

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

Mechanismy a regulace transportu transferinu a železa u potkana.
(diplomová práce)

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

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Květen, 2006

Pavla Tomalová

Děkuji panu doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení a pomoc při sestavování diplomové práce. Dík patří také Mgr. Přemyslu Mladěnkovi za pomoc při provádění experimentu a jeho vyhodnocení. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Pavlíně Jabůrkové za ochotu a cenné rady při zpracovávání praktické části diplomové práce. Pro tuto práci byly čerpány prostředky z grantu GA UK 94/2006/C/Faf. Poděkování patří taktéž kolektivu Katedry biologických a lékařských věd a Katedry farmakologie a toxikologie FaF UK za odbornou i jinou spolupráci na experimentu.

Obsah.....	1
1. ÚVOD.....	4
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1 Železo v organismu.....	8
2.1.1 Charakteristika železa.....	8
2.1.2 Metabolismus železa.....	9
2.1.3 Patologické stavy železa.....	13
2.1.4 Toxicita železa.....	14
2.2 Oxidační stres v těle.....	18
2.2.1 Charakteristika.....	18
2.2.2 Systémy tvorby ROS.....	20
2.2.3 Vlastnosti a úloha volných radikálů.....	22
2.3 Myokardiální ischemie a reperfúze.....	26
2.3.1 Role kyslíku v myokardiální energetice a metabolismu.....	26
2.3.2 Patogeneze ischemie/reperfúze.....	27
2.4 Obranné mechanismy vůči oxidačnímu stresu.....	32
2.4.1 Antioxidační systém.....	32
2.4.2 Chelatační terapie.....	34
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
3.1 Metodická část.....	39
3.1.1 Zvířata.....	39
3.1.2 Chemikálie, přístroje a nástroje.....	39
3.1.3 Pilotní studie podání laktoferinu.....	40
3.1.4 Model akutního infarktu myokardu.....	41
3.1.5 Podání laktoferinu.....	43
3.2 Histologické zpracování odebraných vzorků.....	45
3.2.1 Chemikálie, přístroje a nástroje.....	45
3.2.2 Zpracování materiálu pro histologickou analýzu.....	47
3.2.3 Histologická barvení pro světelnou mikroskopii.....	50
4. VÝSLEDKY.....	55
4.1 Pilotní studie.....	56
4.2 Vliv laktoferinu na model akutního IM.....	57
5. DISKUSE.....	68
6. ZÁVĚR.....	71
7. POUŽITÉ ZKRATKY.....	73
8. LITERATURA.....	76

1. ÚVOD

Železo je pro život nezbytný kovový prvek, který plní v organismu mnoho vitálních funkcí. Je esenciální pro buněčný metabolismus a funkci životně důležitých enzymů. Normálně jsou tkáňové hladiny železa precizně regulovány, aby se minimalizovaly potenciální toxické efekty katalyticky aktivního železa. (1, 4) Zvýšené množství železa (akutní i chronické) je spojeno s počtem chorobných stavů. V několika epidemiologických studiích vystupuje železo jako potentní rizikový faktor chronické srdeční choroby, zvýšené hladiny železa v těle se spojují se zvýšeným rizikem infarktu myokardu. Železo je přechodný kov, který v redox aktivní formě podněcuje oxidační stres a tkáňové poškození katalyzováním toxických redoxních reakcí, které produkují volné radikály. Železo je proto přes lipidovou peroxidaci zahrnuto do patogeneze aterosklerózy. (31, 32, 34) Kardiomyopatie z předávkování železem je nejčastější příčinou srdečního selhání u mladých dospívajících a je často spojena s arytmiemi. (4) Přesto jsou důkazy z prospektivních lidských populačních studií nejednotné, přinesly ve vztahu hladin železa ke kardiovaskulárním chorobám rozporuplné výsledky s prohlášeními od silně pozitivních k zcela negativním.

Volné radikály jsou příliš reaktivními elementy, než aby mohly být tolerovány v živých tkáních. Aerobní organismy používají sofistikovaný obranný systém vůči produkci, propagaci a působení volných radikálů a jiných toxických entit. Produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), z nichž je hydroxylový radikál nejtoxičtější, se iniciuje radikálová řetězová reakce směrem k poškození makromolekul (lipidy, proteiny a DNA). (15)

V naší práci jsme se zaměřili na myokard a jako vhodný model studia nejzávažnější formy ischemické choroby srdce - infarktu myokardu (IM) jsme použili isoprenalinový model. Podáním nekrogenních dávek isoprenalinu u potkanů jsme tak simulovali stav blízký IM. Souběžně byl podáván laktoferin, který jako chelátor železa představoval protektivní složku tohoto zásahu. Isoprenalin jako syntetický katecholamin představuje vhodný model pro studium látek protektivních vůči ischemicko-reperfúznímu poškození navozenému ROS. Vystupňování sympatické aktivity a zvýšení hladin katecholaminů totiž vede ke kardiotoxicitě s prokázanou účastí ROS.

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je stále nejčastější příčina morbidity a mortality ve vyspělých zemích. Proto rozvoj znalostí a poznatků v této oblasti může vést minimálně ke zlepšení kvality života nemocných trpících jakoukoli formou ICHS. Při IM je přítomna ischemie (okluze koronární tepny) vedoucí k nekróze myokardu. Reperfúze – obnova prokrvení tkáně – je esenciální pro zachování viability srdeční tkáně, zároveň však představuje riziko (ischemicko-reperfúzní poškození). (3, 40)

V současnosti největšího významu nabývají selektivní intervence do procesu oxidačního stresu chelatací iontů přechodných kovů (Fe, Cu) – hlavně podáním deferoxaminu. Nespecificky může být oxidační aktivita tlumena četnými antioxidanty. Největší pozornost je věnována studiu klasických (syntetických) chelátorů železa, zejména pak deferoxaminu (v současnosti oběma katedrami společně vedený projekt studia účinků deferoxaminu). V tuzemské i zahraniční literatuře jsme se hojně setkávali s problematikou látek s protektivními efekty vůči ischemicko-reperfúznímu poškození, a to v in vitro i in vivo studiích. Naše práce se zaměřila na laktoferin, v lidském organismu se přirozeně vyskytující glykoprotein se silně vyjádřenými železo-chelatačními vlastnostmi. In vitro laktoferin účinně ochránil vybrané potravní produkty před účinkem volných radikálů a následnou oxidací. In vivo však ještě nebylo detailněji studováno jeho působení proti tvorbě volných radikálů u ischemicko-reperfúzního poškození i poškození v jiných tkáních, v nichž jsou tvořeny ve vyšší míře. (4, 52)

Tato práce o transportu železa u potkana byla spolu s dvěma dalšími pracemi zpracována v rámci studia vlivu chelátora železa laktoferinu na model akutního IM a histologii vybraných orgánových systémů (prostředky na tento výzkum jsou čerpány z grantu GA UK 98/2005/C/FaF). Práce byla použita k zavedení metody stanovení železa v kardiomyocytu, ale také zjištění účinku laktoferinu na zdravé zvíře a zvíře s vyvolaným infarktem myokardu. Na základě získaných výsledků bude v příštích letech vypracována metoda kvantifikace a vyhodnocení možného protektivního účinku laktoferinu na poškození myokardu.

Je snaha nalézt vhodné látky, které snižují negativní následky infarktu myokardu a případně by také mohly působit protektivně i u jiných chorobných stavů zapříčiněných ROS. Studium laktoferinu, látky tělu vlastní, by mělo být přínosem v terapii těchto onemocnění. Bude tedy snahou prozkoumat, zda by laktoferin nemohl být využíván jako léčivo.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Železo v organismu

2.1.1 Charakteristika železa

Železo je nejběžnější přechodný prvek v organismu. Je to pro život nezbytný kovový prvek, který v organismu a v buňkách plní mnoho vitálních funkcí. (1)

Železo je součástí hemoglobinu erytrocytů (60-70 %), myoglobinu (8 %) ve svalstvu a řady enzymů, ve všech buňkách se vyskytuje ve formě buněčných heminů (jen asi 0,2 %). V retikuloendotelovém systému, zejména sleziny a jater, ale též ve střevní sliznici a v kostní dřeni je železo skladováno jako feritin a hemosiderin (asi 20 %). Pouze nepatrná frakce železa (0,1 %) se vyskytuje v plazmě vázaná na specifický beta-globulin – transferin. (2) Železo transportující proteiny jako transferin a laktoferin a železo uskladňující proteiny jako feritin a hemosiderin oddělují železo ve formách, jež minimalizují převod elektronů z železa na molekulární kyslík. (3)

Železo je esenciální pro buněčný metabolismus a funkci enzymů. (4) Železo hraje důležitou roli v mnoha aspektech mitochondriálního metabolismu. (5) Buňky potřebují železo k syntéze DNA, RNA a proteinů, k transportu elektronů, respiraci, proliferaci, diferenciaci a k regulaci genové exprese. Železo je součástí pro buňku životně důležitých enzymů např. oxidázy, katalázy, peroxidázy, ribonukleotidreduktázy, akonitázy, cytochromů a syntázy oxidu dusnatého. Jednou z hlavních funkcí železa je účast při transportu kyslíku (jako součást hemu). (1) Železo je také faktorem virulence mikrobiálního růstu. (3)

V buňkách je železo uloženo hlavně v biologicky neaktivní formě, vázáno ve feritinu. (6) Normálně jsou tkáňové hladiny železa precizně regulovány a uskladněny jako feritinový komplex, takto se minimalizují potenciální toxické efekty katalyticky aktivního železa. (4) Redoxní vlastnosti totiž železo determinují nejen pro základní buněčné funkce, ale díky těmto vlastnostem je také důležitým katalyzátorem chemických reakcí volných radikálů, následovaných oxidačním stresem a buněčným poškozením. (7) Peroxid vodíku může reagovat s hemoglobinem za uvolnění redox aktivního nízkomolekulárního železa (LMrFe) z hemové poloviny. Toto redox aktivní železo je schopno participovat v organických a anorganických kyslíkoradikálových reakcích, jako je stimulace lipidové peroxidace a katalyzování tvorby vysoce škodlivého hydroxylového radikálu (OH[•]). Buňky jsou chráněny vůči železem indukovanému oxidativnímu poškození produkcí feritinu, jenž může být modifikován intracelulárně do hemosiderinu. Za fyziologických podmínek však nejen feritin a hemosiderin, ale i transferin a laktoferin chrání před toxicitou železa. (8)

Přesto musí být železo dostupné pro výměnné a metabolické potřeby. V cytosolu existuje malý chelatovatelný pool železa, tzv. nestabilní zásoba železa (LIP, labil iron pool), jenž je vázán na nízkomolekulární chelátory jako jsou nukleotidy, citrát a AK. (6, 8)

Toxický efekt železa vyplývá z jeho podstaty, že patří mezi tzv. přechodné kovy. Tyto prvky, kam kromě železa řadíme i např. měď, mangan, chrom aj., mají předposlední slupku neúplně obsazenou elektrony a vyskytují se ve více mocenstvích. Mají charakter volných radikálů a významně se mohou podílet na jejich reakcích. (2) Zvýšené množství železa souvisí se zvýšenými kardiovaskulárními příhodami. (9)

2.1.2 Metabolismus železa

Buněčné hladiny železa jsou velmi jemně regulovány tak, aby bylo zajištěno jeho adekvátní (potřebné) množství a tak minimalizováno toxické působení volného železa. Hlavní kontrola homeostázy tělních zásob železa je u vyšších organismů situována v epitelální vrstvě **duodena**, kde se absorbuje dietární železo, zatímco kontrola eliminace železa se u savců nevyvinula. (10) Environmentální a dietární železo je nejvíce přítomno jako Fe^{3+} , což je nerozpustná a obecně bio-nedosažitelná forma. Takto je dostupnost železa limitována, protože oxidovaná forma kovu (Fe^{3+}) je při neutrálním pH extrémně nerozpustná. (11) Téměř všechny dostupné zásoby železa jsou proto odvozeny z makrofágové recyklace.

