x



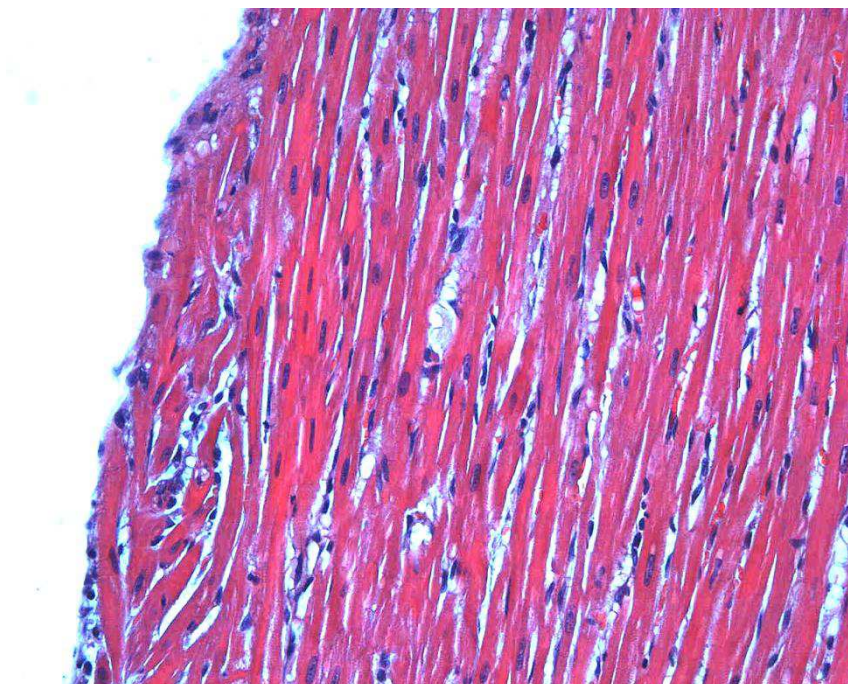
Obrázek 10: Struktura endokardu po 2 hodinách od aplikace rutinu a ISO, barvení zeleným trichromem dle Goldnera, zv. 200x



Obrázek 11: Struktura endokardu po 2 hodinách od aplikace rutinu a ISO, barvení H-E, zv. 400x



Obrázek 12: Struktura myokardu a epikardu po 2 hodinách od aplikace rutinu a ISO, barvení H-E, zv. 200x



Tabulka 10: Semikvantitativní analýza histopatologických změn v srdci laboratorního potkana po 2 hodinové expozici ISO a RUI.

Typ poškození	KS			ISO			RUI		
	endokard	myokard	epikard	endokard	myokard	epikard	endokard	myokard	epikard
Lokální kapilární hypemie	□	□	□	■ ■	■ ■	■	■ ■	■ ■	■
Intersticiální dilatace s edémem	□	□	□	■	■	■	■	■	■
Zduření vláken pojiva	□	□	□	■	■	□	■	■	□
Nekrotické změny kardiomyocytů	□	□	□	□	□	□	□	□	□
Fragmentace myofibril	□	□	□	□	■	□	□	■	□
Fragmentace svalových trámců	□	□	□	■	■	□	■	■	□
Přítomnost polymorfonukleárního infiltrátu	□	□	□	■ ■	■	■	■ ■	■	■
Přítomnost makrofágů/žírných buněk	□	□	□	■	□	□	■	□	□
Přítomnost fibroblastů	□	□	□	□	□	□	□	□	□

Vysvětlivky:

- uvedená změna nebyla pozorována
- máločetné zastoupení změny
- ■ vícečetné zastoupení změny

Diskuze

Kardiovaskulární choroby jsou jednou z hlavních příčin úmrtnosti [1]. V důsledku toho se pátralo po příčinách, které způsobují poškození myokardu, především ischemii. Následkem toho docházelo k výzkumu a vytváření modelů, které se prováděli na laboratorních zvířatech za účelem objasnění příčin a průběhu ischemie a sledování změn a reakcí myokardu na poškození. Jedním z těchto modelů k navození ischemie se stal myokard potkana poškozený ISO a to buď v jednotlivých, nebo opakujících se různě velkých dávkách. Tento model se začal používat také ke studiu látek, které mohou pozitivně ovlivnit průběh ischemie [3] [5].

