

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

**Patofyziologické hodnoty myokardu potkana po akutní
expozici isoprenalinu**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové 2011

Veronika Kostinková

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato diplomová 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.“

V Hradci Králové dne

Veronika Kostinková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za vedení, poskytnuté odborné rady a pomoc při sepisování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat kolegům z Katedry farmakologie a toxikologie a to zejména Mgr. Tomáši Filipskému za poskytnutá data a cenné informace pro praktickou část diplomové práce. V neposlední řadě děkuji paní laborantce Pavlíně Lukešové za pomoc při zpracování preparátů pro histologickou analýzu.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Veronika Kostinková

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Název diplomové práce: Patofyziologické hodnoty myokardu potkana po akutní expozici isoprenalinu

Kardiovaskulární choroby zůstávají i přes výrazné pokroky v medicíně jednou z hlavních příčin úmrtnosti. K objasnění patogeneze akutního infarktu myokardu (AIM) a výzkumu kardioprotektivních látek se využívá modelové poškození myokardu laboratorních zvířat navozené isoprenalinem (ISO).

Hlavním cílem v provedeném experimentu bylo sledování včasných histopatologických změn objevujících se v myokardu laboratorního potkana po 2 hodinách od aplikace 100 mg.kg⁻¹ ISO s.c. Histologické výsledky byly dále ve spolupráci s Katedrou farmakologie a toxikologie doplněny o funkční parametry a biochemické markery stanovené také po 2 hodinách od aplikace. Zjištěné změny byly porovnávány oproti kontrolní skupině, které bylo aplikováno pouze rozpouštědlo.

Histopatologická analýza odhalila změny, které byly četnější a výraznější v subendokardiální oblasti. V myokardu a to zejména v oblasti hrotu bylo pozorováno edematózní rozšíření, fragmentace svalových vláken a kulatobuněčná infiltrace. Funkční parametry v podobě tepové frekvence a krevních tlaků vykazaly po 2 hodinách od aplikace předpokládaný vývoj shodný s dosud provedenými studiemi. Biochemická analýza potvrdila zvýšenou hladinou troponinu T histologické výsledky, markery oxidačního stresu (malondialdehyd, celkový glutathion, vitamin C a vitamin E) ale nezaznamenaly signifikantní změny po podání ISO.

Abstract

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

Candidate: Veronika Kostinková

Supervisor: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Title of thesis: Patophysiological values of rat myocardium after acute exposition of isoprenaline

Cardiovascular diseases remain one of the main causes of mortality despite advances in medicine. Isoprenaline (ISO) model of myocardial injury in laboratory animals is used to clarify the pathogenesis of acute myocardial infarction (AIM) and to research cardioprotective substances.

The monitoring of early histopathological changes that occur in the rat myocardium at 2 hours after application of 100 mg.kg⁻¹ s.c. ISO, was the main aim of this experiment. Histological results were completed in collaboration with the Department of Pharmacology and Toxicology which provided the data about functional parameters and biochemical markers also after 2 hours from application. Detected changes were compared against the control group to which the solvent was administered.

Histopathological analysis revealed more frequent and intense changes in the subendocardial area. Some interstitial dilatation with oedema, cardiomyocytes fragmentation and presence of inflammatory infiltration were observed in the myocardium, especially in the area of the apex. Functional parameters as heart rate and blood pressure showed after 2 hours from application of ISO the supposed development coincident to the one observed in previously made studies. Biochemical analysis confirmed the histological results by elevated levels of cardiac troponin T, but markers of oxidative stress (malondialdehyde, total glutathione, vitamin C and vitamin E) haven't shown significant changes after administration of ISO.

Zadání a cíl diplomové práce

Na Katedře farmakologie a toxikologie FaF UK HK se společně ve spolupráci s Katedrou biologických a lékařských věd dlouhodobě sleduje možnost protektivního působení vybraných přírodních i semisyntetických farmak na modelové poškození myokardu laboratorního potkana isoprenalinem.

Cílem této práce bylo sledování včasných histopatologických změn objevujících se ve strukturách myokardu laboratorního potkana po 2 hodinách od jednorázové aplikace isoprenalinu v dávce 100 mg.kg^{-1} s.c. Morfologické nálezy byly doplněny o nálezy funkční a biochemické.

Obsah

Úvod.....	9
1. Ischémie a nekróza myokardu	10
1.1. Ischémie a nekróza.....	10
1.2. Metabolické změny.....	11
1.3. Histologické změny	12
1.4. Ischemicko-reperfuzní poškození.....	12
1.4.1. Reaktivní formy kyslíku	13
1.5. Laboratorní markery	15
1.5.1. Troponiny.....	16
1.5.2. Kreatinkináza (CK).....	16
1.5.3. Myoglobin.....	17
1.5.4. Laktátdehydrogenáza (LD).....	17
1.5.5. Aspartátaminotransferáza (AST)	17
1.5.6. C-reaktivní protein (CRP).....	17
1.5.7. Ischémii modifikovaný albumin (IMA).....	18
2. Katecholaminový model kardiotoxicity.....	19
2.1. Isoprenalinový model	19
2.1.1. Histologické změny po aplikaci ISO	21
2.1.2. Biochemické a funkční změny po aplikaci ISO.....	22
3. Isoprenalin	25
3.1. Účinky isoprenalinu	25
3.2. Mechanismus účinku	25
3.3. Nežádoucí účinky	26
3.4. Metabolismus.....	26
3.5. Indikace.....	26
3.6. Struktura.....	26
4. Praktická část	28
4.1. Metodika	28
4.1.1. Zvířata.....	28
4.1.2. Použité látky a přístroje	28

4.1.3.	Provedení experimentu	29
4.2.	Zpracování materiálu pro histologickou analýzu.....	30
4.2.1.	Hematoxylin a eosin (H-E).....	32
4.2.2.	Zelený trichrom podle Goldnera.....	33
5.	Výsledky	36
5.1.	Mortalita.....	36
5.2.	Histologická analýza.....	36
5.3.	Funkční parametry	44
5.4.	Biochemické markery a vlhká hmotnost komor	45
6.	Diskuze	47
	Závěr	50
	Seznam obrázků.....	51
	Seznam tabulek	52
	Seznam použitých zkratk	53
	Seznam použité literatury	54

Úvod

Kardiovaskulární choroby patří dlouhodobě k hlavním příčinám úmrtnosti v rozvinutých zemích. Mezi nimi zaujímá přední místo ischemická choroba srdeční a zejména její akutní forma – infarkt myokardu, který je jedním z nejzávažnějších akutních koronárních syndromů. Projevuje se ložiskovou ischemickou nekrózou srdečního svalu vznikající na podkladě náhlého uzávěru či extrémního zúžení koronární tepny. Ve více než 90 % případů je tento uzávěr důsledkem aterosklerózy.

Pro objasnění patogeneze infarktu myokardu byla vytvořena řada zvířecích experimentálních modelů. Vedle podvazu věnčité tepny se dnes využívá neinvazivní metoda navození ischemie a následné nekrózy pomocí isoprenalinu. Isoprenalin je syntetický katecholamin vyvolávající poškození myokardu velmi podobné infarktu. Tato látka byla a stále je předmětem řady experimentů a studií. Jejich vzájemné porovnání však není jednoduché vzhledem k podání isoprenalinu v různých dávkách, po různou dobu (akutní a chronická expozice), různým cestám aplikace a různým druhům zvířat. Vedle objasnění mechanismů, které vedou ke vzniku infarktu myokardu se isoprenalinový model používá i ke studiu látek majících kardioprotektivní či kardiotoxické účinky.

V teoretické části této práce jsou popsány jak obecné aspekty ischemie a nekrózy myokardu, změny nastávající v průběhu těchto procesů, tak i laboratorní markery určené k jejich diagnostice. Další kapitola je věnována isoprenalinovému modelu kardiotoxicity a změnám nastávajícím po aplikaci této látky. O isoprenalinu samotném následně pojednává poslední část teoretické stati.

V praktické části je nejprve charakterizován průběh provedeného experimentu, použité přístroje, látky a zpracování vzorků pro histologickou analýzu. Dále jsou uvedeny a interpretovány zjištěné histologické, biochemické a funkční změny.

1. Ischémie a nekróza myokardu

Kardiovaskulární onemocnění si ročně vyžádají jen v Evropě více než 4 milióny obětí. Za více než polovinu z nich je zodpovědná ischemická choroba srdeční. [32]

1.1. Ischémie a nekróza

Jako ischémii (nedokrevnost) označujeme stav, který vzniká v důsledku nepoměru mezi dodávkou a spotřebou kyslíku (O_2) v srdci.

Dodávka O_2 je daná koronárním průtokem, saturací arteriální krve kyslíkem a extrakcí kyslíku z arteriální krve srdečními buňkami. [15] Jelikož extrakce O_2 z koronární krve je maximální již v klidu, je jeho zvýšená dodávka do myokardu v případě potřeby kryta zvyšováním koronárního průtoku. [14]

Spotřeba O_2 kardiomyocyty je závislá na srdeční frekvenci, kontraktilitě myokardu a napětí ve stěně komory (systolickém napětí). [15]

Z výše uvedeného vyplývá, že ischémie je zapříčiněna buď 1) náhlým vzestupem požadavků myokardu na dodávku O_2 a jeho zvýšenou spotřebou při nedostatečném zvýšení koronárního průtoku anebo 2) náhlým omezením koronárního průtoku při nezměněné kyslíkové spotřebě. [8]

Literatura uvádí jako nejčastější důvod sníženého průtoku krve věnčitými tepnami aterosklerózu. Aterosklerotické pláty zužují lumen tepny a vedou k poklesu prokrvování myokardu – ischemické chorobě srdeční. V případě extrémního zúžení či úplného uzavření lumen tepny a dlouhodobé ischémie dochází k nekróze oblasti vyživované postiženou arterií – akutnímu infarktu myokardu (AIM). [3]

V průběhu reverzibilní ischémie (do 20 - 40 min) se objevují různé metabolické, iontové a funkční změny, které následně vedou při neobnovení krevního průtoku k ireverzibilnímu poškození myokardu. Mimo jiné dochází i k nadměrnému uvolnění

katecholaminů do cirkulace, což přispívá k dalšímu zhoršení dosavadního stavu a výrazně přispívá ke vzniku pozdějšího infarktu. [3]

K nevratným změnám kardiomyocytů u člověka dochází po 20 - 40 minutách těžké prolongované ischemie. Nadměrná tvorba reaktivních forem kyslíku, vyčerpání energetických zásob, prohloubení elektrolytové dysbalance, narušení buněčných membrán a z nich plynoucí uvolnění lysozomálních enzymů vede k odumírání buněk. Nekróza postupuje od endokardu k epikardu, což je dané tím, že za normálních podmínek je metabolická aktivita a extrakce O₂ nejvyšší právě v subendokardiální oblasti. [3]

1.2. Metabolické změny

Hlavním energetickým zdrojem myokardu za aerobních podmínek jsou z 60-90% mastné kyseliny (MK). [22] Kromě MK je myokard schopen metabolizovat glukózu, laktát a pyruvát.

Následkem nedostatku O₂ přechází myokard z mitochondriální oxidativní fosforylace k získávání energie anaerobní glykolýzou, která probíhá v buněčném cytosolu. Tento proces není však energeticky výhodný, protože poskytuje pouze 2 molekuly makroergního adenosintrifosfátu (ATP) z 1 molekuly glukózy oproti 38 molekulám ATP získaných oxidačními procesy. [3]

Při nedostatku O₂ dochází dále prostřednictvím laktátdehydrogenázy k přeměně pyruvátu na laktát a jeho akumulaci v myokardiálních buňkách. Následně vzniká acidóza, která vyvolá inhibici mnohých enzymů a při dlouhodobé ischemii vede k zástavě glykolýzy. [3] Acidóza dále působí zvýšenou propustností membrány pro elektrolyty a enzymy.

K narušení buněčné integrity vede hlavně již výše zmíněná nedostatečná tvorba a vyčerpání zásob ATP. Energetické rezervy myokardu se rychle spotřebují. Během 30 sekund dojde ke snížení ATP o 20 % a množství kreatinfosfátu klesne o 50 %. Laktát naopak stoupne až trojnásobně. Za 30 minut už je ATP sníženo až o 80 % a laktát

zvýšen až desetinásobně. [3] Udává se, že pokud zůstává alespoň 60 % původních zásob ATP, je poškození buňky ischemií ještě reverzibilní, pokud zbývá méně než 20 % stává se ireverzibilním. [7]

Buňky nejsou v důsledku narušení membrán schopny udržet fyziologický gradient iontů. Ionty Ca^{2+} a Na^+ se hromadí uvnitř ischemických buněk, zatímco ionty K^+ a Mg^{2+} se kumulují extracelulárně. Mění se osmotické poměry a dochází k edému buněk. Dále dochází k hypopolarizaci a zkrácení akčního potenciálu. [3] Ischemický myokard je elektricky nestabilní a může být zdrojem arytmií.

1.3. Histologické změny

Mikroskopické změny typické pro infarkt myokardu u člověka jsou patrné až po 24 hodinách.