Přes intestinální stěnu vstoupí do těla pouze 1 až 2 mg železa, přesto je 25 mg železa potřeba pro erythropoezu a ostatní potřeby. Staré a poškozené erythrocyty jsou fagocytovány specializovanými makrofágy, pohlčené erythrocyty jsou lysovány, hemoglobin je degradován, část železa je uskladněna a zbytek je exportován do cirkulace, aby byl následně navázán na transferin. (12) Za fyziologických okolností jsou ztráty železa z organismu poměrně malé – odlupováním epitelíí ze střeva a močového traktu se ztrácí v průměru 1 mg denně, takže příjem a ztráty železa z organismu jsou vyrovnané. K větším ztrátám dochází fyziologicky u žen v průběhu menstruace. Zvýšená potřeba železa je rovněž v průběhu těhotenství – až 3 mg denně. (13)

Absorpce v tenkém střevě

Denní resorpce železa tvoří cca 0,025 – 0,05% celkového množství železa v organismu a představuje tak jen malou část ze železa přijatého v potravě (z 12 až 18 mg za den se absorbuje pouze 1 až 2 mg). Železo vstupuje u obratlovců do těla primárně hlavně v proximální části střeva - přes duodenum, kde se absorbuje dietární železo při pH 8,1 až 9,3. (10) V intestinálním lumen je Fe^{3+} redukováno na více rozpustné Fe^{2+} prostřednictvím ferrireduktázy. (15) Enterocyty jsou specializovány pro absorpci a transport železa z nitra tenkého střeva. Prekurzorové buňky, z nichž se diferencují enterocyty, působí pouze jako čidlo tělesných potřeb železa. Nezbytné proteiny pro absorpci, uskladnění a export jsou exprimovány v endotelu. (16)

DMT1/DTC1/Nramp2 (DMT1- divalent metal transporter nebo také DCT1- divalent cation transporter), přenašeč železa v apikálních buňkách, transportuje Fe^{2+} přes intestinální povrch. Nramp2 je H^+ /divalentní kov symportér (natural resistance – associated macrophage protein), který transportuje kromě železa také další kovy.

Po vstupu do mukózní buňky se železo střetne s **feritinem** (Ft), dojde k jeho zablokování uvnitř proteinu a uchování v mukózních buňkách. V případě deficiencie železa produkují mukózní buňky Ft s obtížemi a většina železa v buňce je transportována do basolaterální membrány. Difúze Fe^{2+} přes basolaterální membránu je facilitována působením **MTP1/Ireg1/ferroportinu1** (metal transporter protein/iron regulated transporter), který je zodpovědný za export železa z buňky. Následně je železo oxidováno **hephaestinem** (ferroxidáza obsahující měď) na železo trojmocné a takto se váže se na transferin. (17, 18, 16) Absorpce intestinálního železa je regulována množstvím železa v potravě, odpovědí na celkové zásoby železa v těle, potřebami erythropoezy a odpovědí na akutní hypoxii. (19)

Železo v plazmě

V plazmě cirkuluje extracelulární železo navázané na **transferin** (Tf), což je protein s mimořádně vysokou afinitou pro železo. (20) Tento specifický protein zajišťuje transport železa od enterocytů k ostatním buňkám. Tf je jednořetězcový sérový glykoprotein ($M_r=80000$) s dvěma vazebnými místy pro Fe^{3+} . (1) Receptor pro Tf (TfR) je transmembránový glykoprotein tvořený dvěma polypeptidovými jednotkami, spojenými disulfidovými můstky. (21) TfR1 je exprimován všudypřítomně, TfR2 je omezený na hepatocyty, duodenální kryptové buňky a erythroidní buňky - má vysoce specializovanou roli. TfR2 váže Tf s přibližně 30x menší afinitou než TfR1 a jeho exprese není kontrolována IRE/IRP regulatorem. (12)

Výchyt železa buňkami

Výchyt železa z Tf zahrnuje vazbu diferrického transferinu ($2\text{Fe}^{3+}\text{Tf}$) na TfR na povrchu buněk, endocytózu Tf-TfR komplexu a uvolnění železa z proteinu při endosomálním pH 5,5. (22) Z endosomu je železo transportováno divalentním kovovým nosičem - **DMT1**, což je transmembránový transportér železa. Tf, stále navázaný na TfR, se pak vrací na buněčný povrch, kde je uvolněn do cirkulace. (17)

Ve většině buněk je **uptake železa** (vychytávání) primárně zprostředkován vnitřní vazbou komplexu Tf-Fe na vysoce afinitní TfR. Sekundární mechanismus uptake železa se vyskytuje díky Tf nezávislému procesu, tento proces netransferinově vázaného železa (NTBI) má menší roli v uptake železa za normálních fyziologických podmínek, ale stává se převládajícím, když je sérové železo významně zvýšeno (hemochromatóza). V potkaním myokardu může NTBI uptake převýšit Tf-závislé dráhy 300 krát. Za podmínek převažující NTBI se objevuje saturace Tf a redukce množství TfR, což vede k nadměrnému uptake Tf-independentního železa neznámou transportní dráhou. NTBI uptake byl demonstrován v mnoha savčích buňkách, včetně kardiálních myocytů. Je totiž kalciově dependentní a může být posílen předchozím naložením železa do buněk.

Myokardiální uptake Fe^{2+} se vyskytuje díky L-typu Ca^{2+} kanálů a blokáda těchto kanálů by mohla být užitečná v léčbě pacientů s nadměrnými hladinami sérového železa. Významná složka myokardiálního uptake redukovaného železa (Fe^{2+}) je závislá na elektrické excitabilitě srdce a může být modulována léčivými a intervencemi, jež zasahují Ca^{2+} kanálovou aktivitu L-typu. Fe^{2+} permeuje Ca^{2+} kanály ve vysokých koncentracích a může měnit kanálovou kinetiku za nízkých koncentrací. (4)

Buněčný metabolismus železa

Jakmile železo vstoupí do buňky, vytváří zásobu nízkomolekulárního chelatabilního železa, což je zásoba dostupných iontů železa, tzv. **nestabilní zásoba železa** (LIP, labil iron pool). Jsou to jak ionty Fe^{2+} tak i Fe^{3+} , které tvoří komplexy s intracelulárními ligandy - nízkomolekulárními chelátory jako jsou např. citráty a jiné organické ionty, fosfáty, karboxyláty, nukleotidy a nukleosidy, polypeptidy a fosfolipidy. (23) Nadbytek železa v LIP, který přesahuje potřebné množství pro syntézu funkčního hemu a nehemových proteinů obsahujících železo, je uskladněno uvnitř Ft. (23) Za podmínek velkého nadbytku železa je Ft převeden do lysosomů, kde je transformován do hemosiderinu. (17)

Ferritin (Ft) je protein uskladňující železo s klíčovou rolí v metabolismu železa. Ft je tvořen kostrou s dutinou, která je schopná uskladnit 4500 atomů Fe^{3+} jako anorganický komplex. Molekuly Ft jsou tvořeny dvěma typy podjednotek, H - těžká (heavy) je důležitá pro oxidaci Fe^{2+} a L - light (light), která asistuje při formaci jádra. (24) Při nadbytku železa působí Ft jako protein izolující železo, chrání tak buňky před jeho toxicitou. Při nízkém obsahu železa působí jako zdroj iontů železa, které jsou nutné pro syntézu proteinů obsahujících železo. (23) Zvýšené množství sérového Ft obecně odráží zvýšené množství železa ve tkáních, může se ale nespecificky zvyšovat při zánětu. (25)

Hemosiderin (obsahuje 37 % železa) představuje málo rozpustné agregáty Ft. (13) Nicméně jsou u jistých patologických stavů nalezeny masivní depozice hemosiderinu, které ale nevznikly přímo z rozpadu Ft. (24)

Proteiny regulující železo (IRP, iron regulatory proteins) představují senzory množství cytoplazmatického železa a kontrolory množství proteinů zahrnutých v homeostáze železa: Tf, TfR1, MTP1 a DMT1. Posttranskripční regulace genové exprese se uskutečňuje interakcí mRNA s IRP. Na 5' nebo 3' nepřepisovaných oblastech mRNA (tzv. UTR) se vyskytují vlásenky se smyčkou nazývané **elementy reagující na železo** (IRE, iron responsive elements), které jsou rozpoznávány specifickými proteiny IRP1 a IRP2. IRPs, patřící k akonitázové rodině, působí jako klíčové regulátory homeostázy buněčného železa. (10, 26)

Nedávno byl objeven nový regulátor intestinální absorpce a homeostázy železa v buňkách - **hepcidin**. Je sekretován v závislosti na intracelulární úrovni železa a kontroluje hladinu MTP1 na buněčném povrchu. (27)

Při zánětu a infekci nastává buněčná retence železa (tzv. „zánětlivá regulace“). Železo se akumuluje v makrofágových buňkách, navíc je přerušena intestinální absorpce železa. (12) Železo je totiž esenciální pro invazivní mikrobiální a neoplastické buňky. Mikrobiální patogeny musí pro přežití a replikaci v hostitelích získat jejich železo. (28)

2.1.3 Patologické stavy železa

Hemochromatóza

Hemochromatóza je vrozená porucha metabolismu železa, spojená se zvýšeným vstřebáváním železa ze střeva a jeho excesivním ukládáním v některých orgánech (játra, pankreas, srdce, thyreoidea, gonády, hypofýza, hypothalamus, kůže) s jejich následným poškozením. Zpravidla se rozlišuje primární (hereditární, idiopatická, genetická) a sekundární hemochromatóza. Vedle toho jsou popsány poruchy spojené se zvýšeným ukládáním železa v játrech (např. africká hemochromatóza Bantu) a hemosiderosa. (29)

Hereditární hemochromatóza (HH) je autozomálně recesivní postižení vyplývající z mutací histokompatibilního antigenu HLA-A a postihuje cca 10% lidí evropského původu. (4) Je to genetické poškození, jež v homozygotním stavu vede k předávkování železem (až 60 g v těle), k těžkému průběhu a včasné smrti obvykle na karcinom jater, jiné jaterní choroby, kardiomyopatii či diabetes. Osoby s heterozygotní formou HH se nepravděpodobně vyvinou k předávkování železem, ale mají tendenci mít větší zásoby železa v těle, jak ukazuje vyšší sérový Ft. (30) **Sekundární hemochromatóza** je jednogenové postižení, zapříčiňuje syndromy thalassemia major a sideroblastickou anémií spojenou s neúčinnou erytropoetickou aktivitou. (4)

Zpočátku bývá v klinické symptomatologii slabost, letargie, pobolívání břicha, impotence a artralgie. Při fyzikálním vyšetření dominuje hepatosplenomegalie, u pokročilého onemocnění pak dále ikterus, ascites, kožní změny a projevy srdečního postižení. (29) Osoby s HH mají zvýšené riziko kardiovaskulární smrti a IM. Při těžkém předávkování železa u pacientů s HH je porušená endoteliální funkce. (31) Monocyty a makrofágy pacientů s HH uvolňují 2krát více nízkomolekulárního železa než buňky kontrolní, což vysvětluje vyšší plazmatickou koncentraci potenciálně katalyticky aktivního železa u těchto pacientů. (8)

Transfúzní sideróza

Dlouhodobá transfúzní terapie je život zachraňující léčba u pacientů s neústupnou anémií vyplývající z thalasémie, selhání kostní dřeně nebo agresivní léčby rakoviny. Intravenózní preparáty železa (dextran železa) jsou dnes běžně podávány v kombinaci s erytropoetinem v léčbě anémie u pacientů s chronickým selháním ledvin (CRF), stavem, který se vyznačuje oxidativním stresem a zánětem. Tato léčba pravidelně zvyšuje zatížení železem, jež může potenciálně zesilovat oxidativní stres a tak kardiovaskulární onemocnění v této populaci. (29, 32).