ISO je neselektivní β -sympatomimetikum a jeho podávání ve velkých dávkách vede k hypotenzi, ke zrychlení srdeční frekvence a zvýšení kontraktility. To má za následek nedostatečné zásobování myokardu kyslíkem, které je následováno ischemií. Ischemie je spojena se zvýšenou krevní srážlivostí a ROS produkce založené na uvolnění volného železa a mědi. Tento proces se předpokládá během ischemie při AIM [7]. Vysoké hladiny katecholaminů jsou kardiotoxické a mohou vyvolat AIM [32]. Poškození myokardu laboratorního potkana ISO v jednorázové dávce 100 mg/kg s.c. bylo prokázáno v [4] .

V minulosti byly vyzdvihovány pozitivní farmakologické účinky flavonoidů na základě jejich antioxidačních nebo kovy-chelatačních vlastností. Nicméně se v posledních letech objevily spíše negativní výsledky, a naše současné údaje spíše podporují tyto skutečnosti. Důvody pro neúčinnost rutinu ke snížení kardiotoxicity katecholaminů se zdají být komplexní a je vyžadováno diskutovat jak patogenezi katecholaminové kardiotoxicity, tak farmako-toxikologické vlastnosti rutinu. Další in vitro a in vivo studie jsou potřebné pro lepší pochopení zřejmě velmi komplexního působení rutinu a/nebo jeho metabolitů v biologických systémech s cílem plně využít ochranný potenciál a zároveň zabránit jeho toxicitě. [7].

V této práci jsme dospěli k závěru, že i.v. podání 11,5 mg/kg rutinu po 2 hodinách od aplikace nemá pozitivní vliv na model myokardu po s.c. expozici ISO v dávce 100

mg/kg. Tento výsledek jsme dokázali naměřením funkčních hodnot, biochemických markerů a doplnili jsme ho o histologické nálezy.

V případě funkčních parametrů nebyl zaznamenán statisticky významný nárůst tepové frekvence ani snížení systolického, středního a diastolického tlaku u skupiny s ISO oproti skupině s rutinem a ISO.

Z biochemických hodnot se signifikantně potvrdilo pouze zvýšení cTnT v séru jak u skupiny, které byl podán ISO tak i u skupiny, které byl podán rutin s ISO. U dalších markerů (vitamin C a vitamin E) nebyla prokázána statistická významnost odlišnosti průměrů u skupiny s ISO oproti skupině s rutinem a ISO.

Výsledky zobrazené v grafické podobě naznačují skutečné rozdíly mezi jednotlivými skupinami častěji, než bylo prokázáno se statistickou významností. Domnívám se, že tato skutečnost je s největší pravděpodobností dána tím, že sledované skupiny obsahovaly menší počet potkanů. Statistické metody jsou na tuto skutečnost velmi citlivé, v důsledku čehož ponechávají pro malé soubory větší nejistotu ve svých závěrech. Dá se předpokládat, že pokud by soubory zvířat byly větší, bylo by se statistickou významností prokázáno více rozdílů. Změny by se také pravděpodobně významněji projevily v případě, že by byly skupiny potkanů sledovány po dobu delší než 2 hodiny, například až 24 hodin, viz studie [7].

Histologické snímky zachycené po 2 hodinách od aplikace rutinu a ISO znázorňovaly malé nálezy, velmi podobné, jak tomu je při podání samotného ISO po 2 hodinách. Nemohli jsme tudíž konkrétněji porovnat rozdíly, mezi těmito dvěma skupinami. Výraznější změny byly především v endokardu a myokardu. Byla zde především hyperemie, edém, přítomnost zánětlivého infiltrátu a myofibrily byly kontrahované. Místy jsme mohli vidět i počínající fragmentaci myofibril. V epikardu byla většina buněk zachovalých bez výraznějších změn. Výrazné histologické změny jsou viditelné právě až po delším časovém úseku jak jsme mohli vidět na snímcích po 24 hodinách od podání ISO, kde jsou změny struktury myokardu v plném rozvoji, na vrcholu.