Nejprve se mrtvá svalová vlákna ztenčí, protáhnou a zvlíní. Po 4 – 8 hodinách se objevuje intersticiální edém. Dochází k separaci vláken a zmnožení intravaskulárně uložených neutrofilů, které postupně přechází do intersticia. Přibližně po 8 – 16 hodinách se postupně rozvíjí myokardiální nekróza. Mezi typicky pozorované změny po 24 hodinách patří zvýšená eosinofilie cytoplazmy. Jádra podléhají karyolýze nebo jsou pyknotická a následně mizí. Dochází ke ztrátě příčného žíhání a výrazné infiltraci neutrofilních leukocytů. Mezi třetím a desátým dnem se nekrotická vlákna rozpadají a jsou nahrazovány granulační tkání s fibroblasty. Počet neutrofilů se snižuje a místo nich se zmnožují makrofágy. Vazivo postupně vyzrává, do 6 týdnů je oblast nekrózy kolagenizována a po 2 měsících je již celá tvořena vyžralou jizvou. [25]

1.4. Ischemicko-reperfuzní poškození

Termínem reperfuze se označuje obnovení průtoku ischemickým myokardem. Tento proces představuje v době počátečních změn, kdy je ischemie ještě reverzibilní, možnost záchrany postiženého myokardu a zmenšuje rozsah nekrózy. [3]

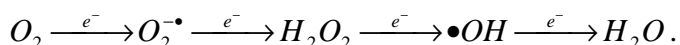
Reperfuze má však i své negativní následky. Za ty se považuje ischemicko-reperfuzní poškození související s uvolněním toxických reaktivních forem kyslíku (ROS), k němuž dochází v centru nekrotického ložiska nebo při dlouhodobé ischemii. [3]

1.4.1. *Reaktivní formy kyslíku*

Odhaduje se, že okolo 5% vdechnutého O₂ je v organismu převedeno na ROS. Ve fyziologickém případě je jejich vznik vyvažován buněčnými antioxidačními enzymy a tzv. „lapači“ volných kyslíkových radikálů. Při porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním ROS dochází k oxidačnímu stresu a poškození buněčných makromolekul. [26]

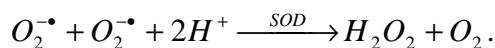
K ataku ROS jsou více náchylné buňky poškozené předchozí ischemií. ROS vznikají jako vedlejší produkt po obnovení krevního průtoku mitochondriemi. Dále jsou tvořeny buňkami imunitního systému (neutrofilními granulocyty a buňkami monocytomakrofágového systému) [8]. K jejich vzniku vede i oxidace katecholaminů. [20, 23]

Ve fyziologickém případě dochází v mitochondriích prostřednictvím cytochromoxidasy k čtyřelektronové redukci kyslíku na vodu. Celý proces je znázorněn následujícím schématem:



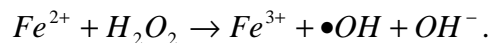
Pokud však proběhne jen částečná redukce, dojde ke vzniku ROS. Mezi ROS patří volné kyslíkové radikály s nepárovým elektronem - superoxidový radikál (O₂^{•-}) a hydroxylový radikál (•OH). Dále potom peroxid vodíku (H₂O₂) řazený do skupiny sloučenin kyslíku, které radikály nejsou.

Superoxidový radikál vzniká buď při výše popsané částečné redukci O₂ v mitochondriích nebo je produkován při reakcích katalyzovaných xantinoxidázou, lipoxygenázou a dalšími (viz obr. 1). Inaktivace superoxidu probíhá buď spontánně nebo mnohem častěji prostřednictvím enzymu superoxidodismutázy (SOD) za vzniku H₂O₂. Popisuje ji tato rovnice:

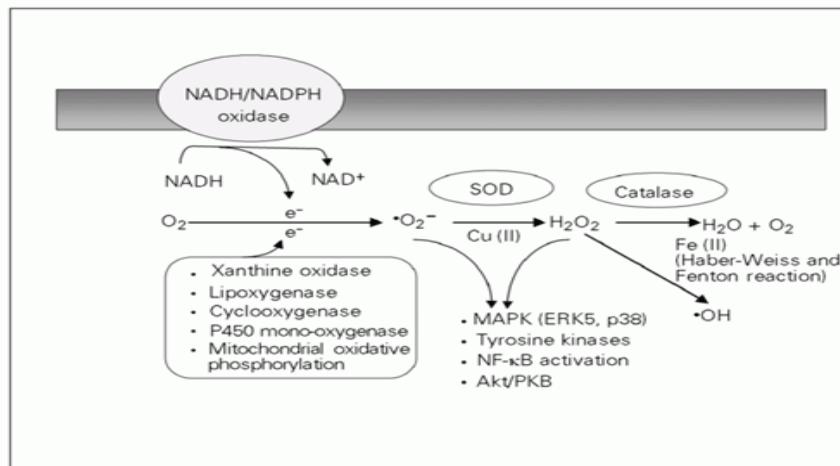
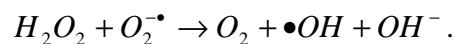
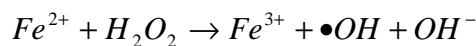
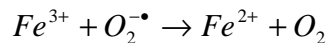


Ke vzniku H_2O_2 vede především dismutace $O_2^{\cdot-}$ popsaná výše uvedenou rovnicí. Jeho rozklad na vodu a kyslík je zprostředkován enzymem katalázou vyskytující se v peroxisomech (viz obr. 1).

Tvorba vysoce reaktivního a toxického hydroxylového radikálu vyžaduje přítomnost iontů přechodných kovů železa (Fe^{2+}) nebo mědi (Cu^+). Ty jsou během ischemie uvolňovány z metaloproteinů. Fentonova reakce katalyzovaná Fe^{2+} je znázorněna následující rovnicí:



K produkci hydroxylového radikálu vede rovněž reakce peroxidu vodíku se superoxidem katalyzovaná opět Fe^{2+} ionty, která se nazývá Haber-Weissova. Popisují ji následující rovnice:



Obr. 1: Vznik reaktivních forem kyslíku [33]

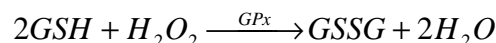
Působením ROS dochází k:

- Peroxidaci lipidů, kterou způsobuje hydroxylový radikál a méně superoxid. Nejsnáze peroxidaci podléhají fosfolipidové dvojvrstvy biologických membrán a

v nich dvojn  vazby nenasycených mastných kyselin. Narušení membrán vede ke změně jejich permeability. To m  za následek nekontrolovateln  membr nov  transport iontů, zejména pak průnik v pnicku do nitra buněk („Ca²⁺- overload“). Během peroxidace dochází ke vzniku malondialdehydu (MDA), jehož stanoven  v plazmě se vyu iv  jako marker míry lipoperoxidace.

- Poškození proteinů, které se projevuje jako agregace, fragmentace nebo zesítění. Důsledkem může být porušení a ztráta funkce různých enzymů.
- Poškození DNA, které zahrnuje především modifikaci purinových a pyrimidinových bází, oxidaci deoxyribózy a zlomy v řetězci nukleov  kyseliny. Následkem je chybn  p rov n  bází, porucha translace, inhibice proteosyntézy i genov  exprese a mutace.

K ochrann m systémům organismu proti oxidačnímu stresu pat  antioxidantn  enzymy a neenzymov  skupina antioxidantů a tzv. lapač. Mezi první zm n n  se řadí superoxididismut za, katal za, glutathionperoxidáza (GPx) a další peroxidázy. O SOD a katal ze již bylo napsáno výše. GPx katalyzuje redukci peroxidů spojenou s oxidací glutathionu (GSH) na glutathiondisulfid (GSSG) popsanou níže uvedenou rovnicí. GSH je n sledn  regenerován prostřednictvím glutathionredukt z.



K neenzymov m systémům ochrany proti ROS pat  např. vitamin E ( -tokoferol), vitamin C (askorbát) a další antioxidanty. [26]

1.5. Laboratorní markery

Diagnostika srdečního poškození je založena na stanoven  enzymů a některých kontraktilních proteinů, které se v průběhu nekrot zy dostávají do krevního řečiště. [13]

Většina sou asn  známých kardiomarkerů slou i k detekci nekrot zy myokardu, ale jen p r je schopných detekovat myokardiální ischemii. Mezi n  pat  zejména ischemií modifikovan  albumin, který v roce 2003 uznala FDA jako první marker srdeční ischemie. V literatuře je dále uváděno stanoven  volných mastných kyselin, proteinu

vázajícího mastné kyseliny (fatty acid-binding protein), cholinu a glykogenfosforylázy B. [11, 13]

K požadavkům na ideální marker patří přesnost a výstižnost, opakovatelná reprodukovatelnost za standardních podmínek, vysoká specifita pro buňky myokardu a senzitivita. [12]

1.5.1. Troponiny

Troponiny jsou v současné době nejvíce užívané a doporučené markery nekrózy myokardu. Jejich stanovení se využívá jak při podezření na AIM u člověka, tak pro stanovení kardiotoxicity u experimentálních zvířecích modelů. [12, 16]

Troponiny jsou bílkoviny, které jsou nezbytné pro svalovou kontrakci. Pro diagnostiku se využívají kardiospecifické formy troponinu I a troponinu T (cTnT a cTnI). Ty se odlišují svým aminokyselinovým složením oproti izoformám vyskytujících se v kosterním svalstvu. Přibližně 95% troponinů je vázáno v troponinovém komplexu v myofibrilách, zbytek se vyskytuje volně v cytoplazmě srdečních buněk. Hladina cTnT a cTnI v séru je za normálního stavu téměř nedetekovatelná oproti AIM, kdy vzrůstá až o několik řádů. Rozsah zvýšení je úměrný rozsahu poškození myokardu. Vyšší hladiny troponinů se mohou objevit i u myokarditid, plicní embolie nebo u nemocných s ledvinovým selháním. [3, 11]

1.5.2. Kreatinkináza (CK)

CK katalyzuje fosforylaci kreatinu pomocí ATP a zároveň je schopná vzniklý kreatinfosfát při nedostatku ATP štěpit. Vyskytuje se převážně v cytoplazmě a v mitochondriích buněk kosterního svalstva, myokardu a méně v CNS. CK je dimer existující v podobě 3 izoenzymů – MM, MB a BB (M-muscle, B-brain). Pro diagnostiku AIM se využívalo stanovení katalytické aktivity izoenzymu CK-MB v séru. Dnes je standardem stanovení hmotnostní koncentrace (CK-MB mass), které je citlivější. Zvýšení CK-MB může být způsobeno i chirurgickým zákrokem na srdci či chronickou renální insuficiencí. Z důvodu nízké specifity se stanovení CK-MB mass řadí až na druhé místo, v případech, kdy není možno stanovit troponiny. [11, 27]

1.5.3. Myoglobin

Myoglobin je protein obsahující prostetickou skupinu Hem. Vzhledem k jeho výskytu v cytoplazmě jak kosterní, tak srdeční i hladké svaloviny je to nespecifický, ale za to velmi časný marker nekrózy. Jeho hladiny stoupají ještě dříve než CK-MB. Zvýšený myoglobin se objevuje i při svalových onemocněních, po velké svalové zátěži a při renální insuficienci. [11, 27]

1.5.4. Laktátdehydrogenáza (LD)

LD je oxidačně-redukční enzym existující v podobě 5 izoenzymů a katalyzující přeměnu laktátu na pyruvát. V myokardu je nejvíce zastoupen izoenzym LD₁. LD se vyskytuje v cytosolu buněk mnoha tkání a tudíž není splněn požadavek na orgánovou specifitu. Použití tohoto markeru je dnes již proto považováno za obsolentní. Po AIM přetrvávají zvýšené hladiny LD v séru až 15 dní. Patří tedy k dlouhodobým markerům. [11, 27]

1.5.5. Aspartátaminotransferáza (AST)

AST patří mezi transaminázy. Katalyzuje reverzibilní přenos aminoskupiny z L-aspartátu na 2-oxoglutarát (z aminokyseliny na ketokyselinu). AST není opět kardiospecifická. Kromě myokardu se vyskytuje v hepatocytech, ledvinách, kosterním svalstvu, pankreatu a erytrocytech. Existuje ve 2 izoformách: Mitochondriální (70 %) a cytoplazmatické (30 %). Mitochondriální izoforma se dostává do krve až při nekróze, proto výrazně zvýšená hladina AST v séru svědčí o rozpadu buněk. Její aktivita v séru bývá nejvíce zvýšena při těžkém jaterním poškození, tudíž se jejího stanovení využívá při jaterních testech. Význam stanovení AST u AIM vymizel. [11, 27]

1.5.6. C-reaktivní protein (CRP)

CRP je pentamerická bílkovina syntetizovaná v játrech, která je součástí každé akutní zánětlivé reakce. Reaguje s polysacharidem C pneumokoků. Vznik CRP je odpovědí na zvýšenou produkci prozánětlivých cytokinů uvolňovaných z leukocytů a endotelií (IL-1, IL-6, TNF- α). U zdravého jedince se plazmatická koncentrace pohybuje mezi 3 – 8 mg.l⁻¹. Pro akutní bakteriální infekce je typický rychlý (4 – 10 hodin) a několikanásobný (až stonásobek normy) vzestup hladin. U AIM nebývá elevační vlna tak vysoká a déle zvýšené hodnoty CRP mohou být signálem postinfarktové zánětlivé komplikace. [3, 11]

1.5.7. Ischémií modifikovaný albumin (IMA)

Při ischémií ztrácí N-terminální část albuminu schopnost vázat se na stopové prvky – kobalt, měď a nikl. Předpokládá se, že snížená vazebná kapacita je zapříčiněná vznikem reaktivních forem kyslíku, reperfuzí a acidózou. K zvýšení hladiny IMA dochází již po několika minutách od vzniku ischémie, maxima je dosaženo po 2 – 3 hodinách a hladiny se vrací k normálu za 6 – 12 hodin. I když je stanovení IMA považováno za časný marker AIM při bolesti na hrudi, mohou jeho hladiny teoreticky vzrůstat při jakékoli tkáňové ischémií. Z tohoto důvodu není považován za plně kardiospecifický. [11, 13]

V tab. 1 je uvedena základní charakteristika vybraných laboratorních markerů poškození myokardu.