Opakovaná transfúze vede k rapidnímu zvětšení množství železa a může zapříčinit **transfúzní siderózu**, protože neexistuje mechanismus pro exkreci železa. Železo je nakonec uskladněno ve stejných místech jako u jiných postižení z přetížení železem (hepatocyty, myokard, endokrinní tkáně). (19) U pacientů s transfúzním předávkováním železem se může vyvinout život limitující kardiomyopatie. Železem přeplněné kardiomyocyty ukazují na zvýšené uvolňování kyseliny arachidonové a prostaglandinů. Efekt kyseliny arachidonové a jejích metabolitů na rytmicitu kardiomyocytů vede k příčinné souvislosti mezi těmito signály a elektromechanickými změnami u kardiomyopatie indukované předávkováním železa. (33)

2.1.4 Toxicita železa

Volné ionty přechodných kovů (Fe, Cu) často vystupují jako donory elektronu, nutného pro generaci hydroxylového radikálu (OH^\cdot) z peroxidu vodíku (H_2O_2). V přítomnosti nadbytku železa je toxicita H_2O_2 zesílena 10-1000 krát. Proto vychytávání přechodných kovů může být považováno za významný mechanismus antioxidační obrany. (15)

Zvýšení sérového železa se vyskytuje široce a je spojeno s počtem chorobných stavů. Akutní otrava železem je nejčastější příčinou mortality z předávkování u malých dětí a často vyústí v myokardiální dysfunkci. (4) Předávkování železem vede ke kardiální toxicitě, zasahující jak elektrickou vodivost, tak svalovou kontraktilitu. (25) Chronická zvýšení sérového železa bývají spojena s počtem chorobných stavů jako je kardiomyopatie, diabetes, hypopituitarismus a jaterní cirhóza.

Několik epidemiologických studií navrhlo železo jako potentní rizikový faktor **chronické srdeční choroby** (chronic heart disease, CHD). Zvýšené hladiny železa v těle se spojují se zvýšeným rizikem infarktu myokardu (IM) či smrti na CHD. (31, 34) Železo je přechodný kov, který v redox aktivní formě podněcuje oxidační stres a tkáňové poškození katalyzováním toxických redoxních reakcí (např. Fentonovu reakci). Tvorba kyslíkových radikálů a následně lipidová peroxidace jsou zahrnuty do patogeneze **aterosklerózy**. (31, 32) **Kardiomyopatie** z předávkování železem je nejčastější příčinou srdečního selhání u mladých dospívajících a je často spojena s arytmiemi (to obecně vyplývá z primární a sekundární hemochromatózy). **Srdeční selhání** je vůdčí příčinou mortality u pacientů s transfúzním přetížením železem, kdy myokardiální uptake železa vyplývá z Tf-independentního procesu. (4)

Železo a ICHS

Železo hraje roli v generaci **reaktivních forem kyslíku** (ROS) katalyzováním Fentonovy či Haber-Weissovy reakce. Ukazuje se, že železo zesiluje poškození během ischémie a reperfúze dokonce i za absence přesycení železem. Doplnková dieta železem zvyšuje stupeň oxidačního poškození v ischemických potkaních srdcích.

Superoxid vytvářený během oxidačního stresu může mobilizovat železo z Ft a peroxid vodíku je schopen uvolnit železo z hemu. Hem, odvozený z lyzovaných erytrocytů, je vychytáván rychle endoteliálními buňkami a uvolňuje své železo, tudíž zesiluje oxidační poškození. Ač Tf neuvolňuje své železo za normálního pH, za nízkého pH, což může být případ v arteriálních stěnách, je železo uvolněno z Tf a indukuje oxidaci LDL. Produkce Ft v makrofázích a endoteliálních buňkách by mohla být protektivním mechanismem vůči škodlivým účinkům volného železa. (8)

Železo a aterogeneze

Koronární ateroskleróza je komplexní onemocnění, kdy je započítáno množství genetických a environmentálních faktorů. (35) Ateroskleróza může vést k CHD, zapříčiňující myokardiální ischemii a infarkt. (8) Jednou z oblastí, v níž je zvýšené železo považováno za faktor zvýšení kardiovaskulárních problémů, byla jeho asociace s aterogenicitou LDL cholesterolu. (2) Přestože vztahy mezi markery zvýšeného železa a rizikem CHD jsou silnější spíše pro ischemické jevy než přítomnost aterosklerózy (AT), současná data ukazují, že železo může být významné v časném rozvoji AT. (36)

Mechanismus, jímž železo stimuluje aterogenezi je nejasný. (8) Hromadí se důkazy, že železo může být zahrnuto do událostí vedoucích k AT posílením lipidové peroxidace (indukovaná ROS) a hladkosvalové buněčné proliferace. (35) Redox aktivní železo totiž může přispívat k lipidové peroxidaci, endoteliální buněčné aktivaci a tvorbě ROS (hlavně hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí). (36)

Lipidová peroxidace

Železo plní svou katalytickou roli v lipidové peroxidaci, která představuje důležitý faktor tvorby aterosklerotických lézí. Studie ukázaly, že železo může stimulovat lipidovou peroxidaci *in vitro* a *in vivo*. Peroxidace membránových lipidů narušuje uspořádání soudržné lipidové dvojvrstvy – dochází ke zkracování a zmenšování struktury kyselin. Normální nativní LDL prostupuje stěnou tepny bez poškození cévy. Železem katalyzované reakce volných radikálů vedou k oxidaci LDL, který se vyskytuje v buňkách endotelu,

hladkosvalových buňkách, lymfocytech či makrofázích. Oxidovaný LDL (ox-LDL) je rozpoznáván zametačovými receptory na tkáňových makrofázích, následně dojde k akumulaci lipidů v této stěně a tvorbě pěnových buněk (charakteristické buňky aterosklerotických lézí z tukových pruhů). Ox-LDL svou chemotaktickou kapacitou vycytává cirkulující monocyty ke stěně a inhibuje makrofágy v odchodu z intimy arteriální stěny. (8) Železo může zapříčinit oxidační ničení LDL, vedoucí k rychlému vyčištění plazmy od LDL. Ačkoli na první pohled toto odstranění z plazmy by mohlo vypadat jako pozitivní, rychlé vycytávání prezentuje problémy pro endoteliální buňky ohraničující krevní cévy.

Železo samo se může nacházet v aterosklerotických lézích. (2) Obsah železa v těchto lézích je zvýšen ve srovnání s normálními arteriálními stěnami. V pozdějších stádiích aterosklerotického procesu se nachází více železem nasyceného Ft v lézích i hladkosvalových buňkách. V podmínkách oxidačního stresu tento Ft slouží jako zdroj volného katalyzujícího železa. (8) U zvířecích modelů AT je vaskulární depozice železa úzce spjata s progresí LDL oxidace a AT (36). Zda je netransferinově vázané železo významné v aterogenezi *in vivo* zatím není jasné. (8)

Endoteliální buněčná aktivace

Endotel je kritický v regulaci vazomotorického tonu, destičkové aktivity, leukocytové adheze a vaskulární hladkosvalové proliferace díky uvolňování několika parakrinních faktorů, zahrnujících oxid dusnatý (NO). Endoteliální dysfunkce není pouze včasným markerem KVS rizika, ale také přispívá k patogenezi AT.

Nové důkazy ukazují, že redox aktivní železo může přispívat k aktivaci endoteliálních buněk a destiček. Železo je také zahrnuto do mnoha enzymových systémů, včetně NO syntázy (NOS) a neproteinově se vázající železo může přímo inaktivovat endotelově odvozený NO (EDNO). Interakce železa s NO jsou kritické pro bioaktivitu NO. Aktivace guanylátcyklázy se děje reverzibilní vazbou NO na Fe^{2+} hemové železo (NO může vázat jak Fe^{2+} hem tak i Fe^{3+} hem v NOS jako zpětnovazebná inhibice). NO také může regulovat buněčné uskladnění železa. Zvýšený oxidační stres je spojen s porušenou činností EDNO u pacientů s AT a může být klíčem k včasnému mechanismu v rozvoji atheromů. (36)

Studie vlivu železa na CHD

Epidemiologické studie vztahu železa a koronární srdeční choroby (CHD) přinesly rozporuplné výsledky od pozitivních k zcela negativním. Za chronických podmínek, jako je onemocnění jater a zánětlivé choroby, mohou být změněny hladiny železa a vytvořeny

asociace s CHD. Většina studií postavila stanovení CHD rizika pouze na měření stavu železa a přitom dokonce hladiny sérového Ft mohou zřetelně kolísat čas od času u některých jedinců. Proto až další měření stavu železa, zejména sérového Ft ve velkých studiích se sériovými měřeními mohou zcela změnit současné výsledky a jejich interpretace. (37) Důkazy z prospektivních lidských populačních studií jsou nejednotné. Zvýšené tělové zásoby železa byly spojeny se zvýšeným rizikem CHD smrti či AMI v několika (ne všech) studiích. Nicméně nesrovnalosti mohou být důsledkem mnoha biologických a měřících metod použitých při odhadu tělových zásob železa a interpretaci výsledků studií. (34) Důkazy o železem-indukovaném poškození během ischemie-reperfúze jsou většinou nepřímé a založené na studiích, jež demonstrovaly protektivní efekt deferoxaminu, silného chelátora železa, inhibujícího železem-katalyzovanou Fentonovu reakci. (6)

Podporující důkazy pocházejí z in vitro studií lipidové peroxidace a lipoproteinových modifikací, studií zvířecích modelů sycených cholesterolem a s předávkováním železem a z analýz složení lidských aterosklerotických lézí. Hodnotila se sérová Ft koncentrace, v jiných studiích byla použita spíše tradičnější klinická měření (sérové železo nebo sérová Tf saturace). **Sérová Ft koncentrace** představuje nejlepší neinvazivní měřitelný indikátor tělových zásob železa. Použití sérového Ft v odhadu zásob železa je však komplikované, protože Ft je také protein akutní fáze, který je zvýšen při zánětu, vážných chorobách jater a rakovině. (34) Ve studii asymptomatické karotidové AT je silná korelace mezi AT a zásobami železa u mužů i žen, zřetelněji pokud je spjata s hypercholesterolémií. Prospektivní studie na stejné skupině odhalila sérové Ft hladiny jako nejsilnější rizikový faktor progresu AT (snižování zásob železa je prospěšné a další akumulace zvyšuje kardiovaskulární riziko). Ft a LDL-cholesterol synergisticky působí v incidenci kardiovaskulárního onemocnění (KVO) a smrti. (8)

U mužů narůstají zásoby železa (sérová koncentrace Ft) po pubertě, u žen pak zůstávají nízké a narůstají až po 45. roku. U mladých mužů je paralela rizika CHD a hladin železa. Maximální rozdíl pohlaví ve Ft sérových hladinách je zhruba ve 45 letech a činí 300 %. (8) V roce 1981 byl rozdíl v incidenci CHD mezi muži a ženami, vysvětlováno rozdílností v uskladněném železe. Menstruací mladých dospělých žen bylo vysvětlováno, proč ženy jsou obecně méně rizikovější v srdečním onemocnění než muži. Fyziologická ztráta krve menstruací reprezentuje mechanismus protektivní deplece železa, která snižuje riziko IM, zatímco nahrazování železa, speciálně u pacientů s renálním onemocněním, je spojeno s vážnými koronárními stavby. (2, 31)

2.2 Oxidační stres v těle

2.2.1 Charakteristika

Oxidační stres je stav, v němž oxidační metabolity – **reaktivní kyslíkové formy** (ROS, reactive oxygen species; bližší v kapitole 2.2.3) projevují svůj toxický účinek a to buď díky jejich vzrůstající produkci, pozměněnému buněčnému mechanismu protekce nebo neschopnosti opravy již vzniklého oxidačního poškození (reparační enzymy). Oxidační stres způsobuje oxidaci thiolových skupin, lipidovou peroxidaci, denaturaci proteinů a poškození nukleových kyselin vedoucí nejprve k reverzibilnímu poškození a případně dále k nekróze. (38)