Bylo zjištěno, že rutin v dávce 46mg/kg ISO-kardiotoxicitu zhoršuje, zatímco dávka 11mg/kg neměla žádný vliv po 24 hodinovém experimentu. Rutin nedokázal poskyt-

nout ochranu proti ISO toxicitě. Nepozorovali ani zlepšení buněčného poškození vyvolané ISO, ani zvýšení buněčné životaschopnosti. Tyto neočekávané výsledky byly ve shodě s pokusy in vitro. Na rozdíl od předchozích studií v literatuře, byly pozitivní účinky po perorálním podání rutinu nepravděpodobně zprostředkovány samotným rutinem, ale zřejmě jeho metabolity nebo v tomto okamžiku neznámým adaptivním mechanismem, který si zaslouží další výzkum [7].

Perorální podávání rutinu (80 mg/kg) denně po dobu 42 dnů zdravým potkanům neprokázalo žádný významný vliv na zkoumané biochemické parametry. Po tomto období byl potkanům subkutánně aplikován ISO (100 mg/kg) v intervalu 24 hodin po dobu dvou dnů. Histopatologie myokardu ukázala preventivní účinky rutinu na modelové poškození ISO [32].

Jedním z možností neúspěchu při našem experimentu může být právě forma podání. Zlepšení rozpouštění rutinu nanokrystalových tablet by mělo vést k lepší biologické dostupnosti jinak špatně rozpustného rutinu v těle [30]. Rozdíly v lipofilním/hydrofilním charakteru rutinu mohou vysvětlit neúspěch chránit myokard in vivo a zhoršení katecholaminového zranění [7].

Závěr

V této práci bylo prokázáno, že jednorázové i.v. podání 11,5 mg/kg rutinu 5 minut před expozicí jednorázové s.c dávky ISO (100 mg/kg) nemá po 2 hodinách pozitivní vliv na úroveň poškození myokardu.

V případě funkčních parametrů nebyl zaznamenán statisticky významný nárůst tepové frekvence ani snížení systolického, středního a diastolického tlaku u skupiny s ISO oproti skupině s rutinem a ISO.

Nálezy byly potvrzeny signifikantním zvýšením cTnT v séru jak u skupiny, které byl podán ISO tak i u skupiny, které byl podán rutin s ISO. U dalších biochemických markerů, vitamínu C a vitamínu E, naopak nebyla prokázána statistická významnost odlišnosti průměrů u skupiny s ISO oproti skupině s rutinem a ISO.

Histologické snímky neprokázaly výrazné rozdíly mezi nálezy u skupiny ISO oproti skupině rutinu s ISO.

Seznam tabulek

Tabulka 1: Laboratorní diagnostika infarktu myokardu.....	12
Tabulka 2: Adrenergní receptory.....	21
Tabulka 3: Experimentální data funkčních parametrů.....	34
Tabulka 4: Střední tlak krve – průměrné hodnoty a chyba průměru (S.E.).....	35
Tabulka 5: Systolický tlak krve – průměrné hodnoty a chyba průměru (S.E.).....	36
Tabulka 6: Diastolický tlak krve – průměrné hodnoty a chyba průměru (S.E.).....	37
Tabulka 7: Tepová frekvence – průměrné hodnoty a chyba průměru (S.E.).....	38
Tabulka 8: Experimentální data biochemických markerů.....	39
Tabulka 9: Biochemické markery. Průměrné hodnoty a chyba průměru (S.E.).....	39
Tabulka 10: Semikvantitativní analýza histopatologických změn v srdci laboratorního potkana po 2 hodinové expozici ISO a RUI.....	48

Seznam grafů

Graf 1: Závislost středního tlaku krve na čase.....	35
Graf 2: Závislost systolického tlaku krve na čase.....	36
Graf 3: Závislost diastolického tlaku krve na čase.....	37
Graf 4: Závislost tepové frekvence na čase.....	38
Graf 5: Hodnota cTnT v čase 120 minut.....	40
Graf 6: Hodnota koncentrace vitamínu E v čase 120 minut.....	41
Graf 7: Hodnota koncentrace vitamínu C v čase 120 minut.....	41