Tab. 1: Základní charakteristika markerů [11, 27]

Markery	Molekulová hmotnost (kDA)	Doba do počátečního vzestupu hladin (hod)	Vrchol hladin (hod)	Návrat hladin k normálu (dny)
Myoglobin	17,8	1 – 4	6 – 10	0,5 – 1
CK-MB	86	2 – 6	12 – 24	2 – 3
cTnI	23,5	3 – 12	12 – 24	5 – 10
cTnT	37	3 – 12	12 – 48	5 – 14
AST	93	4 – 8	16 – 48	3 – 6
LD	135	6 – 12	24 – 48	10 – 14

2. Katecholaminový model kardiotoxicity

Experimentální modely poškození myokardu u laboratorních zvířat slouží k objasnění patogeneze kardiovaskulárních chorob a při nich probíhajících metabolických, funkčních i strukturních změn. Velmi cenné jsou z hlediska možnosti výzkumu látek majících kardioprotektivní nebo naopak kardiotoxické účinky.

Jedním z takových modelů je katecholaminový model kardiotoxicity. V roce 1959 zkoumali G. Rona a C. Chappel účinek katecholaminů na srdeční sval. Zjistili, že isoprenalin (ISO) aplikovaný v dávkách vyšších než fyziologických vyvolává masivní nekrózu myokardu podobnou infarktu a tímto objevem položili základ celé sérii dalších experimentů. Zároveň poukázali na úzkou souvislost mezi dávkou aplikovaného ISO a stupněm závažnosti nekrózy. [9]

Od té doby bylo provedena a publikována řada dalších studií zabývajících se isoprenalinovým modelem. Jejich vzájemné srovnání ale není jednoduché vzhledem k rozdílným dávkám, délce podávání (akutní/chronická expozice) a cestě podání ISO. [9]

2.1. Isoprenalinový model

K výhodám, pro které je tento model tak často využíván, můžeme zařadit jeho relativně cenovou nenáročnost, jednoduchost a neinvazivní způsob [10, 18] vyvolání srdečního poškození podobného AIM. [9]

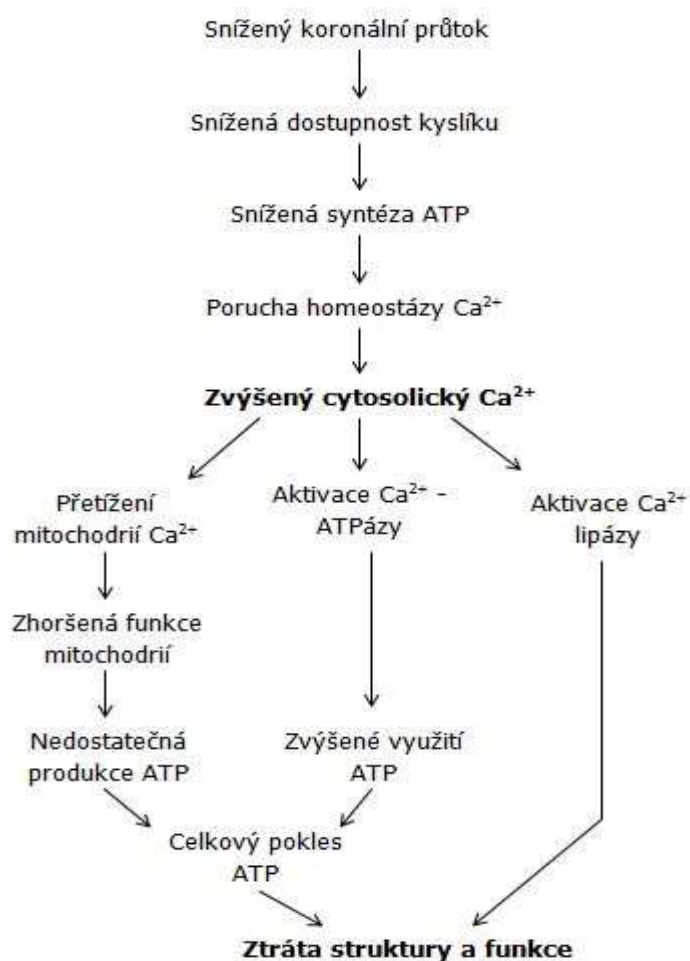
Patogeneze procesu poškození myokardu ISO je multifaktoriální a není doposud plně objasněna. [9, 10]

Svou roli sehrává ischemie. Ta v tomto případě vzniká na podkladě nadměrné stimulace myokardu ISO, následné zvýšené spotřeby O_2 a sníženého koronárního průtoku v důsledku periferní vasodilatace. Dalšími faktory jsou poruchy mikrocirkulace, vyčerpání energetických rezerv, změna propustnosti membrán, zvýšená intracelulární

koncentrace vápníku, oxidační produkty ISO a nadměrná produkce reaktivních forem kyslíku. [9]

Provedené studie dokazují, že významnou roli při ISO vyvolané kardiotoxicitě mají hlavně výše zmíněné ROS a zvýšená intracelulární koncentrace Ca^{2+} . ROS vznikají v důsledku ischemie a prostřednictvím oxidativního metabolismu ISO [20, 23]. Následkem navozeného oxidačního stresu dochází k peroxidaci lipidů a zvýšení membránové permeability.

Přetížení buněk vápníkem vede ke zvýšené kontraktilitě, nárokům na kyslík a vyčerpání energetických zásob (viz obr. 2). Mezi další faktory, které přispívají k ISO navozené kardiotoxicitě patří podle [9] acidóza, zvýšená agregace destiček, zvýšený obsah cyklického adenosinmonofostátu (cAMP) a další.



Obr. 2: Pravděpodobný sled dějů navozených ischemií [17]

Ovlivnění faktorů podílejících se na vzniku poškození myokardu navozeného ISO se stalo předmětem mnohých výzkumů. Inhibicí nadměrného uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula se zabývala studie s dantrolenem. [36] Laktoferrin byl zkoumán z hlediska jeho pozitivního inotropního účinku a inhibice vzniku ROS díky schopnosti chelátovat volné železo. [31] Jako protektivum proti oxidačnímu stresu byla zkoušena např. kyselina gallová [34], flavonoidy rutin [37], niringin [41] a další. Přírodní látky a produkty prokazující preventivní a protektivní roli proti ISO navozené kardiotoxicitě jsou shrnuty v [29].

2.1.1. Histologické změny po aplikaci ISO

Na určitý vztah mezi podanou dávkou ISO a stupněm poškození myokardu bylo poukázáno v [9].

Hned první studie naznačily, že vysoké dávky katecholaminů působící po delší dobu (>24hod) vyvolávají významné poškození myokardu v podobě nekrózy kardiomyocytů, degenerace myofibril, leukocytární infiltrace a vedou k hypertrofii. [21]

V následujícím textu jsou popsány zejména včasné histologické změny navozené jednorázovou aplikací ISO, ke kterým došli autoři vybraných provedených experimentů a jejichž analýza je předmětem praktické části této diplomové práce. Je nutné zmínit, že existuje i celá řada studií zabývajících se histologickými změnami srdeční tkáně navozenými opakovanou expozicí ISO či změnami detekovanými po delší době od jednorázové aplikace ISO v různých dávkách, které mohou vést k srdeční remodelaci, hypertrofii až srdečnímu selhání. [35, 38, 39, 40]

Za velmi přínosnou se dá pokládat studie provedená v roce 1997 Chagoyou a kol. Ve svém experimentu sledovali v průběhu 96 hodin histologické a biochemické změny vznikající po jednorázové s.c. aplikaci 67 mg.kg^{-1} ISO. Došli k závěru, že poškození podobné AIM se objevuje v subendokardiální oblasti hrotu levé komory za 12 až 24 hodin po aplikaci. V průběhu tohoto intervalu pozorovali koagulační nekrózu, fragmentaci svalových vláken, infiltraci polymorfonukleáry, zánětlivé a edematózní změny. Stav předcházející infarktovému označili jako preinfarktový (0 až 12 hodin po

aplikaci). Pro něj je typické prodloužení a zvlnění svalových vláken a počínající nekróza. [19] Postinfarktové změny vyskytující se mezi 24 a 96 hodinou zahrnovaly přítomnost makrofágů, fibroblastů a kolagenních vláken. [19]

V roce 2007 byla v Anglii provedena studie zahrnující více experimentů. Jedním z nich byl průběh změn v časovém rozsahu 1 hodina až 48 hodin po podání ISO v dávce 50 mg.kg^{-1} i.p. Po 4 hodinách autoři zaznamenali první histologické změny v podobě zvýšené eosinofilie společně s lehkými otoky myofibril, po 6 hodinách byl pozorován neutrofilní infiltrát s výraznou eosinofilií a degenerací myofibril. Za 24 hodin již byla patrná mononukleární infiltrace s chronickou degenerací svalových vláken. [28]

K podobným závěrům jako jsou výše popsané dospěla i studie s jednorázovou dávkou 100 mg.kg^{-1} s.c. Mezi histologické změny pozorované po 24 hodinách v podobě četné degenerace svalových buněk patřila fragmentace myofibril a zánětlivá reakce spolu se slabým ložiskovým intersticiálním edémem. Dále byla pozorována výrazná infiltrace leukocytů a eosinofilie cytoplazmy, kondenzace jaderného chromatinu a zbytky nekrotických buněk. [10]

Dokladem, že experimenty s ISO stále pokračují je i studie publikovaná v tomto roce. ISO byl aplikován v dávce 100 mg.kg^{-1} s.c. a interpretace histologických změn probíhala po 30, 60, 120 a 240 minutách. V případě první dvou časových údajů byla pozorována degenerace myofibril. Po 2 hodinách uvádí autoři četnou leukocytární infiltraci a po 4 hodinách již výskyt myokardiální nekrózy. [24]

2.1.2. Biochemické a funkční změny po aplikaci ISO

V této podkapitole jsou uvedeny vybrané změny, ke kterým dochází po podání ISO a jejichž stanovení se běžně využívá pro detekci myokardiálního poškození. Některé markery a látky zde uvedené byly stanoveny i v rámci praktické části této diplomové práce.

Za nejvhodnější markery při modelovém poškození myokardu ISO u laboratorních potkanů a hodnocení kardiotoxického nebo kardioprotektivního účinku zkoumaných látek jsou v současné době považovány cTnT a cTnI. [16] Bylo dokázáno, že zvýšení hladin cTnT a cTnI v séru koresponduje s vývojem histopatologických změn a vykazuje i úzkou souvislost se zvýšenou intracelulární koncentrací Ca^{2+} . [10, 28]

Přítomnost oxidačního stresu navozeného podáním ISO lze detekovat pomocí změn hladin MDA, GSH, vitamínu E a vitamínu C.

MDA se běžně stanovuje jako barevný komplex TBARS (thiobarbituric acid reactive substance), jehož hladiny indikují míru peroxidace lipidů. Po aplikaci ISO dochází k významnému vzestupu hladin TBARS jak v srdeční tkáni, tak i v plazmě. [34, 41] Z časového hlediska zůstávají hladiny během prvních 30 minut stálé, pak mírně narůstají, maxima dosahují po 3 hodinách a k normě se vrací po 24 hodinách. [10, 42]

Aktivita antioxidantních enzymů v ISO poškozeném myokardu byla předmětem mnohých studií, velmi často v souvislosti s výzkumem protektivních látek ovlivňujících oxidační stres. Dávky 85 a 100 $mg \cdot kg^{-1}$ ISO aplikované 2 po sobě následující dny v 24 hodinovém intervalu vedly k významnému poklesu v aktivitě SOD, katalázy i glutathionperoxidázy. [34, 41] Množství GSH vykazuje po expozici ISO také snižující se tendenci. [10, 34, 41]

Hladiny vitamínů E a C jako neenzymových antioxidantů po aplikaci ISO klesají. [10, 31, 34, 41]

Akutně podaný ISO způsobuje díky svým β -agonistickým účinkům vzestup tepové frekvence a pokles krevního tlaku, který je následkem periferní vasodilatace.

Výrazný vzrůst tepové frekvence nastává ihned po aplikaci ISO, zvýšení přetrvává ještě po 24 hodinách a k normálním hladinám se vrací přibližně do 72 hodin. [10, 19]

V případě vývoje hodnot krevních tlaků dochází v prvním okamžiku k určitému vzestupu vysvětlitelnému stresem zvířete, kterému je při experimentu vystaveno. Po 2 minutách nastupuje již velmi výrazná hypotenze. [19] Ve studiích, které se zabývaly stavem navozeným po 24 hodinách od aplikace 100 mg.kg^{-1} ISO, bylo pozorováno určité zvýšení systolického, diastolického i středního tlaku. [10, 31] Autoři tento fakt připisují zapojení kompenzačních mechanismů organismu, zejména aktivaci sympatického systému po ISO navozeném stavu. Nicméně je nutno dodat, že na výši krevního tlaku má vliv mnoho faktorů.