Oxidační stres může být zapříčiněn endogenními stresy nebo exogenními zdroji volných radikálů (VR). Zvýšený přísun radikálů pochází exogenně z ionizačního záření, nadbytku přechodných kovů, vedlejších účinků léčiv a toxických chemikálií, nadbytku kyslíku a zvýšené kyslíkové koncentrace. Xenobiotika a environmentální polutanty mohou zvýšit intracelulární formaci ROS (např. přes Fentonovu reakci, zahrnující stopové prvky jako Fe a Cu). Endogenní faktory plynou z vychytávání a aktivace fagocytů v místě poškození, úniku elektronů z narušeného mitochondriálního elektronového řetězce, delokalizace iontů přechodných kovů a jejich úniku z hemového proteinu, snížené antioxidační kapacity (redukované antioxidační enzymy, snížené hladiny antioxidantů, únik či destrukce antioxidantů). Během lidských chorob se může projevit zvýšená aktivita VR jako následek primárních (např. nadbytek radiační expozice) nebo sekundárních událostí (tkáňové poškození traumatem). (15)

Při oxidačním stresu u ischemie vzrůstá produkce **volných kyslíkových radikálů** (OFR, oxygen free radicals) v mitochondriích a leukocytech a produkce těchto ROS je exacerbována znovuvstoupením kyslíku během reperfúze. (38) OFR jsou velmi reaktivní chemické sloučeniny, schopné indukovat oxidativní modifikaci dalších molekul. Jsou vytvářeny v malých množstvích během normálního metabolismu buněk a jsou normálně inaktivovány endogenními zmetacími systémy. (39) Kyslík je rozhodující účastník v tvorbě OFR a četných dalších buněčných procesů. Kyslík se podílí na tvorbě NO, hrající významnou roli ve vymezení cévního tonu, kardiální kontraktility a různých dalších parametrů. Kyslík je ústřední v tvorbě ROS, jež se mohou podílet jako „dobročinné“ molekuly v buněčných signálních procesech nebo mohou indukovat ireverzibilní buněčné poškození a smrt. (40)

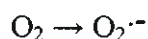
Ischémie obecně zapříčiňuje změny v **obranných mechanismech** vůči OFR, hlavně je to redukce aktivity mitochondriální superoxidodismutázy (SOD) a ochuzování tkání o redukovaný glutathion. (38) Zdá se pravděpodobné, že speciálně u nemocných osob jsou antioxidační mechanismy redukovány, což vede k nerovnováze mezi produkcí VR a jejich odstraňováním. Z toho plyne akumulace koncových produktů působení VR a pomalu progredující poškození tkání. Antioxidační obrana je přemožena a VR se stávají vysoce destruktivními vůči buňkám a tkáním. Tento oxidační stres se objevuje, když je vážné narušení prooxidant-antioxidant rovnováhy s výhodou pro prvního z nich, vedoucího k lipidové peroxidaci, denaturaci proteinů či enzymů nebo mutagennímu poškození nukleových kyselin. To může být ilustrováno na aktivovaných neutrofilech, které se mohou vyvinout jak ve fyziologickou (zabíjení mikroorganismů intracelulárně a kontrolovaná produkce ROS) tak i patologickou odpověď (zánět s nekontrolovatelnou extracelulární produkcí ROS). Oxidační stres tedy obecně vyplývá buď ze zvýšené expozice ROS či přítomnosti snížené antioxidační obrany, vedoucí k oxidačnímu ničení lipidů, proteinů a DNA (anebo kombinací obou jevů najednou). Mimo poškození makromolekul, zasahuje též řadu redox senzitivních signálních drah. U člověka je oxidační stres (podmíněn uvolněním oxidovaného glutathionu v koronárním sinu) prokázán během chirurgické reperfusiony celého srdce či po trombolýze a je spojen s přechodnou levokomorovou dysfunkcí. (15)

S věkem vede vzrůst **mitochondriálních DNA mutací** (mitDNA mutací) a oxidačního stresu k hypotéze, že produkce ROS je příčinou patogenních efektů mitDNA mutací. VR jako vedlejší produkty mitochondriální respirace mohou ničit přilehlé buněčné elementy včetně mitDNA. Oxidačně poškozená mitDNA vede k mutacím, zasahujícím funkci elektronového transportního řetězce, protože všechny mitochondriálně kódované proteiny jsou podjednotkami respiračních enzymových komplexů. Ustupující elektronový transport pouští více elektronů, což vede k dalšímu oxidativnímu poškození. Nicméně tvrzení, že náhodné mitDNA mutace zapříčiňují oxidativní stres, nebylo otestováno. Důvodem je, že zatím nebyl vhodný žádný genetický model s náhodnými mutacemi. (41)

Současné údaje ukázaly úzkou spojitost mezi oxidačním stresem a **apoptózou**. Tumor necrosis faktor (TNF) indukuje rychlý vzrůst intracelulárních reaktivních kyslíkových meziproduktů a apoptózu. Toto není omezeno pouze na myocyty, ale vyskytuje se i na úrovni endotelu, kde TNF vede k expresi indukovatelné NOS, produkci reaktivního radikálu NO, oxidačnímu stresu a apoptóze. Je proto možné, že imunologická odpověď na srdeční selhání vede k endoteliální a myocytové dysfunkci a oxidačním stresem zprostředkované apoptóze. Objasnění těchto mechanismů může vést k novým terapeutickým strategiím. (38)

2.2.2 Systémy tvorby ROS

ROS mohou pocházet z vnějšího prostředí, zároveň jsou produkovány řadou pochodů v těle. Jsou konstantě vytvářeny v lidském těle normálními metabolickými procesy, jako je redukce kyslíku na vodu mitochondriálním elektronovým transportním dýchacím řetězcem i procesem tvorby ATP oxidativní fosforylací. Každý kyslíkový atom obsahuje 2 nepárové elektrony ve valenční vrstvě. Atomy nebo molekuly s nepárovými elektrony jsou označeny jako volné radikály (VR) a jsou vysoce reaktivními entitami, schopnými participovat v různých (bio)chemických reakcích. Molekulární kyslík (O_2) je charakterizován jako diradikál, tj. vlastností, jež dovoluje kapalnému kyslíku být přitahován k pólům magnetu. Tato vlastnost také ukazuje, že plná redukce kyslíku na vodu, jako terminální děj v elektronovém transportním řetězci, vyžaduje 4 elektrony. **Sekvenční donace elektronů** pro kyslík během tohoto procesu může vytvářet ROS jako meziprodukty. Malé procento (2-5 %) elektronů totiž uniká z hlavního proudu mitochondriálního dýchacího řetězce za jednomocné redukce molekulárního kyslíku, tj. dodáním **prvního** elektronu, vedoucí k tvorbě radikálu *superoxidového aniontu* ($O_2^{\cdot-}$). Superoxid vzniká tedy přímou oxidací v mitochondriích nebo pomocí xanthinoxidázy, cytochromu P450, aj.



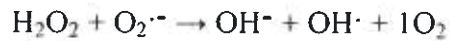
Donace **druhého** elektronu vede k tvorbě peroxidu, jež podléhá protonaci poskytující *peroxid vodíku* (H_2O_2). V lidských buňkách je superoxid rychle transformován na H_2O_2 ; tato reakce probíhá spontánně nebo je mocně akcelerována superoxidodismutázou (SOD). Peroxid vodíku vzniká tedy dismutací superoxidu nebo přímo oxidázami v peroxizómech s obsahem katalázy, která jej ihned rozkládá.



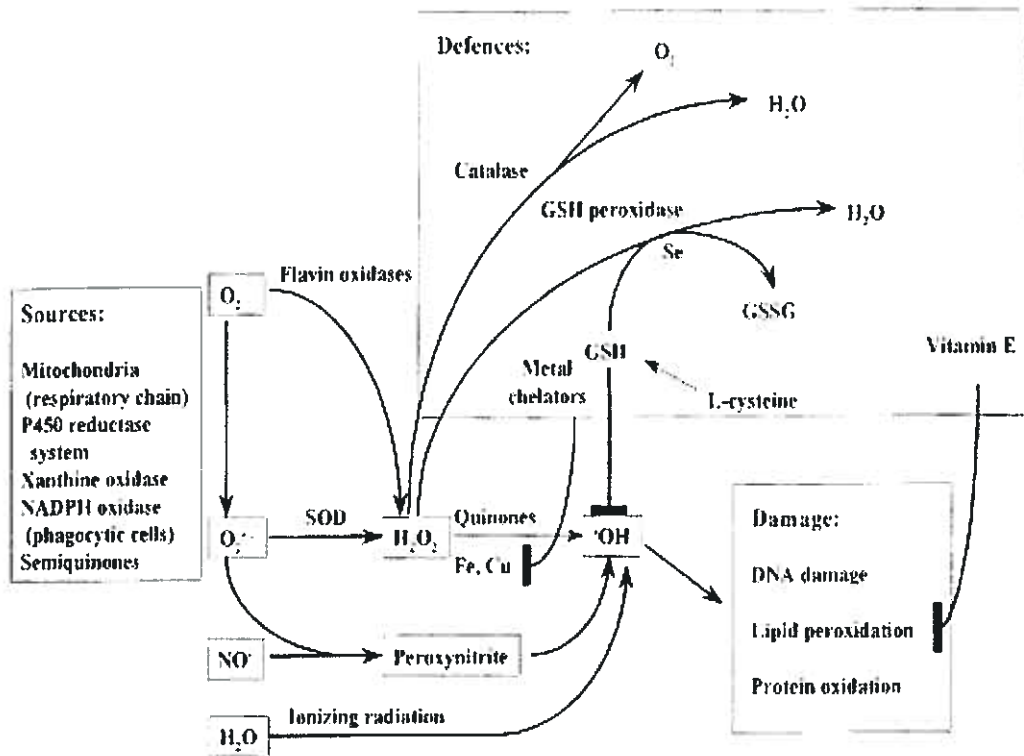
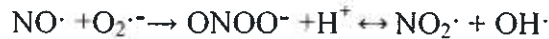
Třetí elektron je dodán ve Fentonově reakci s železnatými (nebo měďnatými) ionty za tvorby vysoce reaktivního *hydroxylového radikálu* (OH^{\cdot}). Další redukce H_2O_2 totiž labilizuje jeho interkyslíkové vazby až dojde k rozštěpení na OH^- a OH^{\cdot} . Volné ionty přechodných kovů (Fe, Cu) často vystupují v této reakci jako donor elektronu. V přítomnosti nadbytku železa je toxicita H_2O_2 zesílena 10-1000 krát.