Seznam obrázků

Obrázek 1: Isoprenalin	20
Obrázek 2: Rutin	24
Obrázek 3: Struktura myokardu (kontrolní), barvení H-E, zv. 200x.....	43
Obrázek 4: Struktura endokardu po 24 hodinách od podání ISO, barvení H-E, zv. 100x	43
Obrázek 5: Struktura endokardu po 24 hodinách od podání ISO, barvení H-E, zv. 100x	44
Obrázek 6: Struktura myokardu po 24 hodinách od podání ISO, barvení H-E, zv. 200x	44
Obrázek 7: Struktura myokardu po 24 hodinách od podání ISO, barvení H-E, zv. 400x.....	45
Obrázek 8: Struktura epikardu po 24 hodinách od podání ISO, barvení H-E, zv. 100x.....	45
Obrázek 9: Struktura pravé a levé komory srdeční po 2 hodinách od aplikace rutinu a ISO, barvení H-E, zv. 40x.....	46
Obrázek 10: Struktura endokardu po 2 hodinách od aplikace rutinu a ISO, barvení zeleným trichromem dle Goldnera, zv. 200x	46
Obrázek 11: Struktura endokardu po 2 hodinách od aplikace rutinu a ISO, barvení H-E, zv. 400x.....	47
Obrázek 12: Struktura myokardu a epikardu po 2 hodinách od aplikace rutinu a ISO, barvení H-E, zv. 200x.....	47

Seznam použitých zkratk

AIM	Akutní infarkt myokardu
ATP	Adenosintrifosfát
CE.....	Kapilární elektroforéza
CK	Kreatinkináza
CK-MB	Kardiospecifické myokardiální frakce kreatinkinázy
cTnT	Srdeční troponin T
EKG.....	Elektrokardiogram
GIT	Gastrointestinální trakt
GPx.....	Glutathion peroxidáza
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transferáza
H-E	Hematoxylin a eosin
ISO.....	Isoprenalin
KCl	Chlorid draselný
KVO	Kardiovaskulární onemocnění
LD.....	Laktátdehydrogenáza
LDL	Low-density lipoprotein
MDA	Malondialdehyd
NA	Noradrenalin
NaCl.....	Chlorid sodný
PBS.....	Phosphate buffered saline
PE.....	Polyetylen
ROS	Reaktivní formy kyslíku (Reactive oxygen species)
SOD	Superoxid dismutáza

Seznam použité literatury

- [1] **Ndiaye, N. C. a Nehzad, M. A . et al.** Cardiovascular diseases and genome-wide association studies. *Clinica Chimica Acta*. 2011, Sv. 412, stránky 1697-1701.
- [2] **Rajadurai, M. a Prince, P. S. M.** Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: Biochemical and histopathological evidences. *Toxicology*. 2006, Sv. 228, stránky 259–268.
- [3] **Rona, G. et al.** An infarct like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in rat. *Arch. Path.* 1959, Sv. 67, stránky 443-458.
- [4] **Kostinková, V.** Patofyziologické hodnoty myokardu potkana po akutní expozici isoprenalinu: diplomová práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové 2011, 57 str.
- [5] **Bózner, A.** *Normálna a patologická ultraštruktúra srdcového svalu*. 1. vydání. Bratislava : Veda, 1992. 292 str. ISBN 80-224-0278-8.
- [6] **Mladěnka, P. a Semecký, V. et al.** The effects of lactoferrin in a rat model of catecholamine cardiotoxicity. *Biometals*. 2009, Sv. 22 (2), stránky 353-361.
- [7] **Mladěnka, P. et al.** Direct administration of rutin does not protect against catecholamine cardiotoxicity. *Elsevier. Toxicology*, 2009, Sv. 255, stránky 25-32.
- [8] **Klener, P. et al.** *Vnitřní lékařství*. 4., přepracované a doplněné vydání. Praha : Galén a Karolinum, 2011. 1174 str. ISBN 978-80-7262-705-9 (Galén), ISBN 978-80-246-1986-6 (Karolinum).
- [9] **Vojáček, J. a Kettner, J. et al.** *Klinická kardiologie*. 1. vydání. Hradec Králové : F. Skopec - Nucleus HK, 2009. 925 str. ISBN 978-80-87009-58-1.
- [10] **Štejf, M. et al.** *Kardiologie*. 2. přepracované a doplněné vydání. Praha : Grada, 1998. 492 str. ISBN 80-7169-448-7.