Hodnoty srdečního ATP během prvních 3 hodin po aplikaci ISO výrazně klesají a minima dosahují po 24 hodinách. [19]

3. Isoprenalin

Isoprenalin (synonymum isoproterenol) je syntetický katecholamin. Patří mezi neselektivní β -sympatomimetika. K α -adrenergním receptorům vykazuje velice nízkou až zanedbatelnou afinitu [2, 5]. Neselektivita je hlavním důvodem, proč je jen velmi vzácně užíván terapeuticky.

3.1. Účinky isoprenalinu

Stimulací β_1 -receptorů, které se nacházejí v srdci vyvolává ISO zvýšení srdeční kontraktility a tepové frekvence (pozitivní inotropní a chronotropní účinek). Jeho působením tudíž dochází k vzestupu srdečního výdeje, ale zároveň narůstá i spotřeba kyslíku myokardem. Systolický tlak se lehce zvyšuje nebo zůstává nezměněn [4]. K dalším účinkům patří zrychlený síňokomorový převod a pozitivní bathmotropní efekt. [1, 2, 3]

Interakcí ISO s β_2 -receptory, které se vyskytují v hladkých svalech, dochází k periferní vasodilataci a to zejména u arteriol kosterního svalstva. Důsledkem je pokles celkové periferní rezistence (afterloadu) a snížení diastolického i středního arteriálního tlaku. [1, 2, 3]

Dalším důsledkem stimulace β_2 -receptorů navozené ISO je bronchodilatace.

3.2. Mechanismus účinku

Receptory pro ISO (β_1 a β_2) jsou spřaženy s G-proteinem, jehož prostřednictvím dochází k aktivaci enzymu adenylylcyklázy. Adenylylcykláza katalyzuje tvorbu cAMP, který působí jako intracelulární posel a aktivuje proteinkinázu A. Tento enzym přenáší fosfátové skupiny na serinové a threoninové skupiny efektorových molekul. Dochází tak k fosforylaci enzymů metabolismu, transportních proteinů či dalších regulačních proteinů a transkripčních faktorů. Jedním z důvodů pozitivně inotropního účinku isoprenalinu je právě fosforylace proteinů membránových kalciových kanálů a následná zvýšená koncentrace Ca^{2+} iontů v buňkách myokardu. Mimo to jsou membránové iontové kanály pro Ca^{2+} přímo regulovány samotnými G-proteiny. [5]

3.3. Nežádoucí účinky

ISO může způsobit tachykardii, palpitace, koronární insuficienci a závažné srdeční arytmie. Mezi další nežádoucí reakce patří nervozita, závratě, bolesti hlavy, třes, pocení, poruchy mikce, návaly horka, dušnost a pocení. Vysoké dávky jsou spojeny s poškozením cév, ischemií a nekrózou myokardu. [1, 5]

3.4. 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. [1]

3.5. Indikace

ISO byl dříve díky svým bronchodilatačním účinkům využíván v terapii astma bronchiale. Toto použití je však již v dnešní době obsolentní vzhledem k jeho nežádoucím kardiálním účinkům. [5]

Mezi indikace v akutní medicíně se řadí bradykardie, A-V blokády vyššího stupně nereagující na Atropin a Adamsův-Stokesův syndrom. [1, 5] Nicméně v současnosti u nás není ISO ani v jednom z vyjmenovaných případů užíván. [43]

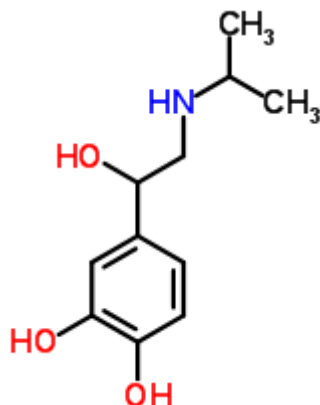
Dnes nachází ISO své uplatnění zejména v experimentální medicíně k navození modelového poškození myokardu laboratorních zvířat a k výzkumům souvisejících s tímto poškozením.

3.6. Struktura

Isoprenalin, systematicky *4-[1-hydroxy-2-(propan-2-ylamino)ethyl]benzene-1,2-diol*, [30] patří mezi přímá sympatomimetika, která působí jako agonisté na adrenergních

receptorech. Jeho struktura (viz obr. 3) je odvozena od β -fenylethylaminu. Pro vazbu sympatomimetik na receptor jsou důležité:

- Fenolické hydroxyly v poloze 3 a 4 aromatického jádra
- Sekundární alkoholická skupina a aromatické jádro
- Bazická aminoskupina [6]



Obr. 3: Isoprenalin [30]

Ve skupině sympatomimetik platí následující vztah mezi strukturou a účinkem:

- Pro přímý účinek je nezbytná hydroxylová skupina (R-konfigurace) na uhlíku, který sousedí s aromatickým jádrem a alespoň jedna fenolická skupina v poloze 3 nebo 4 aromatického jádra. [6]
- Důležitá je aminoskupina, která nemůže být terciární. V případě primární aminoskupiny se projevív pouze α -účinky. Je-li skupina sekundární záleží na substituentu. Při substituci methylem působí látka na α - i β -receptory, v případě substituce vyšším alkylem než ethylem dochází ke zvyšování β -účinku. [6]

4. Praktická část

4.1. Metodika

4.1.1. Zvířata

K experimentu bylo použito 12 dospělých potkaních samců kmene Wistar (Biotest, s.r.o., ČR), kteří byli po 2 týdny chováni ve speciálně klimatizované místnosti ve viváriu Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové s volným přístupem ke standardní peletizované stravě pro hlodavce a pitné vodě. Po uplynutí této doby byla zvířata vážící 330 – 425 g použita k níže popsanému pokusu.

Studie byla provedena 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. Použité látky a přístroje

Při provádění experimentů v laboratoři byly využity následující látky:

- Urethan (Sigma-Aldrich, USA)
- Isoprenalin (Sigma-Aldrich, USA)
- Fyziologický roztok (Braun, Německo)
- Heparin (Zentiva, Česká republika)
- KCl (Sigma-Aldrich, USA)

Dále byly využity následující přístroje:

- Chirurgické nástroje (skalpely, nůžky, peany, nitě,...)
- Tlakový snímač MLT0380/D (AdInstruments, Austrálie)
- PE katetry
- Tlakově-objemový katetr typu Millar (Millar pressure-volume catheter SPR-838 2F, 4E, 9 mm, Millar Instruments Inc., USA)
- EKG končetinové svody II MLA1215 (AdInstruments, Austrálie)
- PowerLab se softwarem LabChart 7 (AdInstruments, Austrálie)

- Elecsys Troponin T STAT Immunoassay (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)
- Beckman DU 640 spectrophotometer (Beckman, Palo Alto, USA)
- Systém P/ACE 5100 (Beckman, Palo Alto, USA)
- HPLC system HP1050 (Hewlett Packard, Německo)

4.1.3. Provedení experimentu

Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin: Isoprenalinové a kontrolní. Po 12 hodinách bez přísunu potravy byla potkanům podána anestezie ve formě i.p. injekce vodného roztoku urethanu v dávce $1,2 \text{ g.kg}^{-1}$.

Skupina, které byl aplikován ISO rozpuštěný ve fyziologickém roztoku v dávce 100 mg.kg^{-1} s.c., zahrnovala 6 potkanů. V kontrolní skupině byl 6 potkanům podán fyziologický roztok v dávce 2 ml.kg^{-1} s.c.

Sledování funkčních parametrů a snímání EKG záznamu probíhalo po dobu 2 hodin od aplikace výše zmíněných látek (s výjimkou prvních 15 minut stabilizace) následujícím způsobem. Tlakový snímač byl propojen s PE katetrem zavedeným do levé kyčelní tepny. Skrz pravou krční tepnu byl do levé srdeční komory zaveden tlakově-objemový katetr typu Millar. Jak tlakový snímač, tak i tlakově-objemový katetr byly společně se subkutánními elektrodami pro EKG končetinové svody napojeny na přístroj PowerLab vybavený softwarem LabChart 7.

Po 2 hodinách byl z břišní aorty odebrán do heparinizované zkumavky (170 IU) krevní vzorek (přibližně 5 ml). Exitus byl navozen podáním intravenózní injekce 1 mM KCl. Z vyjmutého srdce byly odebrány srdeční komory, vloženy do fixační tekutiny a označeny číslem, pod kterým byl každý jednotlivý vzorek zaevidován.

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

Srdeční troponin T (stanovený v $\mu\text{g/l}$), vitamin E (mmol/l) a vitamin C (mmol/l) byly měřeny v séru. V plasmě bylo stanoveno množství MDA ($\mu\text{mol/l}$) a celkový glutathion (mg/g Hb) byl detekován v celé krvi.

Koncentrace cTnT byla stanovena elektrochemiluminiscenční imunoanalýzou pomocí setů Elecsys Troponin T STAT Immunoassay na analyzátoru Elecsys 2010. MDA byl analyzován spektrofotometricky pomocí spektrofotometru Beckman DU 640 jako červený komplex s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS–thiobarbituric acid reactive substance) při 485, 532 a 560 nm. GSH byl stanoven UV detekcí při 200 nm po separaci kapilární elektroforézou. Analýza vitaminu E i vitaminu C byla po deproteinaci provedena pomocí HPLC s fluorimetrickou detekcí.

Zjištěné výsledky byly vyjádřeny jako průměr \pm SEM (standardní chyba průměru). Jednotlivé skupiny byly porovnány Studentovým T-testem pomocí programu GraphPad Prism version 5.0 pro Windows (GraphPad Software, USA).

4.2. Zpracování materiálu pro histologickou analýzu

Standardní postup zpravování materiálu pro histologickou analýzu 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 zhotovených preparátů pod mikroskopem.

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. Za prvé musí umožnit zachování co nejlepší struktury tkáně. Dále musí být schopny do tkáně rychle pronikat a nesmí porušit její barvitelnost. V tomto experimentu byl pro fixaci použit 4% paraformaldehyd rozředěný PBS.

V tab. 2 je uvedeno časové hledisko zpracování vzorku fixovaného ve 4% paraformaldehydu.

Tab. 2: Zpracování vzorku fixovaného ve 4% paraformaldehydu

Použitá látka	Časový horizont
70 % etanol	½ hodiny
70 % etanol	½ hodiny
80 % etanol	3 hodiny
90 % etanol	2 hodiny
96 % etanol	přes noc
aceton I.	½ hodiny
aceton II.	½ hodiny
xylén I.	2 hodiny
xylén II.	4 hodiny
parafin I.	přes noc
parafin II.	přes noc

Odvodnění bylo provedeno pomocí vzestupné alkoholové řady a acetonu. K projasnění, kroku, prováděnému za účelem odstranění etanolu, ve kterém se později použitý parafin nerozpouští, byl použit xylén. Ten je vhodný z důvodu jeho mísitelnosti s etanolem a zároveň schopnosti rozpouštět parafin.

Po projasnění byl vzorek prosycen parafinem a následně byl do tohoto nejčastěji používaného zalévacího média zalit. Z parafínových 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.

Jelikož se k barvení histologických preparátů používají většinou vodné roztoky barviv bylo třeba řezy před barvením odparafinovat postupem popsáním v tab. 3.

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

Tab. 3: Postup odparafinování

Látka	Doba působení
xylén	5 min
xylén	5 min
xylén	5 min
96 % ethanol	5 min
70 % ethanol	5 min
destilovaná voda	5 min
otření sklíček	-

4.2.1. 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 látek a příslušných množství uvedených v tab. 4. Eosin byl použit ve formě svého 1% roztoku v destilované vodě.

Tab. 4: Složení roztoku Hematoxylinu

Látka	Množství
hematoxylin	4,0 g
jodičnan sodný	0,4 g
síran hlinitý	35,2 g
destilovaná voda	710,0 ml
ethylenglykol	250,0 ml
kyselina octová	40,0 ml

Proces barvení zahrnoval kroky uvedené v tab. 5.

Tab. 5: Barvení H-E

Látka	Doba barvení	Poznámka
hematoxylin	6-8 min	-
pramenitá voda	10 min	modření
otření sklíček	-	-
eosin	2 min	-
destilovaná voda	-	opláchnutí

Po vlastním barvení bylo provedeno odvodnění. Nejprve dvojitým opláchnutím v 96% ethanolu, poté aplikováním ethanolu a xylenu v poměru 2:1 na dobu 3 minut a nakonec aplikováním ethanolu a xylenu v poměru 1:2 také na dobu 3 minut.

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.

4.2.2. Zelený trichrom podle Goldnera

Vedle základního barvení preparátů pomocí H-E bylo využito ještě jedné barvicí metody. Výhodou barvení zeleným trichromem podle Goldnera 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

Roztoky (Goldner I, II a III) použité pro toto barvení byly připraveny způsobem popsáním v následujícím textu a tabulkách. Tab. 6 popisuje složení roztoku Goldner I a tab. 7 zachycuje složení roztoku Goldner III.

Tab. 6: Příprava roztoku Goldner I

Látka	Množství	Množství použité pro výsledný roztok
ponceu de xyloidin	1 g	20 ml
koncentr. kyselina octová	1 ml	
destilovaná voda	100 ml	
oranž G	1 g	10 ml
koncentr. kyselina octová	1 ml	
destilovaná voda	100 ml	
Fuchsin S	1 ml	10 ml
koncentr. kyselina octová	1 ml	
destilovaná voda	100 ml	

Roztok Goldner II byl připraven jako 1% vodný roztok kyseliny fosfowolframové .