Hydroxylové radikály vznikají také při Haber-Weissově reakci. Singletový kyslík (1O_2), velmi krátce trvající a reaktivní forma molekulárního kyslíku, může být tvořen různými mechanismy, včetně Haber-Weissovy reakce:



Konečně poslední stupeň představuje redukční donaci čtvrtého elektronu za tvorby vody. (40, 15) Oxid dusnatý (NO) má nepárový elektron (NO^\cdot), jenž může reagovat s $\text{O}_2^{\cdot-}$ za tvorby silného oxidantu - *peroxynitritového radikálu* (ONOO^\cdot):



Obrázek č. 2: Hlavní dráhy tvorby a dalšího osudu ROS a místa antioxidační obrany. Sources – zdroje, damage – poškození, GSH – redukovaný glutathion, GSSG – oxidovaný glutathion. (Mimić-Oka, J. et al, (15))

V srdci a jiných tkáních mohou být ROS formovány několika mechanismy v mitochondriích jako vedlejší produkt normálního buněčného aerobního metabolismu – kromě výše zmíněného dýchacího řetězce a oxidativní fosforylace i xanthinoxidázou (XO), NAD(P)H oxidázou, cytochromem P450, autooxidací katecholaminů a štěpením pomocí NOS. Formace ROS v srdci může být indukována působením cytokinů a růstových faktorů. Angiotenzin II a TNF indukují tvorbu H_2O_2 a $\text{O}_2^{\cdot-}$ aktivací NAD(P)H oxidázy. Tato cesta přes NAD(P)H je nejlépe popsána na cévních hladkosvalových buňkách, ale také byla zdokumentována na ostatních typech buněk jako jsou kardiomyocyty. A tak mohou hlavní procesy, jimiž srdce získává dostatek energie, vést k produkci ROS. (40)

2.2.3 Vlastnosti a úloha volných radikálů

Volný radikál (VR) je atom či molekula, schopná samostatné existence, mající jeden nebo více nepárových elektronů. Jsou tendence reagovat, aniž rozlišují s jakými molekulami přicházejí do kontaktu. Jsou-li již vytvořeny, reagují buď s dalším radikálem nebo jinou neradikálovou molekulou pomocí rozličných interakcí. Setkají-li se dva radikály, mohou zkombinovat svůj nepárový elektron za tvorby kovalentní vazby. Radikál tvoří další radikál, vedoucí k řetězové reakci. Díky vysoké reaktivitě se mohou VR snadno reagovat např. s molekulami enzymů, receptorů, iontových pump, dochází tím k přímé oxidaci, inaktivaci či inhibici jejich normální funkce. Přesto většina molekul, nacházejících se *in vivo*, jsou neradikály. Monitorování tohoto procesu je nesnadný, jelikož ROS jsou velmi reaktivní částice a tudíž těžko měřitelné. (15)

Mezi nejvýznamnější druhy volných radikálů patří **kyslíkové volné radikály** (OFR, oxygen free radical). Za stupňovaného dodání jednotlivého elektronu molekulárnímu kyslíku se vytváří jedinečné spektrum reaktivnějších intermediátů. Termín „OFR“ zahrnuje radikál superoxidového anionu ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (HO^{\cdot}) a další peroxidové lipidové a jiné radikály (LOO^{\cdot} a XOO^{\cdot}).

OFR jsou součástí větší skupiny molekul často nazývané **reaktivní kyslíkové formy** (ROS, reactive oxygen species), které jsou všechny silněji oxidovány než molekulární kyslík sám. Termín ROS patří skupině metabolitů charakteru radikálů i neradikálů, odvozených od molekulárního kyslíku, jako je superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}), lipidové peroxidy (LOO^{\cdot}), singletový kyslík (1O_2), kyselina chlorná ($HOCl$) a další N-chloraminové sloučeniny. (15) (viz Tab. 1).

V organismu běžně vzniká i řada **reaktivních forem dusíku** (RNS, reactive nitrogen species), které se také dělí na radikály jako je oxid dusnatý (NO) a dusičitý (NO_2), k neradikálům řadíme např. nitrosyl (NO^+), kyselinu dusitou (HNO_2), oxid dusitý (N_2O_3), oxid dusičitý (NO_2), peroxyinitrit ($ONOO$), aj. (14 str.21-23)

Tab. 1. Přehled vybraných ROS a RNS (15)

<p>• Radikály:</p>
<p>Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) Radikál s kyslíkovým centrem a selektivní reaktivitou. Je produkován četnými enzymovými systémy, autooxidačními reakcemi a neenzymatickými elektronovými přenosy, jež jednomocně redukují molekulární kyslík. SOD akceleruje dismutaci $O_2^{\bullet-}$ jeho konverzi na peroxid vodíku (H_2O_2) a kyslík (O_2).</p>
<p>Hydroxyl (OH^{\bullet}) Vysoce reaktivní radikál s kyslíkovým centrem, atakující všechny molekuly v lidském těle.</p>
<p>Peroxy, alkoxy (RO_2^{\bullet}), (RO^{\bullet}) (tj. lipidové radikály) Typicky organické radikály, často se střetávající jako intermediáty během zhroucení peroxidů lipidů (peroxidace).</p>
<p>Oxidy dusíku (NO^{\bullet}), ($ONOO^-$), (NO_2^{\bullet}) NO je tvořen <i>in vivo</i> z L-argininu, $ONOO^-$ vzniká reakcí NO^{\bullet} s $O_2^{\bullet-}$, NO_2^{\bullet} se nachází ve znečištěném ovzduší a kouři.</p>
<p>• Neradikály:</p>
<p>Peroxid vodíku (H_2O_2) Tvořen <i>in vivo</i> dismutací $O_2^{\bullet-}$ (SOD) a také mnoha oxidázovými enzymy. Vyšší hladiny H_2O_2 mohou útočit na několik energii-produkujících systémů. Je to silný oxidant a v dostatečné koncentraci může zabít jakoukoli buňku. H_2O_2 také tvoří OH^{\bullet} v přítomnosti přechodných kovů (Fentonova reakce); H_2O_2 zvyšuje vaskulární permeabilitu, uvolňování prostacyklinu a translokaci P-selektinu na povrch endoteliálních buněk.</p>
<p>Kyselina chlorná ($HOCl$) Silný oxidant, vytvářený v lidských neutrofilech v místě zánětu působením enzymu myeloperoxidázy. Může taktéž reagovat s $O_2^{\bullet-}$ za tvorby OH^{\bullet} v neutrofilech.</p>
<p>Ozon (O_3) Tento škodlivý plyn spotřebovává plazmatické antioxidanty (vitamin D, vitamin E a kyselinu močovou).</p>

Efekty ROS ve fyziologických procesech

Kromě toho, že ROS jsou součástí jevu oxidačního stresu, současné studie ukázaly, že jsou také ROS, jež jsou generovány specializovanou plazmatickou membránovou oxidázou za normální fyziologické signalizace růstovými faktory a cytokiny. ROS jsou schopné působit přímo na signální transdukční dráhy, či nepřímo tvorbou bioaktivních mediátorů. (15)

VR jsou zahrnuty v několika normálních biologických procesech *in vivo*. Jsou součástí kaskády antimikrobního působení fagocytů díky NADPH-oxidázy, jsou obsaženy v arzenálu těchto obranných buněk (neutrofilů, monocytů, makrofágů, eosinofilů). ROS jsou součástí mnoha buněčných signálních drah (např. jako druzí poslové) v modulování aktivity specifických transkripčních faktorů. Mohou působit jako regulační molekuly v biochemických procesech; např. lymfocyty a fibroblasty konstantně tvoří malá množství superoxidového radikálu jako růstového regulátoru. Ostatní nefagocytické buňky (endoteliální a arteriální hladkosvalové buňky) mohou být stimulovány uvolňováním superoxidu. VR jsou taktéž zahrnuty v mechanismu účinku určitých enzymů (ribonukleosiddifosfát reduktáza, cyt P450 a prostaglandin syntáza). V neposlední řadě pak také fungují jako signál umožňující indukci syntézy a transportu příslušných antioxidantů na jeho místo působení. (40, 15)

Role ROS v řadě patologických stavů

Snad nejrozšířenějšími rozpoznávanými biologickými účinky ROS jsou ty, jež se objevují, když jsou přemoženy obranné mechanismy buněk a ROS pak reagují přímo s buněčnými lipidy, proteiny a DNA, což vede k buněčnému poškození a smrti. Lipidová peroxidace vede k porušení membrán buněk i organel. Mutageneze DNA je indukována zlomy, purinovou oxidací, protein-DNA cross-linkingem a dalšími změnami chromatinové struktury a zasahuje do exprese genů. Modifikace proteinů inaktivuje klíčové enzymy a denaturuje je na nefunkční proteiny. Obecně stárnutí a s věkem spjaté změny v kardiovaskulárním systému patří k dlouhodobým kumulativním efektům ROS.

ROS mohou hrát významnou roli v genezi a progresi CHD s následnou myokardiální ischemií a nekrózou jako vedoucí příčinou srdečního selhání. ROS aktivita v cévní stěně přispívá k formaci oxidovaného LDL, hlavní příčině patogeneze AT. ROS zprostředkovanou aktivací makrofágů zapříčiňují rupturu cévních plaků, následně trombózu a okluzi. (40) Nerovnováha mezi ROS a obranou

antioxidanty, přispívá k progresi chronického srdečního selhání. Akutní inhibice XO, jež produkuje ROS, však zlepšuje mechanickou účinnost selhávajícího srdce, ale zda dlouhodobá inhibice projevuje prospěšné efekty u tohoto stavu není známo. (41)

Užitím kardiopulmonárního bypassu se vystavuje cirkulující krev nefyziologickým povrchům a mechanickým stresům. Aktivuje se tak několik regulačních kaskád. V důsledku toho erythrocyty lyzují a uvolňují svůj buněčný obsah - hemoglobin a katalázu, a neutrofilové se aktivují k produkci superoxidu a peroxidu vodíku. Peroxid vodíku může reagovat s hemoglobinem uvolněním redox aktivního nízkomolekulárního železa (LMrFe) z hemové poloviny. Toto redox aktivní železo je schopno participovat v organických a anorganických kyslíkoradikálových reakcích. (3)

2.3 Myokardiální ischemie a perfúze

Infarkt myokardu (IM) je nejzávažnější formou ischemické choroby srdeční (ICHS), při níž dochází k okluzi koronární tepny. Při ischemii trávající minimálně 30 minut dochází k nekróze tkáně, tzv. infarktu. Obnova prokrvení postižené tkáně (perfúze) je naprosto nezbytná pro zachování životnosti srdeční tkáně, avšak obnovení krevního toku koronárními arteriemi vede k produkci toxických ROS. Tomuto procesu může být zabráněno nebo může být zmírněn přítomností antioxidantů. (3, 40)

2.3.1 Role kyslíku v myokardiální energetice a metabolismu

Srdce nutně vyžaduje přítomnost kyslíku, a přestože má silný obranný mechanismus, je citlivé na oxidační stres, který se vyskytuje např. během postischemické perfúze. Savčí srdce je obligátně **aerobní** orgán. Téměř polovinu kardiomyocytu tvoří četné mitochondrie, kontrakce myokardu je závislá na oxidační fosforylaci. V klidu srdce spotřebuje přibližně 8-15 ml O_2 /min/100g tkáně. To je viditelně více než v mozku (asi 3 ml O_2 /min/100g) a může vzrůst na více než 70 ml O_2 /min/100g myokardiální tkáně během intenzivního cvičení. Srdeční sval savců za anaerobních podmínek nemůže produkovat dostatek energie pro udržení nezbytných buněčných procesů. Tvoří se toxická kyselina mléčná, klesají zásoby energetických fosfátů a ztrácí se kontraktální schopnost myokardu. Pokud tato akutní hypoxie trvá déle než 20 až 40 minut, dojde k irreverzibilní nekróze kardiomyocytu – infarktu. (38, 15)

Srdce je schopno zužitkovat různá metabolická paliva včetně mastných kyselin (MK), glukózy, laktátu, ketonů a aminokyselin. Ve stadiu příjmu potravy (po najezení) jsou MK preferovaným palivem, což odpovídá až 90 % celkového acetyl-CoA poskytnutého srdečním mitochondriím. MK jsou metabolizovány β -oxidací, která produkuje acetyl-CoA, NADH a $FADH_2$. Acetyl-CoA vstupuje do Krebsova cyklu, tvořícího více NADH a $FADH_2$. Glukóza je metabolizována zpočátku glykolytickou cestou za tvorby relativně malého množství ATP a také pyruvátu, jež vstupuje do Krebsova cyklu. V nepřítomnosti kyslíku je celkové množství energie, které se tvoří těmito procesy, nedostatečné k vyrovnání potřeb srdce. Požadavek srdce na energii je naplněn – ale jen vstupem výsledného NADH a $FADH_2$ do elektronového transportního řetězce, který tvoří ATP oxidativní fosforylací v mitochondriích. Kyslík slouží jako terminální elektronový akceptor

v dýchacím řetězci; při chybění dostatečného množství kyslíku se elektronový transport zastavuje a kardiální energetické potřeby nejsou kryty. Konstatní doplňování kyslíku je však pro zachování kardiální životaschopnosti a funkce nevhodné.