- [11] **Ostadal, B. et al.** Development of Cardiac Sensitivity to Oxygen Deficiency: Comparative and Ontogenetic Aspects. *Physiological reviews*. 1999, Sv. 79, stránky 635-659.
- [12] **Špaček, R. a Widimský, P.** *Infarkt myokardu*. 1. vydání. Praha : Galén, 2003. 231 str. ISBN 80-7262-197-1.
- [13] **Rajadurai, M. a Prince, P. S. M.** Preventive effect of naringin on cardiac markers, electrocardiographic patterns and lysosomal hydrolases in normal and isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. *Toxicology*. 2007, Sv. 230, stránky 178–188.
- [14] **Buonocore, G. et al.** Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 2010, Sv. 15, stránky 186-190.
- [15] **Bandyopadhyay, U. et al.** Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Current Science*. 1999, Sv. 77, 5, stránky 658-666.
- [16] **Naidoo, D. a Lux, O.** The effect of vitamin C and E supplementation on lipid and urate oxidation products in plasma. *Nutrition Research*. 1998, Sv. 18, 6, stránky 953-961.
- [17] **Feng, W. a Li, W.** The study of ISO induced heart failure rat model. *Experimental and Molecular Pathology*. 2010, Sv. 88, stránky 299–304.
- [18] **Sánchez, V.Ch. et al.** Role of Nitric Oxide in Isoproterenol-Induced Myocardial Infarction. *Cardiotoxicity of Oncologic Treatments*. stránky 17-32.
- [19] **Naidoo, D. a Lux, O.** The effect of vitamin C and E supplementation on lipid and urate oxidation products in plasma. *Nutrition Research*. 1998, Sv. 18, 6, stránky 953-961.
- [20] **Račanská, E. et al.** *Léky a jejich použití*. 1. vydání. Bratislava : Gemini, 1993. 448 str. ISBN 80-7161-058-5.

- [21] **Lincová, D. a Farghali, H. et al.** *Základní a aplikovaná farmakologie. 2.*, doplněné a přepracované vydání. Praha : Galén, 2007. 672 str. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [22] **Hartl, J. a Palát, K. et al.** *Farmaceutická chemie II/1.* Praha : Karolinum, 2001. 106 str. ISBN 80-7184-349-0.
- [23] **Katzung, B. G.** *Základní a klinická farmakologie. 2. vydání v ČR.* Praha : H & H, 2006. 1106 str. ISBN 80-7319-056-7.
- [24] **Handforth, C. P.** Isoproterenol-induced myocardial infarction in animals. *Arch. Path.* 1962, Sv. 73, stránky 161-165.
- [25] **Špinar, J. et al.** *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění.* Praha : Grada Publishing, 2004. 248 str.
- [26] **Mladěnka, P. a Zatloukalová, L. et al.** Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine.* 2010, Sv. 49, stránky 963–975.
- [27] **Yao, L. H.** Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 59. 2004, stránky 113-122.
- [28] **Ferrali, M. et al.** Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters.* 1997, Sv. 416, stránky 123-129.
- [29] **ČR, Ministerstvo zdravotnictví.** *Český lékopis 2009.* Praha : Grada, 2009. stránky 3094-3095. ISBN 978-80-247-2994-7.
- [30] **Mauludin, R., Müller, R.H. a Keck, C. M.** Development of an oral rutin nanocrystal formulation. *International Journal of Pharmaceutics.* 2009, Sv. 370, stránky 202-209.
- [31] **Manacha, C. et al.** Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters.* 1997, Sv. 409, stránky 12-16.

- [32] **Prince, P. S. M. a Priya, S.** Preventive effects of rutin on lysosomal enzymes in isoproterenol induced cardio toxic rats: Biochemical, histological and in vitro evidences. *European Journal of Pharmacology*. 2010, Sv. 649, stránky 229-235.
- [33] **Andlauer, W et al.** Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms. *Biochemical Pharmacology*. 2001, Sv. 62, stránky 369–374.
- [34] **Itagaki, S. et al.** Protective effects of quercetin-3-rhamnoglucoside (rutin) on ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. *Food Chemistry*. 2010, Sv. 118, stránky 426–429.
- [35] **Mauludin, R. et al.** Kinetic solubility and dissolution velocity of rutin nanocrystals. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2009, Sv. 36, stránky 502-510.
- [36] **Schneiderka, P.** Laboratorní markery srdečních chorob. *Klin. Biochem. Metab.* 2006, Sv. 14 (35), 3, stránky 161-167.
- [37] **Tanito, M., Yodoi, J. a Nakamura, H.** Reactive oxygen species (ROS). *Nippon Rinsho*. 2004, Sv. 3, 62, stránky 547-550.