Tab. 7: Příprava roztoku Goldner III

Látka	Množství
světlá zeleň	1,5 g
kyselina octová ledová	2,0 ml
destilovaná voda	100 ml

Postup barvení byl proveden v následujících krocích.

- 1) První krok zahrnoval odparafinování zhotovených řezů, které proběhlo stejným způsobem jako před barvením H-E dle tab. 3 (viz výše).
- 2) Po odstranění parafinu byly řezy ponořeny na 4 minuty do roztoku Hematoxylinu.
- 3) Pak 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.

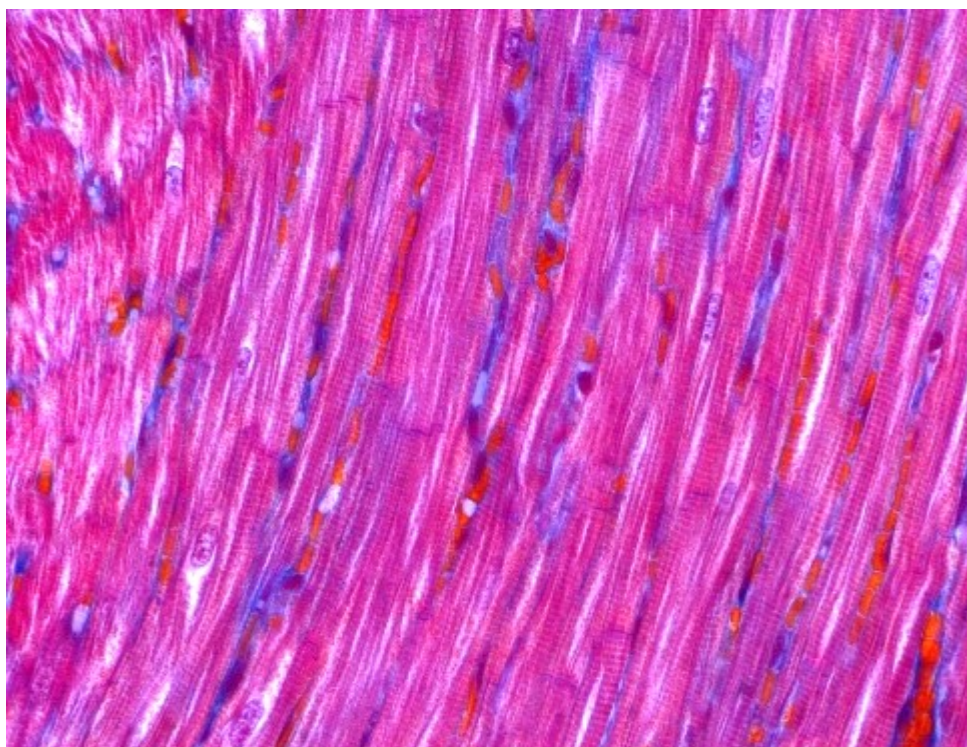
5. Výsledky

5.1. Mortalita

Ve skupině potkanů, které byl aplikován ISO došlo v průběhu snímání funkčních parametrů a EKG k úmrtí 2 zvířat ze 6 (mortalita 33%). Za příčinu lze s největší pravděpodobností pokládat arytmií. V kontrolní skupině přežila všechna zvířata.

5.2. Histologická analýza

K histologické analýze byly použity podélné i příčné řezy levé a pravé srdeční komory. Snímky prezentované v této práci byly vybrány podle charakteristických nálezů u jednotlivých zvířat. Zhotovené 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.



Obr. 4: Struktura myokardu (kontrolní), barvení H-E, zv. 200x

Na obr. 4 je znázorněna struktura kontrolního myokardu bez aplikovaného ISO. 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.

Na hematoxylinových preparátech byly po aplikaci ISO pozorovány jasně patrné dilatace intersticiálních prostorů mezi trámci kardiomyocytů s infiltrací zánětlivých buněk (kulatobuněčný infiltrát), edémem intersticia a překrvenými cévami zachycenými na obr. 5. Denzní fibrinové pruhy se střídají s prázdnými okrsky. Současně pozorovaná eosinofilie a fragmentace buněk myokardu svědčí o počínajících nekrotických změnách.

Výše popsané změny jsou detailněji zachyceny při větším zvětšení na obr. 6, kde je již patrné i postupné mizení jader.

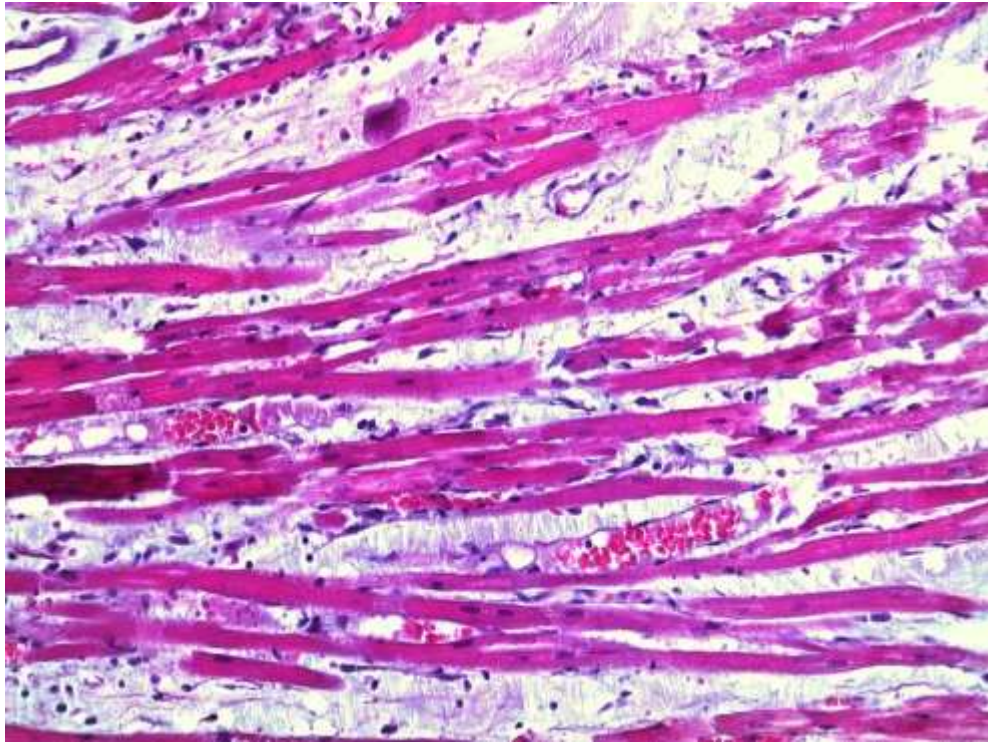
V oblasti endokardu bylo na obr. 7 při barvení H-E pozorováno opět difuzní rozšíření intersticiálního prostoru mezi kardiomyocyty avšak s méně početnou infiltrací oproti obr. 8, kde je infiltrace v oblasti endokardu a chlopní naopak velmi četná. Tuto skutečnost můžeme připisovat individuálním rozdílům.

Na obr. 9 je zachycena populace zánětlivého infiltrátu, která je ještě více zvýrazněna pomocí barvení zeleným trichromem dle Goldnera na obr. 10, kde je viditelný detail komponentů infiltrace prezentovaný makrofágem, plazmatickými buňkami a neutrofily.

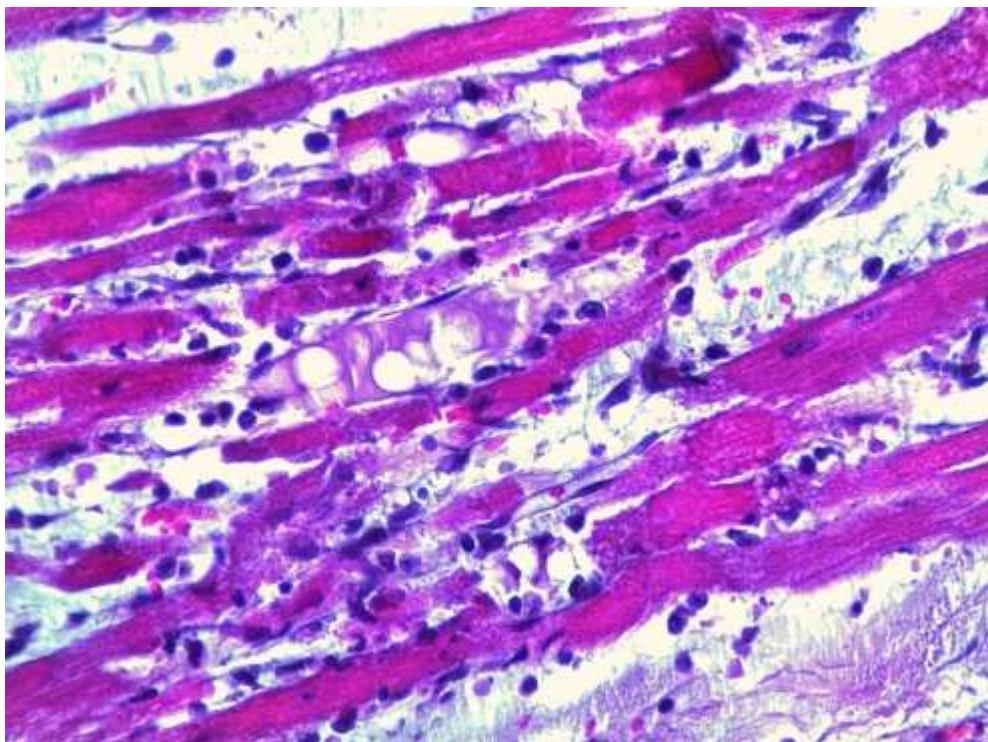
Morfologicky intaktní okrsky se zachovalým příčným pruhováním jsou viditelné na obr. 11.

Naproti tomu obr. 12 zachycuje fragmentace myofibril myokardu, které jsou jasně zřetelné a opět zvýrazněné pomocí barvení zeleným trichromem dle Goldnera.

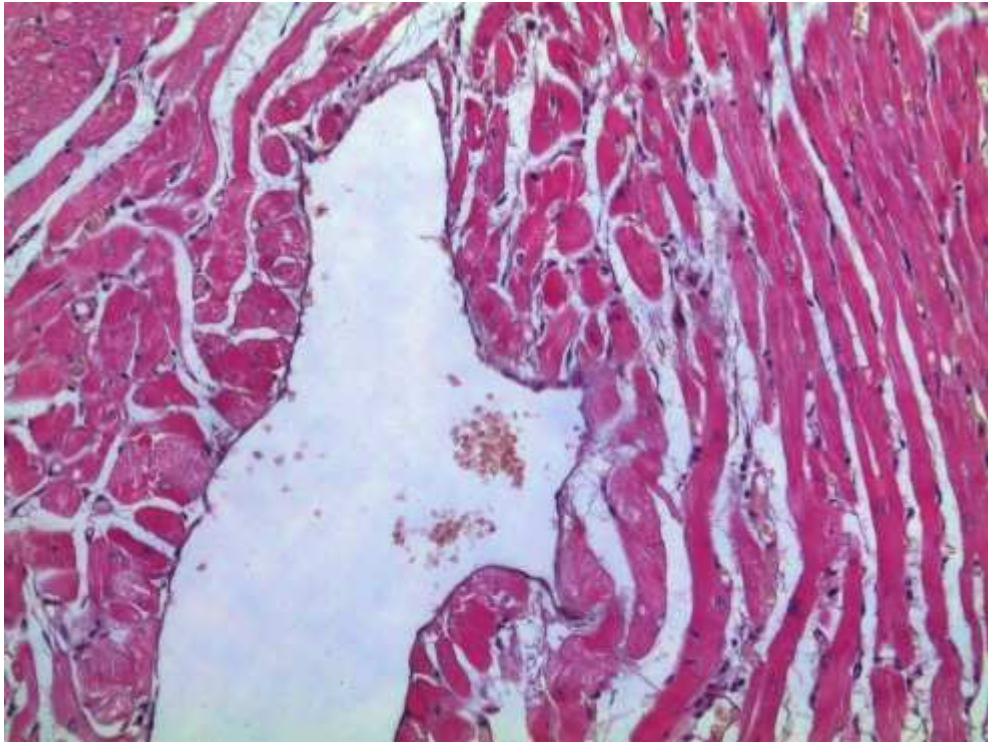
Rozšířené intersticiální prostory mezi kardiomyocyty s jasnou infiltrací jsou dobře viditelné i v oblasti epikardu na obr. 13.