Role **kyslíku** a s kyslíkem spjatých procesů v srdci jsou komplexní; mohou být prospěšné nebo mohou přispívat ke kardiální dysfunkci a smrti. Také uskladnění kyslíku v srdci je komplexní. Kyslík je hlavní determinantou myokardiální genové exprese, a jak klesají hladiny myokardiálního kyslíku během izolované hypoxie či s ischemií-spjaté hypoxie, modely genové exprese v srdci jsou viditelně pozměněny. Kyslík se podílí na tvorbě NO, hrajícího významnou roli ve vymezení cévního tonu, kardiální kontraktility a různých dalších parametrů. Kyslík je rozhodující účastník v tvorbě ROS, jež se mohou podílet jako „dobročinné“ molekuly v buněčných signálních procesech nebo mohou indukovat ireverzibilní buněčné poškození a smrt, a četných dalších buněčných procesů – význam jeho role v srdci je podstatný v pochopení patogeneze kardiální dysfunkce. (40)

2.3.2 Patogeneze ischemie/reperfúze

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) je heterogenní skupina poruch, které zasahují srdce a krevní cévy. Tyto choroby jsou charakterizovány jako angina pectoris, hypertenze, kongestivní srdeční selhání, akutní infarkt myokardu (AIM) a arytmie. V poslední době jsou zvažována biochemická, fyziologická a farmakologická data podporující spojení mezi reakcemi VR a kardiovaskulárním tkáňovým poškozením. Hromadí se důkazy, že podmínky nemoci jsou přímo či nepřímo spojeny s oxidačním ničením a sdílejí společné mechanismy molekulárního a buněčného poškození.

Aktivní zahrnutí VR do ischemicko-reperfúzního poškození je demonstrováno přímými i nepřímými experimentálními důkazy. Přímé důkazy vyplývají z možnosti měření radikálů v myokardiální tkáni elektronovou spinovou rezonancí a spinovou vychytávací metodou; nepřímé pak měřením produktů útoku VR na biologické substráty a měřením intra- a extracelulární antioxidační kapacity. Dále se v současnosti vychází z experimentálních nálezů, že v ischemické tkáni je poškození antioxidačních mechanismů. Důkazy jsou podporovány kardioprotektivními efekty látek indukujících antioxidační enzymy v srdci a prospěšnými efekty několika enzymatických zametačů VR, antioxidantů a chelátorů železa v reperfúzním myokardu. (15)

Ischémie

Myokardiální ischémie se objevuje, když potřeby kyslíku převáží jeho dodávku, což vede k buněčnému poškození. V současnosti je pozornost soustředěna na následující rysy ischemického a postischemického srdce: rozvoj acidózy, tvorba edému, přesycení vápníkem, tvorba VR a nadprodukce NO (to spolu vytváří irreverzibilní ničení). Rychlý pokles kyslíku v ischemických tkáních vede k přepnutí z oxidativního na anaerobní metabolismus. Během minut nástupu ischémie přesáhnou energetické potřeby srdeční kapacitu anaerobně syntetizovat ATP. Laktát a netlumivé vodíkové ionty se hromadí v tkáni, což vede k rychlé změně tkáňové acidobazické rovnováhy. Selhání všech energeticky závislých mechanismů vede k zhoršení membránových iontových gradientů, otevření selektivních i neselektivních iontových kanálů a vyrovnání většiny intra- a extracelulárních iontů. Jako důsledek této anoxické depolarizace opouštějí K^+ ionty buňku, Na^+ , Cl^- a Ca^{2+} do ní vstupují. Buněčná akumulace iontů formuje cytotoxický edém. Intracelulární přesycení Ca^{2+} může také spustit kaskádu událostí, jež mohou vést k tvorbě ROS. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} aktivuje proteázy, které konvertují xanthindehydrogenázu na XO. (15)

Mezi faktory ischemického poškození srdce se klade největší pozornost tvorbě ROS, považovaných za hlavní determinanty myokardiálního poškození. Ischémie zapříčiňuje změny v obranných mechanismech vůči OFR, hlavně redukci aktivity mitochondriální SOD a ochuzování tkání o redukovaný glutathion. (38) ROS aktivace je pouze jedním přispívatelem post-MI nekrózy a reperfučního poškození. Nejméně 20% pacientů trpících na IM pokračují ve vývoji srdečního selhání. Způsob, kterým se komory hojí a remodelují po IM je hlavní determinantou v případné kardiální funkci a progresi srdečního selhání. ROS se podílí na procesech remodelace mnoha způsoby; jako signální molekuly v rozvoji kompenzační hypertrofie a ztrátě myocytů díky apoptóze či smrti jiných buněk. (40) Zvýšené hladiny železa v těle byly spojeny se zvýšeným rizikem CHD či IM. Osoby s HH mají zvýšené riziko kardiovaskulární smrti a IM. Větší tloušťka intimy – medie karotidových artérií je spolehlivým markerem vykazujícím včasnou strukturální vaskulární patologii spojenou s KVS rizikovými faktory a CHD. (31)

Myokardiální ischémie je odvozena z **akutní zánětlivé odpovědi**, jež je silně posílena reperfúzí. Odpověď akutní fáze, odvozená in vivo tkáňovým ničením, je charakterizována patofyziologickou kaskádou prozánětlivých reakcí, např. produkcí cytokinů, horečkou, aktivací komplementu, leukocytózou, proteosyntézou akutní fáze

a infiltrací tkáně netrofy - *polymorfonukleárními leukocyty* (PMN). V neporušeném organismu zahajuje ischemické myokardiální poškození akutní zánětlivou odpověď, v níž jsou PMN hlavními účastníky. Důkazy indikují, že spoluprobíhající zánětlivé reakce jsou posilovány reperfúzí a že akumulace PMN může přispívat k myokardiálnímu poškození, tj. uvolněním VR odvozených od kyslíku, proteáz a leukotrienů. PMN jsou zahrnuty do akutní zánětlivé odpovědi na tkáňové poškození a mají kapacitu k produkci OFR, pokud jsou aktivovány přiměřenými stimuly. PMN jsou takto první linií obrany organismu proti invadujícím patogenům. Jsou zároveň mediátory tkáňové destrukce u zánětlivých chorob. PMN se hromadí v ischemickém a reperfundovaném myokardu pod vlivem chemoatraktantů. Během kardiopulmonárního bypassu může chelátor železa deferoxamin rušit PMN rozvoj a kalciový antagonist nifedipin snižuje PMN degranulaci. Několik léčiv používaných v léčbě u pacientů s ischemií myokardu (blokátory vápníkového kanálu, lidokain, heparin a kaptopril) inhibují tuto funkci mimo jejich vlastní farmakologické efekty, ale jejich přispění k inhibici PMN v celkovém působení těchto léčiv je neznámé.

Leukocyty mohou být spjaty s rozsahem koronární arteriální choroby (CAD) a rizikem koronární rekurence IM. U pacientů s AIM počet bílých krvinek vzrůstá během několika hodin po nástupu bolesti na hrudi, s vrcholem 2-4 dny po infarktu a návratem k normálu během 1 týdne. Léčba streptokinázou u pacientů s AIM se ukázala být spojená s prudkou komplementovou aktivací a přechodným snížením počtu leukocytů, který je následován novým vzrůstem počtu cirkulujících buněk. Po permanentní koronární okluzi se PMN hromadí v lidském myokardu během 24 hodin, jejich přítomnost dosahuje vrchol za 24 hodin a mizí za 1 týden. (42)

Reperfúzní poškození

Expozice myokardiální tkáně krátké, přechodné ischemií, následované reperfúzí, poutá v současnosti značnou pozornost. Reperfúze ischemického myokardu je potencionálně prospěšná, jelikož mortalita je přímo proporcionální velikosti a vážnosti infarktu a délce trvání ischemie. Reperfúze může obnovit kyslík a substráty buňkám ischemického myokardu, ale tento proces může vytvářet jinou formu myokardiálního poškození – **reperfúzní poškození** (RP). (15) Včasná reperfúzní léčba ischemizovaného myokardu může zachránit ohroženou tkáň a redukovat morbiditu a mortalitu. (43) Tato obnovení normálního toku krve srdcem metodami jako je angioplastika, trombolytické látky či kardiopulmonární bypass mohou vést ke specifickým lézím (arytmie, deficity kontraktility, nekróza), jejichž významnost také

závisí na trvání ischemie. Ačkoli u pacientů s AIM včasná reperfuze zesiluje strukturální a funkční uzdravení myokardu a zlepšuje přežití, hromadí se experimentální důkazy ukazující, že myokardiální reperfuze může posilovat potenciálně kardiotoxické zánětlivé reakce. (3) Znovuvstoupením kyslíku během reperfuze je exacerbována produkce toxických kyslíkových metabolitů, současně vzrůstá produkce OFR v mitochondriích a leukocytech. (38)

Postischemická reperfuze nese svou škodlivou komponentu, která může zčásti rušit příznivé účinky obnoveného přítoku. Hlavními mediátory tohoto jevu jsou ROS a PMN. ROS, tvořené ve velkých množstvích při přítoku, indukují oxidační poškození tkání a modulují různé události, které nakonec vedou k tkáňovému poškození. (39) PMN jsou buněčnými mediátory myokardiálního reperfučního poškození, primárně pro tvorbu biologicky aktivních OFR. Inhibice PMN může redukovat myokardiální poškození po experimentální ischemii a reperfúzi. (42) Neutrofilní aktivace je doprovázena uvolněním lytických, prozánětlivých a vazokonstrikčních molekul a tyto mohou upchat kapiláry. Průtok tak může být narušen na mikrovaskulární úrovni, navzdory postačujícímu průtoku v epikardiálních atériích (tzv. „no-reflow“). Tento jev reprezentuje všudypřítomnou reakci tkání vůči ischemii a reperfúzi. (39)

Důkazy potvrzují, že poškození myokardiální buňky indukované cyklem ischemie a reperfuze může být zčásti zapříčiněno tvorbou toxických ROS jako je superoxidový radikál (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál (OH^\cdot). ROS při RP mohou pocházet z intracelulárních (mitochondrie, XO) či z extracelulárních zdrojů (neutrofily a makrofágy). Během reoxygenace může XO užít O_2 jako elektronového akceptoru, vedoucí k formaci superoxidového aniontu a peroxidu vodíku, jež mohou reagovat za tvorby hydroxylových radikálů. Poškození myokardiální tkáně může taktéž uvolňovat ionty železa, které stimulují reakce VR. Dalším zdrojem OFR je intramitochondriální elektronový transportní řetězec. Poškození mitochondriální funkce a zvýšená produkce superoxidu jsou naprosto obecnými jevy spojenými s reperfúzí. Experimentální studie ukázaly, že mitochondriální dysfunkce je následována zvýšenou produkcí O_2^- touto organelou po expozici srdečního svalu vůči ischemii/reperfúzi.

Zvýšená tvorba ROS následující hypoxii/reoxygenaci je naneštěstí spojena s nízkou **antioxidační kapacitou** myokardiální tkáně. Jmenovitě v myocytech i endoteliálních buňkách je velmi nízká koncentrace katalázy a její většina je kompartmentizována v peroxizómech. Tato subcelulární lokalizace chrání katalázu před tím, aby byla účinným akceptorem H_2O_2 (aktivitou SOD v cytosolu). Nedostačující

antioxidační kapacita tkáně k zamedění zvýšeného obsahu ROS po ischemii/reoxygenaci se jeví jako důležitý faktor přispívající ke tkáňové dysfunkci. Zvýšení oxidačního stresu při RP je spojeno s funkčním poničením vaskulární aktivity a uvolněním kreatinkinázy, laktátdehydrogenázy, myoglobinu a troponinu C do krevního toku z cytosolového kompartmentu. Kaskáda událostí spojených s ischemicko/reperfúzním poškozením mimo tvorby VR zahrnuje uvolnění cytokinů a růstových faktorů, leukocytovou adhezi, agregaci destiček, proliferaci hladkých svalů a mechanické postižení. (39, 38)

2.4 Obranné mechanismy vůči oxidačnímu stresu

OFR jsou velmi reaktivní chemické sloučeniny, schopné indukovat oxidativní modifikaci dalších molekul. Jsou vytvářeny v malých množstvích během normálního metabolismu buněk a jsou normálně inaktivovány endogenními zametacími systémy („scavengers“). (39) Buňky jsou chráněny za fyziologických podmínek vůči železem indukovanému oxidativnímu poškození transportními proteiny jako je Tf a laktoferin (Lf) a železo uskladňujícími proteiny jako Ft a hemosiderin, které oddělují železo ve formách, jež minimalizují převod elektronů z železa na molekulární kyslík. Svou činností tyto proteiny předcházejí tvorbě nových reaktivních forem. (3, 8)

Ischémie obecně zapříčiňuje změny v obranných mechanismech vůči OFR. (38) Speciálně u nemocných osob jsou antioxidační mechanismy redukovány, což vede k nerovnováze mezi produkcí VR a jejich odstraňováním, z čehož plyne akumulace koncových produktů působení VR a pomalu progredující poškození tkání. (15)

Strategie inhibice poškození volnými radikály zahrnuje jak endogenní antioxidační mechanismy, tak využití chelatační terapie.

2.4.1 Antioxidační systém

ROS jsou příliš reaktivní aby mohly být tolerovány v živých tkáních. Aby se zabránilo přesyčení volnými radikály a peroxidy, používají aerobní organismy sofistikovaný obranný systém, kterým působí v intra- a extracelulárních vodných fázích tak i v membránách. Strategie antioxidační obrany souvisí se zásahem do oxidativního útoku v jeho časných momentech (tj. tvorba prvotních radikálů) i během iniciačních a řetězových propagačních procesů. Antioxidační ochrana se zdá skládat ze 4 sekvenčních hladin defenzivní aktivity: preventivní, štěpící řetězce, opravné a adaptivní.

První z nich (preventivní), široce enzymatická, zahrnuje enzymy, jejichž aktivita závisí hlavně na stopových množstvích minerálů (Mn, Cu, Zn a Se), jako je SOD, glutathionperoxidáza a kataláza.

Druhá zahrnuje vitaminy C a E a karotenoidy a je spjata s prevencí proliferace sekundárních radikálů v řetězových reakcích jako je lipidová peroxidace (iniciována a vedena primárními radikály).

Třetí (opravná) je enzymatická prevence formace sekundárních radikálů z koncořetězových derivátů a umožňující odstranění těchto molekul z prostředí, v němž reakce katalyzované kovy mohou způsobit další oxidativní poškození.

Nakonec, **adaptace** může být též zahrnuta v antioxidantním mechanismu. VR také fungují jako signál umožňující indukci syntézy a transportu příslušných antioxidantů na jeho místo působení. (15)

Nejlépe charakterizovanou antioxidantní protiváhou ROS je *enzymatická* cesta přes katalázu, glutathionperoxidázu, glutathionreduktázu, SOD, hemoxygenázu, thioredoxin s thioredoxinreduktázou (dvě poslední katalyzují tvorbu antioxidantů jako je ubiquinon, kyselina lipoová a askorbová). Jsou zároveň cennými markery v antioxidantní odpovědi. Delece thioredoxinreduktázy vede k vývojovým srdečním abnormalitám a u kardiální smrti sekundárně k těžké dilatované kardiomyopatii. *Neenzymatické* mechanismy jsou představovány intracelulárními antioxidanty (vitamin C a E, β -karoten, koenzym Q - tj. ubiquinon, kyselina lipoová a močová a také glutathion a metallothioneiny). (40)

Mezi nejvýznamnější **intracelulární** vychytávače patří SOD, kataláza, glutathion a glutathionperoxidáza. **Extracelulární** zametači jsou pak představováni vitamínem C a E, karotenoidy, kyselinou močovou a plazmatickými bílkovinami, které fungují jako chelátory kovů – Fe (Ft, Tf a myoglobin) a Cu (albumin, ceruloplazmin a metallothionein). (15)

Antioxidanty (AOX)

AOX přitahují vědeckou a klinickou pozornost v medicíně. Experimentální *in vivo* a *in vitro* studie i epidemiologické studie navrhuji korelaci mezi vážností oxidačním stresem indukovaných chorob a hladinami AOX, což indikuje, že stav AOX může být relevantní lidskému zdraví a nemoci. Široká škála přírodních a syntetických antioxidantních léčiv a suplement je navrhována pro profylaktické a terapeutické účely.

Rostoucí zájem se opírá o *malé antioxidantní molekuly*, jako je koenzym Q, vitamin E (α -tokoferol), vitamin C (kyselina askorbová), vitamin A a karotenoidy, kyselina močová, melatonin a aminoindoly. Pozornost fyziologická i farmakologická je upřena i na *rostlinné antioxidanty* jako flavonoidy a polyfenoly a na α -lipoovou kyselinu. *Syntetickými antioxidanty* jsou mimo jiné deriváty přírodních antioxidantů (analogy α -tokoferolu), fenolické antioxidanty, 21-aminosteroidy a lazaroidy, sloučeniny obsahující sulfhydrylové seskupení (thiazolidin, dithiolethiony) a nízkomolekulární napodobeniny SOD. Množství

léčiv jako betablokátoři, ACEI, blokátory kalciového kanálu a H₂-antihistaminika zametají ROS, inhibují lipidovou peroxidaci a moduluji oxidaci LDL-lipoproteinů.

Antioxidační terapie nabývá významu u CAD, AT a zánětu. Nicméně konečný průkaz prospěšných efektů této terapie u pacientů s CHD stále chybí. (15) Studovaly se změny mezi funkčními a bioenergetickými efekty AOX podávaných před a po myokardiální ischemii. Všechny AOX podané před ischemií inhibovaly obnovu ATP ve srovnání s kontrolami. AOX podané před ischemií snižovaly účinnost kontrakce během reperfúze ve srovnání s kontrolami. To vede k poznatku, že ROS tvořené během ischemie zesilují bioenergetickou obnovu díky vzestupu účinnosti kontrakce. (44)

2.4.2 Chelatační terapie

V současnosti neexistuje uspokojivá terapie onemocnění z předávkování železem. Chelátory železa pomáhají dlouhodobému přežívání u těchto pacientů a redukuje incidenci kardiální dysfunkce. Ačkoli chelatační léčba zlepšuje přežívání, tito pacienti jsou stále v riziku rozvoje pozdní železem-indukované kardiomyopatie. Proto pochopení mechanismů akumulace železa v srdci a jiných tkáních mohou být užitečnými pro rozvoj nových léčebných strategií u pacientů s předávkováním železem (4). Jeden z nejúspěšnějších přístupů v prevenci poškození VR představuje **chelatace kovů**. (15)

Deferoxamin (Desferal; DFO)

DFO, silný specifický chelátor železa, byl použit v experimentálních modelech infarktu, v nichž je využita určitá hladina protekce. (15) Tvoří stabilní komplex s železitými ionty Fe³⁺, snižujíc tak jejich přístupnost pro tvorbu ROS. Může také snižovat aktivaci endoteliálních buněk v odpovědi na TNF- α a kolagenem-indukovanou destičkovou agregaci plné krve. Ve vyšších koncentracích (>0,5 mmol/l) může zametat ROS. (36)

Prospěšný efekt DFO může být vysvětlen jeho schopností redukce, tj. inaktivace tetrylmyoglobinu. (15) Chelatace železa DFO blokuje železem-katalyzovanou Fentonovu reakci, ale také inhibuje propylhydroxylázy a tímto aktivuje určité hypoxii-indukovatelné transkripční faktory (HIF), které spouštějí adaptaci buňky na hypoxii. (45, 6) Chemická neutralizace volného železa touto sloučeninou byla hodnocena experimentálně pro vliv železa na biochemické účinky OFR. Vázání do komplexu s DFO brání volnému železu účastnit se na Fentonově reakci, která produkuje toxický OH \cdot radikál z H₂O₂, a tak léčbou tímto chelátorem železa může být dosaženo oslabení radikálového poškození. Nově byl odhalen

dodatečný mechanismus, kterým DFO může zvyšovat dlouhotrvající ischemickou toleranci srdce. Bylo rozpoznáno, že expozice DFO může aktivovat rodinu **hypoxii-indukovatelných faktorů** (HIF) v izolovaných buňkách i in vivo. Dlouhotrvající indukce protektivních genů může tvořit slibný cíl profylaktické intervence. Je však nutno zjistit, zda by léčba jednodávkovým podáním DFO poskytla udržovací kardioprotekci in vivo a zda aktivace HIF systému či intervence přes kyslíkové radikály smí reprezentovat převládající mechanismus působení DFO. Oba mechanismy mohou zmírňovat tkáňové poškození při ischemii a reperfúzi.

Nicméně redukce rozsahu infarktu byla dosažena pouze pokud byl DFO podán určitý interval před ischemií, zatímco podání souběžně s reperfúzí bylo neúčinné. Pozorování ukazuje, že DFO působí hlavně tzv. „**prekondicí srdce - předléčbou**“ proti hypoxii, ale cesta efektu limitování infarktu DFO nebyla objasněna. Akutní a prodloužená „myokardiální prekondice“ je spuštěna v odpovědi na hromadění kyslíkových radikálů a aktivaci proteinkinázy C. Kinetika ischemické prekondice se dělí na akutní reakci, zvyšující ischemickou toleranci během několika minut, která je následována prodlouženým „druhým oknem“ kardioprotekce, způsobeným zvýšenou expresí kardioprotektivních genů. (45)

Pomocí DFO bylo prokázána hypotéza, že redukce vaskulární zásoby železa může zvrátit endoteliální dysfunkci předloketních rezistentních cév u pacientů s CAD. DFO zlepšil NO-zprostředkovanou, endoteliálně závislou vazodilataci u pacientů s CAD. (36)

Hodnocení myokardiálního železa během chelatační terapie není proveditelné opakovanými endomyokardiálními biopsiemi díky heterogenitě distribuce železa a riziku komplikací. Byla popsána neinvazivní metoda založená na zobrazení magnetickou rezonancí. Tato metoda byla využita pro opakovaný odhad myokardiálního obsahu železa během chelatační terapie DFO u 14 dospělých pacientů s thalassémií s transfúzním předávkováním železem. (46)

Laktoferin (Lf)

Ačkoli je Lf intenzivně studován, není jeho funkce v organismu zcela objasněna. Lf vykazuje celé spektrum aktivit a jeho funkce bude pravděpodobně komplexní. Lf je monomerní železo vázající glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 80 kDa. Spolu s Tf a ovoTf patří do rodiny „transferinů“ (přibližně ze 60 % se shoduje se sérovým Tf). Vazebné místo pro železo umožňuje vazbu dvou molekul železa, která je pevná, ale

reversibilní. U Lf probíhá uvolňování železa v normálním stavu při pH kolem 3, zatímco Tf a izolovaná N - podjednotka Lf uvolňuje železo už při pH 5,5. (47, 48). V přirozeném stavu je Lf z 15 až 20 % nasycen železem a má lososově růžovou barvu, jejíž intenzita je závislá na stupni nasycení železem. Lf, který obsahuje méně jak 5 % železa je označován jako **apolaktoferin**. Naopak Lf plně nasycený železem je **hololaktoferin**. Afinita Lf k železu je vysoká, asi 260 krát vyšší než afinita sérového Tf a na rozdíl od Tf je schopen udržet železo i při nižším pH. Je schopen vázat i jiné kationy kovů jako např.: Cu^{2+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Zn^{2+} nebo kyselých molekul jako je heparin, DNA a různé povrchové molekuly. (49, 50)

Lf se fyziologicky vyskytuje v mnoha tkáních, orgánech i tekutinách lidského těla. Predominantně se vyskytuje v sekretech exokrinních žláz, které jsou lokalizovány ve vstupních branách do trávicího, respiračního a reprodukčního systému. (51) Lf byl ale také nalezen v ledvinách, žlučníku, pankreatu, gastrointestinálním traktu a játrech. V PMN je protein skladován ve speciálních (sekundárních) granulích, kde zůstává do doby buněčné aktivace. Po kontaktu s cizím antigenem tyto buňky degranulují a uvolňují velké množství antibakteriálních a antivirových peptidů, mezi které patří i Lf. Tento proces je hlavním zdrojem Lf v plasmě. Hladina Lf v plasmě je při fyziologickém stavu velmi nízká (1 $\mu\text{g/ml}$), ale při některých patologických stavech, např. při zánětu, prudce stoupá a dosahuje koncentrace až 200 $\mu\text{g/ml}$. Po degranulaci je Lf odstraněn z cirkulace různými mechanismy, převážně pomocí buněk monocyto-makrofagového systému. Tyto buňky mají receptory s vysokou afinitou k Lf a dopravují vázané železo do Ft, což je spojeno s destrukcí Lf. Lf proniká do buňky z okolního prostředí a je transportován do jádra buňky, kde se specificky váže k určitým strukturám DNA. Tím dochází ke spuštění transkripce reporterových genů.