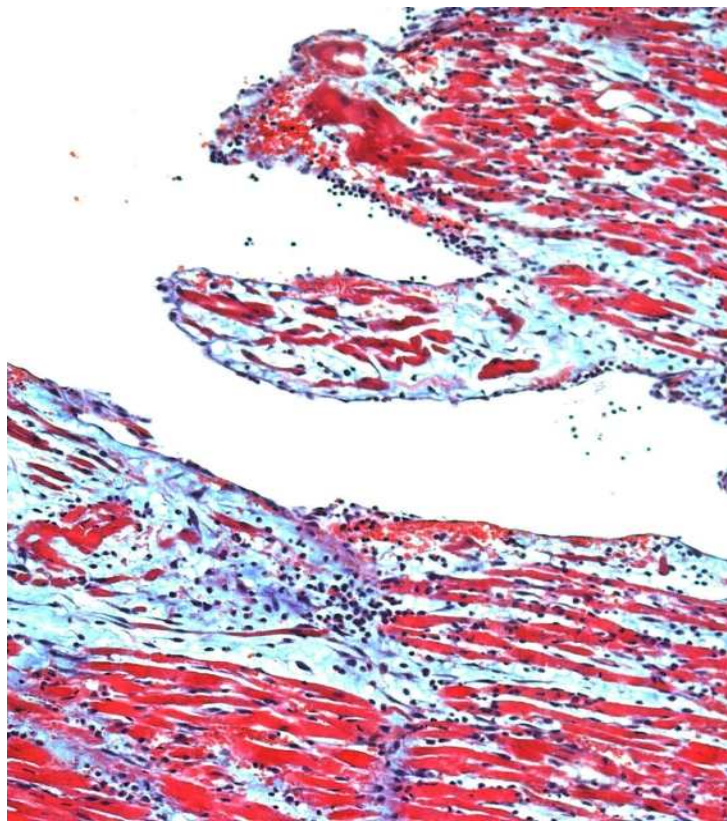
Obr. 5: Struktura myokardu po podání ISO, barvení H-E, zv. 100x



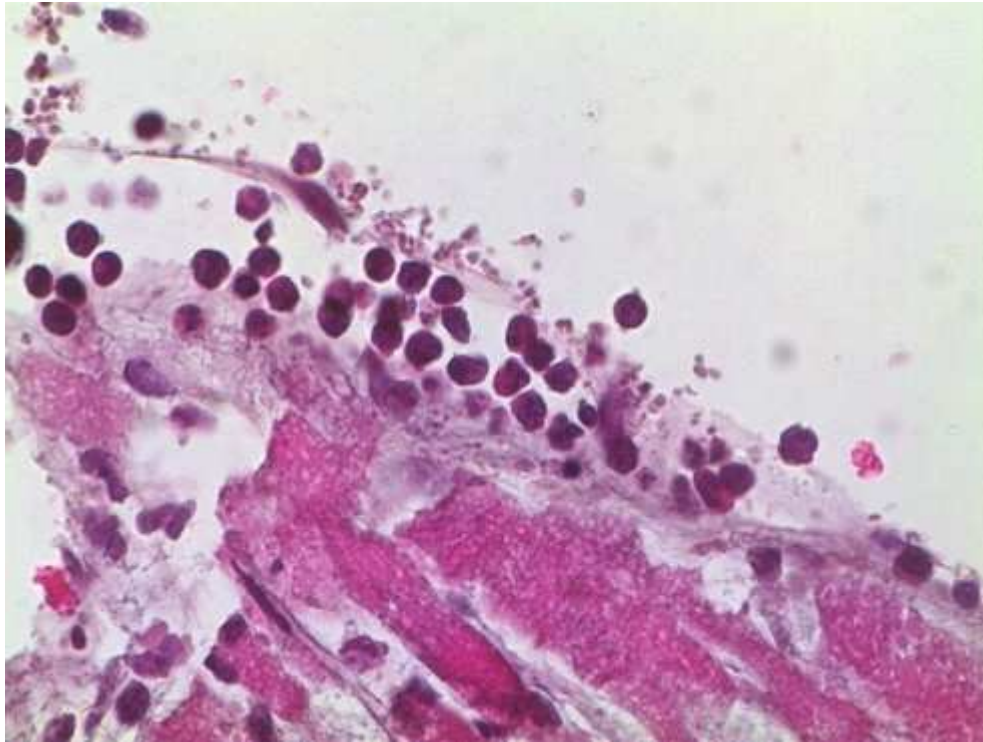
Obr. 6: Struktura myokardu po podání ISO, barvení H-E, zv. 200x



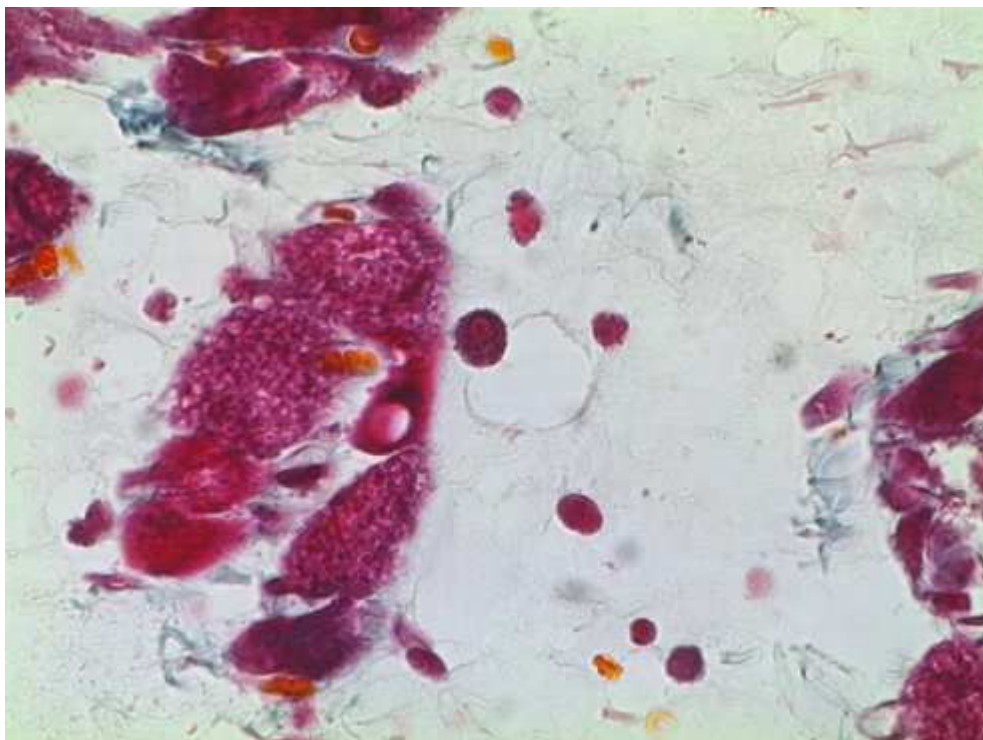
Obr. 7: Struktura endokardu po podání ISO, barvení H-E, zv. 100x



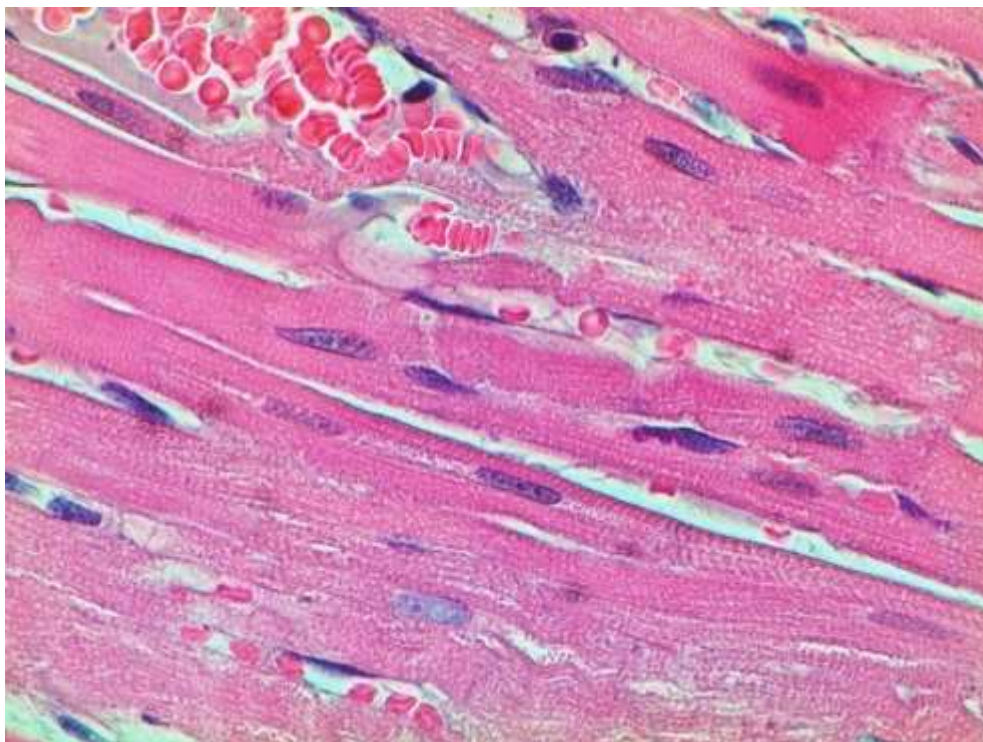
Obr. 8: Struktura endokardu a chlopní po podání ISO, barvení zeleným trichromem dle Goldnera, zv. 40x



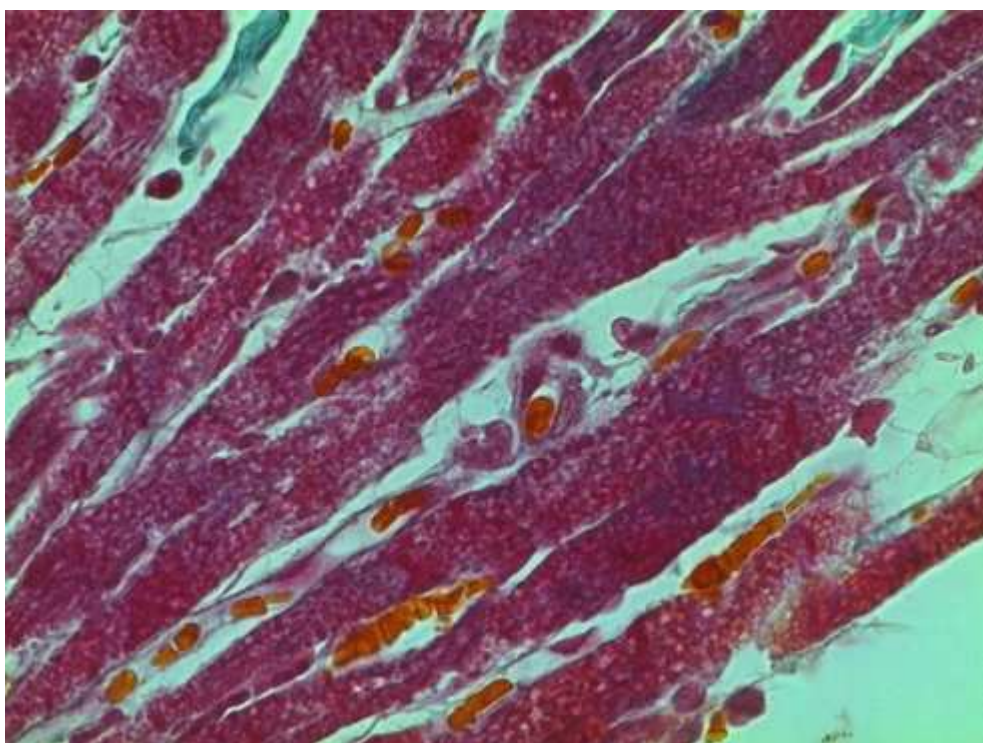
Obr. 9: Zánětlivý infiltrát po podání ISO, barvení H-E, zv. 400x



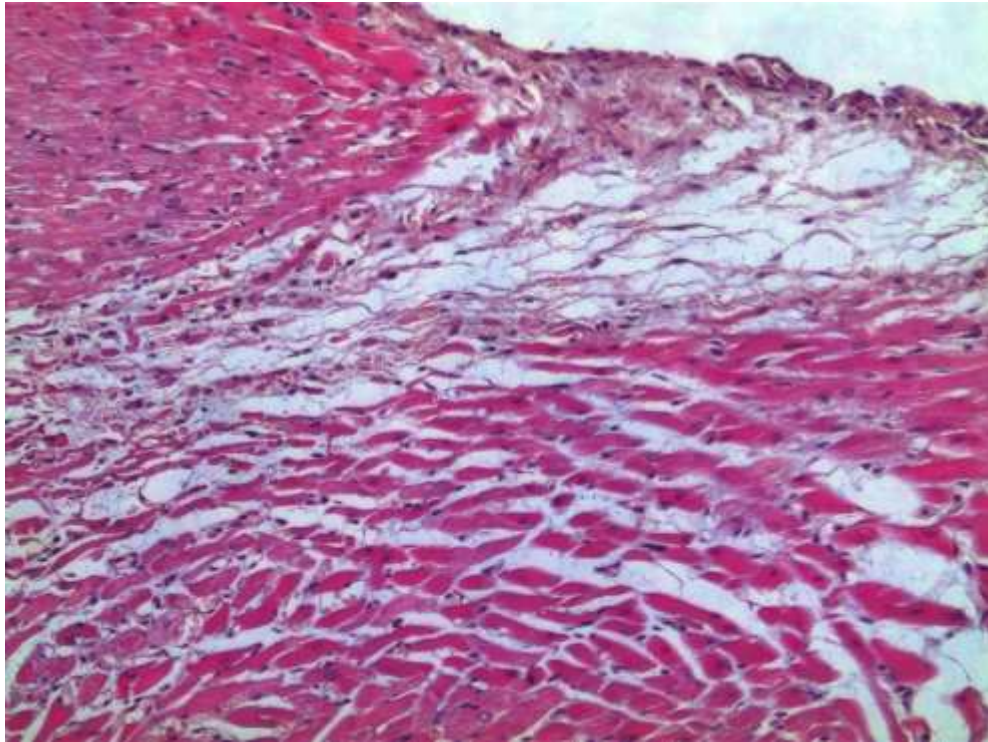
Obr. 10: Detail komponentů zánětlivé infiltrace v endokardu po podání ISO, barvení zeleným trichromem dle Goldnera, zv. 400x



Obr. 11: Intaktní okresek myokardu po podání ISO, barvení H-E, zv. 400x



Obr. 12: Fragmentace myofibril myokardu po podání ISO, barvení zeleným trichromem dle Goldnera, zv. 400x



Obr. 13: Struktura epikardu po podání ISO, barvení H-E, zv. 100x

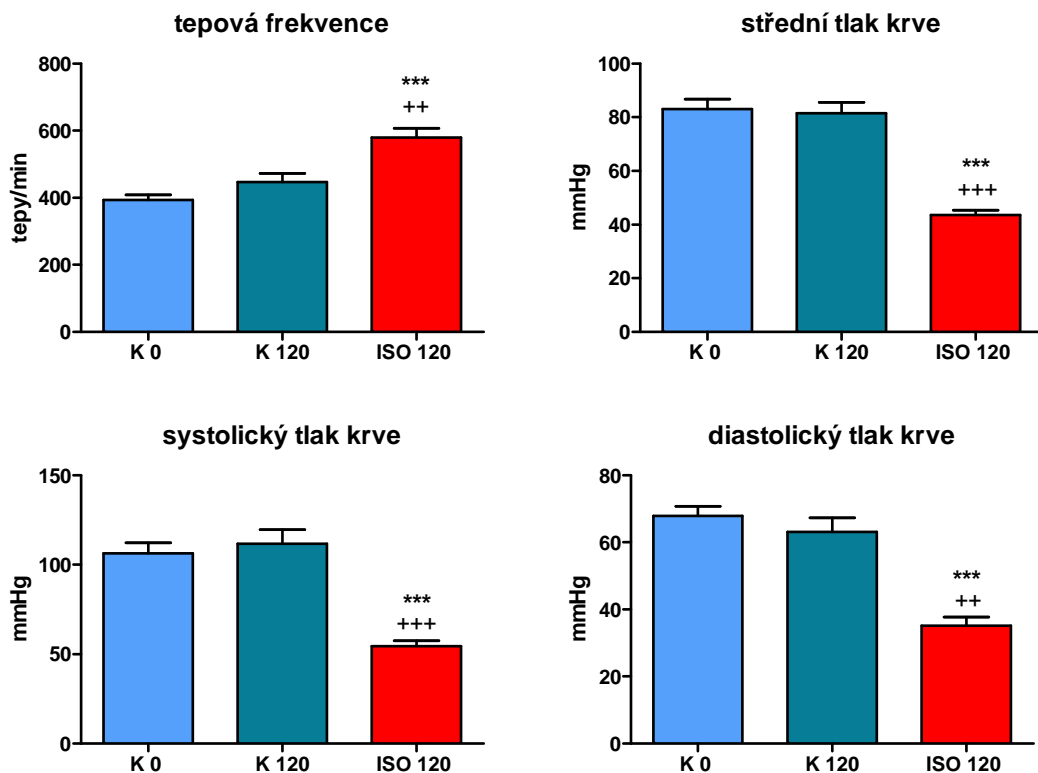
V tab. 8 je shrnuto semikvantitativní zastoupení histopatologických změn, které bylo pozorováno po 2 hodinách od aplikace ISO.

Tab. 8: Semikvantitativní analýza histopatologických změn v srdci laboratorního potkana po 2 hodinové expozici ISO

Typ poškození	Kontrola			ISO		
	endokard	myokard	epikard	endokard	myokard	epikard
Lokální kapilární hyperemie	-	++	-	++	++	++
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

5.3. Funkční parametry

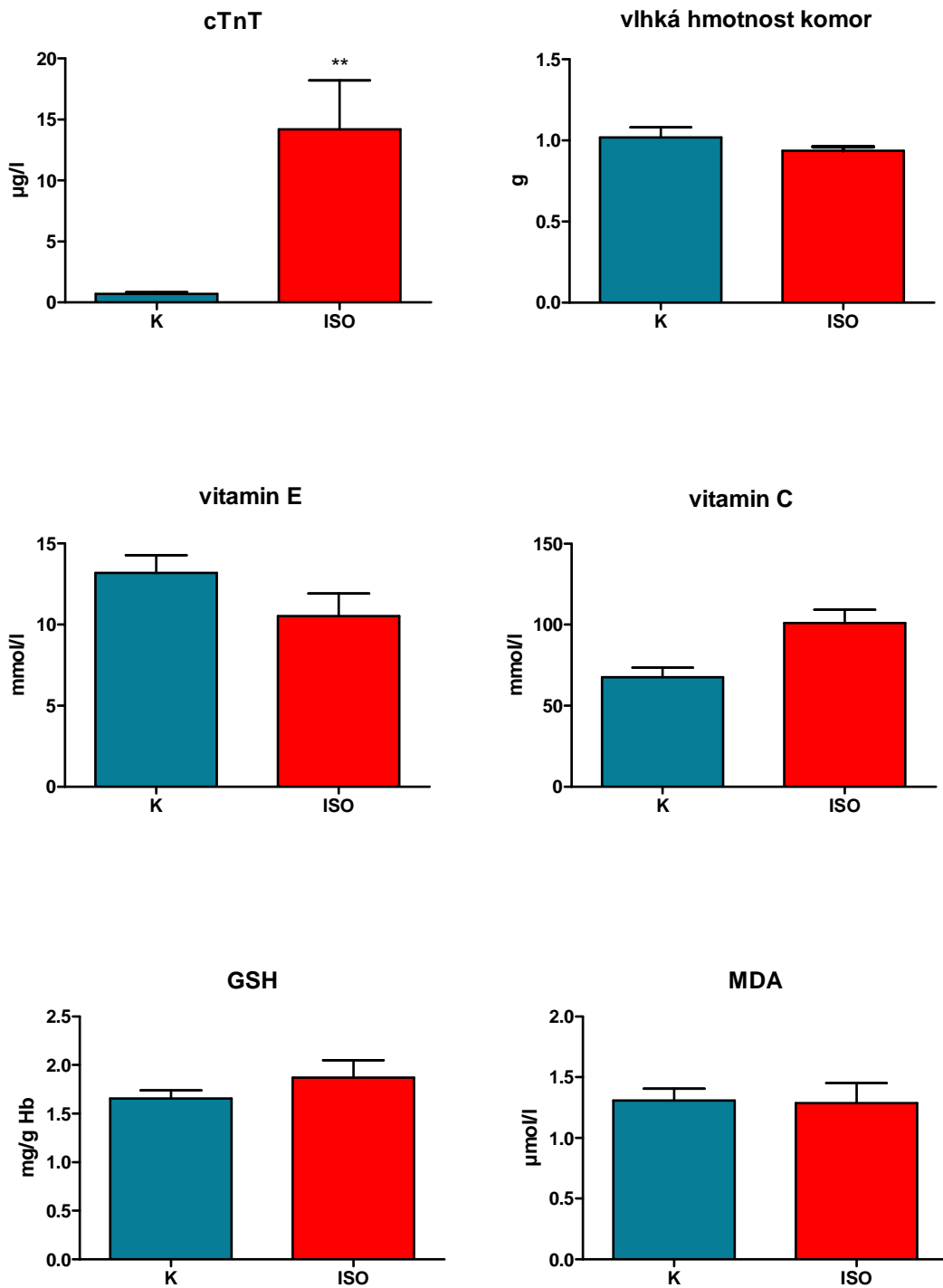


Obr. 14: Tepová frekvence a krevní tlaky po aplikaci ISO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$ vs. skupina K 0, + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ a +++ $p < 0.001$ vs. skupina K 120

V čase 0 minut nebyl rozdíl mezi kontrolní (K) a ISO skupinou, proto je zobrazena jen kontrolní skupina v čase 0. Ve skupině potkanů, které byl aplikován ISO v dávce 100 mg.kg^{-1} s.c. byl po 2 hodinách (ISO 120) zaznamenán signifikantní a statisticky významný nárůst tepové frekvence (viz obr. 14). Tento výsledek byl pozorován jak oproti hodnotám naměřeným před aplikací látek (K 0), tak i oproti hodnotám kontrolní skupiny po 2 hodinách (K 120), které byl aplikován fyziologický roztok.

V případě krevních tlaků došlo k statisticky významnému snížení jak systolického, středního, tak i diastolického tlaku oproti stavu před aplikací i oproti kontrolní skupině po 2 hodinách od aplikace (viz obr. 14).

5.4. Biochemické markery a vlhká hmotnost komor



Obr. 15 Hladiny biochemických markerů a vlhká hmotnost komor u kontrolní (K) a ISO skupiny po 2 hodinách od aplikace. ** $p < 0.01$

Po 2 hodinách od aplikace ISO došlo k určitým změnám v hladinách biochemických markerů oproti kontrolní skupině. Jako signifikantní se projevila zvýšená hladina cTnT v séru. Změny hladin markerů oxidačního stresu (vitamin E, vitamin C, GSH a MDA) nebyly po zpracování naměřených dat prokázány jako statisticky významné (viz obr. 15).

Stejný výsledek byl zaznamenán i v případě vlhké hmotnosti komor. Nastalá změna na obr. 15 se opět neprojevila jako signifikantní.

6. Diskuze

Mezi současné nejčastější příčiny úmrtnosti patří i přes výrazné pokroky v medicíně kardiovaskulární choroby. Bylo zjištěno, že ISO podávaný laboratorním zvířatům po delší dobu nebo ve vyšších dávkách navozuje poškození myokardu s výsledkem nekrózy, která je velmi podobná AIM u člověka. Této skutečnosti se využívá při objasňování etiopatogeneze AIM a studiu kardioprotektivních látek. Studií zabývajících se isoprenalinový modelem je celá řada. V tomto experimentu, který proběhl v rámci výzkumu kardioprotektiv na Katedře farmakologie a toxikologie byly pozorovány včasné změny, ke kterým dochází po 2 hodinách od aplikace ISO v dávce $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.c. Histologické změny byly doplněny o nálezy funkční a biochemické.

Podání ISO, který patří mezi neselektivní β -sympatomimetika, vede okamžitě ke zvýšení tepové frekvence a k vasodilataci spojené s následnou hypotenzí. [19] Tepová frekvence vykazovala v tomto experimentu po 2 hodinách statisticky významný nárůst oproti skupině kontrolní, který je v souladu s poznatky uvedenými ve studiích [10, 19], kde tepová frekvence zůstala zvýšená ještě po 24 hodinách. Krevní tlaky – jak systolický, tak střední i diastolický zaznamenaly po 2 hodinách od aplikace ISO signifikantní pokles. Tento fakt je také v souladu s již provedenými studiemi [19]. Určité zvýšení krevních tlaků nebo jejich krátkodobý návrat k normálu byl pozorován v [10, 19, 31] přibližně až po 24 hodinách. Autoři tento fakt připisují zapojení kompenzačních mechanismů organismu, zejména pak aktivaci sympatiku. Je nutno poznamenat, že krevní tlak i tepová frekvence jsou funkční parametry, které jsou ovlivňovány řadou faktorů. Jedním z nich je určitě i stres, kterému je zvíře v průběhu experimentu vystaveno.

V případě stanovovaných biochemických markerů byly po aplikaci ISO zaznamenány určité změny jejich hladin oproti skupině kontrolní. Po zpracování naměřených dat se jako statisticky významná projevila pouze změna cTnT.

Hladina cTnT v séru vykazovala oproti kontrolní skupině po 2 hodinách signifikantní vzestup. Vzhledem k dosavadním poznatkům o srdečních troponinech jako

nejvhodnějších markerech srdečního poškození [16] i korelaci jejich hladin s vývojem histopatologických změn a obsahem intracelulárního Ca^{2+} [10, 28] se dala tato skutečnost prezentovaná zvýšením hladin předvídat.

MDA, jako produkt peroxidace lipidů a tudíž jeden z markerů oxidačního stresu vyvolaného reaktivními formami kyslíku [10, 26], nevykázal téměř žádnou změnu hladin v plazmě oproti kontrolní skupině. Hladiny GSH v ISO skupině oproti tomu projevily určitou tendenci k vzestupu. Tyto výsledky by nasvědčovaly faktu, že oxidační stres se po 2 hodinách od aplikace ISO ještě neprojevil nebo naopak již byl kompenzován.

O nepřítomnosti oxidačního stresu by svědčily i změny sérových hladin antioxidantů v podobě vitamínu E a vitamínu C, které se také neukázaly jako signifikantní. Množství vitamínu E mělo po 2 hodinách v ISO skupině oproti skupině kontrolní tendenci k poklesu, zatímco hladina vitamínu C zaznamenala určitý nárůst. Provedené experimenty s ISO [10, 31], které studovaly proběhlé změny až po 24 hodinách, prokázaly pokles hladin vitamínu E i vitamínu C. Ke stejnému závěru v podobě poklesu obou vitamínů došly i studie [34, 41].

V případě vlhké hmotnosti komor došlo k určitému poklesu, který by svědčil o faktu, že edematózní změny vznikající po 2 hodinách od aplikace ISO nejsou ještě takové, aby se zvýšená hmotnost projevila.

Histopatologická analýza odhalila výraznější a četnější změny než studie [19], ve které byl potkanům aplikován ISO v dávce $67 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ s.c.}$, což se ale vzhledem k vyšší použité dávce dalo očekávat. Lokalizace změn, která byla patrnější v subendokardiální oblasti a zejména pak v oblasti hrotu, je v souladu s již publikovanými výsledky [10, 19, 24]. Podání ISO v dávce $100 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ s.c.}$ vedlo po 2 hodinách k histopatologickým změnám v podobě lokální kapilární hyperemie, eosinofilie cytoplazmy, difúzního rozšíření intersticiálních prostorů mezi trámci kardiomyocytů, zduření vláken pojiva, počínající fragmentace svalových vláken a přítomnosti kulatobuněčného infiltrátu. Kvantita zastoupených změn byla výraznější v endokardu, nicméně ve složkách

myokardu bylo pozorováno rovněž edematózní rozšíření, dále kulatobuněčná infiltrace a fragmentace svalových vláken. Uvedené změny byly individuálně rozdílné, což by se dalo vysvětlit různou citlivostí a i hmotností jednotlivých zvířat, která se pohybovala v rozpětí od 330 do 425 g. Těmto tvrzením nasvědčují i snímky prezentované v této práci, na kterých jsou zobrazené jak intaktní okrsky, tak změny mírnější i závažnější. Jako příklad lze uvést přítomnost makrofága na jednom z uvedených obrázků. Tuto skutečnost pozorovali ve studii [19] při dávce 67 mg.kg^{-1} až po 24 hodinách. Během první až třetí hodiny uvádí autoři pouze protažení a zvlnění svalových vláken. Oproti tomu studie publikovaná v tomto roce s dávkou 100 mg.kg^{-1} prezentuje změny výraznější, které by odpovídaly i výsledkům této diplomové práce. Hasic a kol. uvádí po 2 hodinách přítomnost neutrofilního infiltrátu, fragmentaci kardiomyocytů a po 4 hodinách již výskyt masivní myokardiální nekrózy. [24]

Závěr

V této studii bylo prokázáno, že aplikace isoprenalinu v dávce 100 mg.kg^{-1} s.c. vede po 2 hodinách k významným histologickým změnám v myokardu laboratorního potkana oproti skupině kontrolní, které byl podán pouze fyziologický roztok. Pozorované změny v podobě lokálního překrvení, zvýšené eosinofilie cytoplazmy, difúzního rozšíření intersticiálních prostorů mezi trámci kardiomyocytů, přítomnosti polymorfonukleárního infiltrátu a počínající fragmentace svalových trámců byly čtenější v subendokardiální oblasti a v oblasti hrotu.

Histologické nálezy byly potvrzeny signifikantním zvýšením cTnT v séru, který byl společně s ostatními biochemickými markery (MDA, GSH, vitamin C a vitamin E) stanoven ve spolupráci s ÚKBD FN HK.

V případě funkčních parametrů byl v isoprenalinové skupině po 2 hodinách zaznamenán statisticky významný nárůst tepové frekvence oproti skupině kontrolní. Signifikantním se ukázalo i snížení systolického, středního a diastolického tlaku.

Seznam obrázků

Obr. 1: Vznik reaktivních forem kyslíku [33]	14
Obr. 2: Pravděpodobný sled dějů navozených ischemií [17]	20
Obr. 3: Isoprenalin [30]	27
Obr. 4: Struktura myokardu (kontrolní), barvení H-E, zv. 200x	36
Obr. 5: Struktura myokardu po podání ISO, barvení H-E, zv. 100x	38
Obr. 6: Struktura myokardu po podání ISO, barvení H-E, zv. 200x	38
Obr. 7: Struktura endokardu po podání ISO, barvení H-E, zv. 100x.....	39
Obr. 8: Struktura endokardu a chlopní po podání ISO, barvení zeleným trichromem dle Goldnera, zv. 40x.....	39
Obr. 9: Zánětlivý infiltrát po podání ISO, barvení H-E, zv. 400x	40
Obr. 10: Detail komponentů zánětlivé infiltrace v endokardu po podání ISO, barvení zeleným trichromem dle Goldnera, zv. 400x.....	40
Obr. 11: Intaktní okrsek myokardu po podání ISO, barvení H-E, zv. 400x.....	41
Obr. 12: Fragmentace myofibril myokardu po podání ISO, barvení zeleným trichromem dle Goldnera, zv. 400x	41
Obr. 13: Struktura epikardu po podání ISO, barvení H-E, zv. 100x	42
Obr. 14: Tepová frekvence a krevní tlaky po aplikaci ISO.	44
Obr. 15 Hladiny biochemických markerů a vlhká hmotnost komor u kontrolní (K) a ISO skupiny po 2 hodinách od aplikace.....	45

Seznam tabulek

Tab. 1: Základní charakteristika markerů [11, 27]	18
Tab. 2: Zpracování vzorku fixovaného ve 4% paraformaldehydu	31
Tab. 3: Postup odparafinování	32
Tab. 4: Složení roztoku Hematoxylinu	32
Tab. 5: Barvení H-E.....	33
Tab. 6: Příprava roztoku Goldner I.....	34
Tab. 7: Příprava roztoku Goldner III	34
Tab. 8: Semikvantitativní analýza histopatologických změn v srdci laboratorního potkana po 2 hodinové expozici ISO	43

Seznam použitých zkratek

AIM	akutní infarkt myokardu
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CK	kreatinkináza
CK-MB	kreatinkináza – MB (muscle, brain)
CNS	centrální nervová soustava
CRP	C-reaktivní protein
cTnI	srdeční troponin I
cTnT	srdeční troponin T
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EKG	elektrokardiogram
FDA	Food and drug administration
GSH	glutathion
GSSG	glutathiondisulfid
GPx	glutathionperoxidáza
H-E	hematoxylin-eosin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IL	interleukin
IMA	ischémií modifikovaný albumin
ISO	isoprenalin
kDA	kilodalton
LD	laktátdehydrogenáza
MDA	malondialdehyd
MK	mastné kyseliny
PBS	phosphate buffered saline
ROS	reaktivní formy kyslíku
SOD	superoxiddismutáza
TBARS	thiobarbituric acid reactive substance
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa

Seznam použité literatury

- [1] ŠPINAR, J. et al. *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění*. Praha, Grada Publishing, 2004. 248 s.
- [2] DART, R. C. et al. *Medical toxicology*. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins, 2004. 1914 s.
- [3] ŠTEJFA, M. et al. *Kardiologie*. Praha, Grada Publishing, 2007. 722 s.
- [4] FINKEL, R. C. et al. *Pharmacology*. [s.l.], Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 564 s.
- [5] LINCOVÁ, D.; FARGHALI, H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Druhé, doplněné a přepracované vydání. Praha, Galén, 2007. 672 s.
- [6] DOLEŽAL, M. et al. *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. Praha, Karolinum, 2009. Adrenomimetika, s. 8-13.
- [7] VOJÁČEK, J.; KETTNER, J. *Klinická kardiologie*. Hradec Králové, Nucleus HK, 2009. 925 s.
- [8] ASCHERMANN, M. et al. *Kardiologie*. Praha, Galén, 2004. 1481 s.
- [9] RONA, G. Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol*. 1985, 17, s. 291-306.
- [10] MLADENKA, P. et al. Cardiac biomarkers in a model of acute catecholamine cardiotoxicity. *Human & experimental toxicology*. 2009, 28, 10, s.631-640.
- [11] SCHNEIDERKA, P. Laboratorní markery srdečních chorob. *Klin Biochem Metab* 2006, 14, 35, s. 161-167.
- [12] KETTNER, J. Nové biomarkery v akutní kardiologii. *Interv akut kardiol*. 2008, 7, 5, s. 193-199
- [13] DUŠEK, J. et al. Markery myokardiální ischemie: slepá ulička nebo budoucnost laboratorní diagnostiky v kardiologii ?. *Interv Akut Kardiol*. 2010, 9, 4, s. 190-194.
- [14] OŠŤÁDAL, B. et al. Development of Cardiac Sensitivity to Oxygen Deficiency: Comparative and Ontogenetic Aspects. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* [online]. 1999, 3, 79, [cit. 2011-06-16]. p. 635-659. Dostupný z WWW: <<http://physrev.physiology.org/content/79/3/635.full.pdf>>.

- [15] OŠŤÁDAL, B.; KOLÁŘ, F. *Cardia Ischemia: From Injury to Protection*. [s.l.] : Springer, 1999. 173 s. ISBN 978-0792386421.
- [16] ADAMCOVÁ, M. et al. Troponin as a marker of myocardial damage in drug-induced cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf.* 2005, 3, 4, s. 457-472.
- [17] NAYLER, W. G. The Role of Calcium in the Ischemic Myocardium. *Am J Pathol.* 1981, 102, s. 262-270.
- [18] HASENFUSS, G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular research.* 1998, 39, 1, s. 60-76.
- [19] CHAGOYA DE SÁNCHEZ, V. et al. Sequential changes of energy metabolism and mitochondrial function in myocardial infarction induced by isoproterenol in rats: a longterm and integrative study. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997, 75, s. 1300-1311.
- [20] SINGAL, P. K. et al. Influence of reducing agents on adrenochrome-induced changes in the heart. *Arch Pathol Lab Med.* 1981, 105, s. 664-669.
- [21] RONA, G. et al. An infarkt like myocardial lesion and other toxic manifestations produced by isoproterenol in the rat. *Arch. Pathol.* 1959, 67, s. 443-445.
- [22] ROSANO, G. M. C. et al. Cardiac metabolism in myocardial ischemia. *Current pharmaceutical design.* 2008, 14, 25, s. 2551-2562. ISSN 1381-6128.
- [23] DHALLA, N. S. et al. Role of catecholamine oxidation in sudden cardiac death.. *Fundamental & clinical pharmacology.* 2010, 24, 5, s. 539-546. ISSN 0767-3981.
- [24] HASIC, S. et al. Time-dependent responses of rat troponin I and cardiac injury following isoproterenol administration. *Medicinski glasnik.* 2011, 8, 1, s. 140-145. ISSN 1840-0132.
- [25] ŠTEINER, I. *Kardiopatologie pro patology i kardiology*. Praha, Galén, 2010. Ateroskleróza a ischemická choroba srdce, s. 23-36.
- [26] BANDYOPADHYAY, U. et al. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Current Science.* 1999, 77, 5, s. 658-666.
- [27] ZIMA, T. *Laboratorní diagnostika*. Praha, Galén, 2002. 728 s.

- [28] YORK, M. et al. Characterization of Troponin Responses in Isoproterenol-Induced Cardiac Injury in the Hanover Wistar Rat. *Toxicologic Pathology*. 2007, 35, s. 606-617.
- [29] UPAGANLAWAR, A. et al. Isoproterenol Induced Myocardial Infarction: Protective Role of Natural Products. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 2011, 6, 1, s. 1-17.
- [30] ChemSpider [online]. 2010 [cit. 2011-06-30]. Isoprenaline. Dostupné z WWW: <<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3647.html>>.
- [31] MLADĚNKA, P. et al. The effects of lactoferrin in a rat model of catecholamine cardiotoxicity. *Biometals*. 2009, 22, s. 353-361.
- [32] CÍFKOVÁ, R. *Zdravotnické noviny* [online]. 4.5.2006 [cit. 2011-07-07]. Epidemiologie kardiovaskulárních onemocnění. Dostupné z WWW: <<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina-priloha/epidemiologie-kardiovaskularnich-onemocneni-172591>>.
- [33] TOUYZ, R. M.; BERRY, C. Recent advances in angiotensin II signaling. *Braz J Med Biol Res*. 2002, 35, 9, s. 1001-1015. Dostupný také z WWW: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-879X2002000900001&script=sci_arttext>.
- [34] RISCILLA, D. H.; PRINCE, P. S. M. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions*. 2009, 179, s. 118-124.
- [35] BROOKS, W. W.; CONRAD, Ch. H. Isoproterenol-Induced Myocardial Injury and Diastolic Dysfunction in Mice: Structural and Functional Correlates. *Comparative Medicine*. 2009, 59, 4, s. 339-343.
- [36] ACIKEL, M. et al. Protective effects of dantrolene against myocardial injury induced by isoproterenol in rats: biochemical and histological findings. *International Journal of Cardiology*. 2005, 98, s. 389-394.
- [37] PRINCE, P. S. M.; 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, 649, s. 229-235.

- [38] FENG, W.; LI, W. The study of ISO induced heart failure rat model. *Experimental and Molecular Pathology*. 2010, 88, s. 299-304.
- [39] TEERLINK, J.R. et al. Progressive ventricular remodeling in response to diffuse isoproterenol- induced myocardial necrosis in rats. *Circulation Research*. 1994, 75, s. 105-113.
- [40] GRIMM, D. et al. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin–angiotensin system. *Cardiovascular Research*. 1998, 37, s. 91-100.
- [41] RAJADURAI, M.; 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, 228, s. 259–268.
- [42] ROTH, E. et al. Lipid peroxidation and scavenger mechanism in experimentally induced heart infarcts.. *Basic Res Cardiol*. 1985, 80, s. 530-536.
- [43] SLÍVA, J.; VOTAVA, M. *Farmakologie*. Praha, Triton, 2010. 240 s.