Lf má velkou schopnost vázat Fe, jeho afinita k Fe je 260x vyšší než u Tf. (49) Lf chelatuje trojmocné železo a tak působí proti tvorbě VR. Bylo prokázáno, že brání vzniku hydroxylového radikálu, který vzniká při Fentonově a Haber-Weissově reakci. (52) Současně Lf ovlivňuje zánětlivou reakci organismu a tvorbu ROS i jiným mechanismem, který je dán jeho schopností vázat železo. Při Fentonově reakci vzniklý Fe^{3+} je vázán Lf a bezpečně transportován do makrofágů retikuloendoteliálního systému, kde je skladováno v podobě Ft. Endogenní Lf se tedy podílí na regulaci vzniku ROS. (53) Lf vykazuje účinky antibakteriální, antivirové, antifugální, antiparazitické, antitumorové, imunomodulační; ovlivňuje zánět a hypersenzitivní reakce, enzymatickou aktivitu, reguluje transkripci genů a je také přirozeným antioxidantem. (54, 53)

Klinické využití chelátorů

Terapeuticky je **DFO** aplikován pro podporu renální exkrece železa u onemocnění spojených s jeho nadbytkem či intoxikací. (45) Chelatační terapie DFO se provádí u dospělých pacientů s thalassémií s transfúzním předávkováním železem. (46) Chelatační terapie DFO může vést k negativní bilanci železa, snížit incidenci a vážnost železem-indukované kardiotoxicity a prodloužit přežití. Nicméně, abychom byli úspěšní, musí se podat s.c. infuzí po 8-10h/den. Nízká compliance spojená s tímto obtížným podávacím schématem se promítá do sníženého přežívání pacientů. (25,4) Některé (ne všechny) studie účinku chelátoru DFO na ischemické myokardiální dění u zvířat vykazují prospěšný efekt předléčby touto látkou na RP. (8)

Strukturální a biochemická podobnost **Lf** s **Tf** ukazuje, že **Lf** může hrát určitou roli v metabolismu železa jako jeho transportní molekula. Přestože je **Lf** intenzivně zkoumán, stále chybí přesvědčivý důkaz o jeho zapojení do regulace homeostázy železa nebo vstřebávání železa z tenkého střeva při fyziologickém stavu. Jak se zdá, mohl by **Lf**, vzhledem ke svým vlastnostem, účinně působit proti tvorbě VR při ischemicko-reperfúzním poškození srdce. Předpokládá se, že bude účinně působit nejen u ischemicko-reperfúzního poškození, ale i v tkáních s vysokým metabolickým obratem (plíce, ledviny, játra), kde se předpokládá větší tvorba VR. (51, 52)

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Metodická část

3.1.1 Zvířata

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

3.1.2 Chemikálie, přístroje a nástroje

Chemikálie

ethylurethan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, SRN)

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

heparin (Zentiva a.s., ČR)

isoprenalin

laktoferin (SVUS, Hradec Králové)

Přístroje a nástroje

chirurgické nástroje (peány, nůžky, skalpely, nitě)

kanylky

Valu-Set, PE katetry

tlakový snímač BPR-02

plně komputerizovaný přístroj pro měření srdečního výdeje a odvozených parametrů

Cardiosys® (Experimentria Ltd, Maďarsko), software Cardiosys V 1.1.

mikropipety

pH metr (pH 538 WTW)

3.1.3 Pilotní studie podání laktoferinu

Třem potkaním samicím byl v odlišných dávkách s časovým odstupem aplikován laktoferin (LA) do postranní ocasní žíly pomocí kanylky a Valu-Setu. Jednotlivé dávky intravenózně podaného LA byly 21,2 mg/kg, 100,0 mg/kg a 47,19 mg/kg (viz Tab. č. 1). Pro usnadnění aplikace LA byly žíly dilatovány nahříváním ocasu horkou vodou. Sledovali jsme edematózní změny a hematurii u samice s nejvyšší dávkou (100,0 mg/kg), a proto byla ještě tato samice sledována v pravidelných časových intervalech.

Tab. č. 1: Jednotlivá i.v. podání laktoferinu

pořadové číslo samic	hmotnost samice [mg]	dávka LA [mg/kg]
1.	330	21,2
2.	370	100,0
3.	350	47,19

3.1.4 Model akutního infarktu myokardu

Pro studium infarktu myokardu jsme vybrali **isoprenalinový model**. Podání nekrogenních dávek isoprenalinu navozuje u potkanů nejdříve absolutní ischémii, která je následována stavem podobným IM s manifestovanými morfologickými a funkčními změnami. Pokus provedl Mgr. Přemysl Mladěnka.

Isoprenalinový model

Potkanům jsme podali isoprenalin (ISO) s.c. v dávce 100 mg/kg podle původní studie Blasig et al., 1985. Za 24 h po aplikaci jsme měřili funkční parametry. (55)

Funkční parametry

V celkové anestezii, navozené i.p. podáním 1 g.kg⁻¹ urethanu ve 20% vodném roztoku, jsme provedli měření srdečního výdeje a odvozených parametrů s využitím Stewartovy-Hamiltonovy termodiluční metody. Polyethylenový katétr (0,5/1,0 mm), naplněný heparinizovaným fyziologickým roztokem, jsme zavedli přes pravou v. jugularis ext. do pravé předsíně k podání indikátoru – chlazený fyziologický roztok o teplotě nižší než 10°C o objemu 0,1 ml. Prostřednictvím a. carotis comm. sin. jsme zavedli termistorový katétr do aortálního oblouku, což umožnilo transpulmonární měření změn teploty krve a vytvoření termodiluční křivky. Třetí PE katétr (0,5/1,0 mm), naplněný heparinizovaným fyziologickým roztokem (10 IU.ml⁻¹) a spojený s tlakovým snímačem BPR-02, jsme zavedli do pravostranné a. iliaca comm. Sensory jsme propojili s plně komputerovaným přístrojem pro měření srdečního výdeje a odvozených parametrů Cardiosys®, software Cardiosys V 1.1.

Měření termodiluční křivky jsme provedli po stabilizaci fyziologických funkcí 4x v pětiminutových intervalech. Další proměnné byly buď simultánně měřeny nebo počítány:

- **tlaky krve (BP):** střední (mBP), systolický (sBP), diastolický (dBP) (mmHg)
- **srdeční frekvence (HR; tepy.min⁻¹)**
- **srdeční index (CI; ml.min⁻¹.kg⁻¹)**
- **index tepového objemu (SVI; ml.kg⁻¹)**
- **sBP x HR** (tzv. dvojnásobek, “double product”, parametr srdeční spotřeby kyslíku; mmHg.tepy.min⁻¹)
- **index celkové periferní rezistence mBP/CI (Rs,totI; mmHg.ml⁻¹.min.kg)**
- **index srdečního výkonu, CI x mBP (CPOI; mmHg.ml.min⁻¹.kg⁻¹)**

Veličiny byly měřeny 4x v 5 minutových intervalech. Naměřené hodnoty u modelového případu jsou shrnuty v Tab. č. 2.

Tab. 2. Funkční parametry po 24 h po podání isoprenalinu (ISO) s.c. v dávce 100 mg/kg

veličina (jednotky)	měření č.1	měření č.2	měření č.3	měření č. 4	průměr	sm. odch.
systolický tlak (mmHg)	119	127	129	131	126,5	4,555217
střední tlak (mmHg)	94	102	103	104	100,75	3,960745
diastolický tlak (mmHg)	82	90	90	92	88,5	3,840573
srdeční frekvence (úder/min)	475	479	482	475	477,75	2,947457
teplota krve (°C)	36,8	36,9	36,8	36,6	36,775	0,108972
teplota indikátoru (°C)	14,6	14,4	14,3	14,3	14,4	0,122474
srdeční výdej (ml / min)	46	53	52	48	49,75	2,861381
tepový objem (ml / úder)	0,1	0,11	0,11	0,1	0,105	0,005
dvojprodukt (FS x střední TK) (mmHg*úder / min)	44650	48858	49646	49400	48138,5	2034,161
periferní odpor (mmHg*min / ml)	2,056	1,936	1,975	2,189	2,039	0,096817
srdeční práce (ml / min*mmHg)	4298	5375	5371	4941	4996,25	440,0269
index srdečního výdeje (ml / min / kg)	186,6	215,1	212,9	193,9	202,125	12,1771
index tepového objemu (ml / úder / kg)	0,408163	0,448979	0,448979	0,408163	0,42857	0,020408
dvojprodukt (FS x střední TK) (mmHg*úder / min / kg)	182244,9	199420,4	202636,7	201632,6	196484	8302,7
index periferního odporu (mmHg*min / ml / kg)	8,391836	7,902040	8,061224	8,934693	8,32245	0,395171
index srdeční práce (ml / min*mmHg / kg)	17542,85	21938,77	21922,44	20167,34	20392,9	1796,028
hmotnost zvířete (g)	245					
hmotnost komor bez krve (g)	1,256					
hmotnost komor bez krve/kg (%)	5,1					

3.1.5 Podání laktoferinu (viz Tab. č. 3 a 4)

Třem potkanům byl 3 dny po sobě podáván laktoferin (LA) opakovaně každých 24 hodin v dávce 20 mg/kg. U dvou (LAI1 a LAI2) z těchto tří byl ještě 4. den aplikován u LAI1 25,5 mg a u LAI2 26 mg isoprenalinu k navození infarktu myokardu (LA 3x20 mg/kg + ISO). Poslednímu ze tří (LAI) jako kontrolnímu vzorku nebyl ISO podán (LA 3x20 mg/kg).

Čtvrtému a pátému potkanovi (LAI3 a LAI4) byl laktoferin aplikován jednorázově v dávce 50 mg/kg a po 5 minutách u LAI3 27,5 mg a u LAI4 26 mg isoprenalinu (LA 50 mg/kg + ISO).

Tab. č. 3: Podání laktoferinu (LA) a isoprenalinu (ISO) u jednotlivých zvířat

	Opakované podání LA	Jednorázové podání LA	Podání isoprenalinu
LAI1	20 mg/kg (3x)	-----	25,5 mg
LAI2	20 mg/kg (3x)	-----	26 mg
LAI	20 mg/kg (3x)	-----	kontrolní
LAI3	-----	50 mg/kg	27,5 mg
LAI4	-----	50 mg/kg	26 mg

Tab. č. 3: Schéma podávání laktoferinu

		21.XI	22.XI	23.XI	24.XI	25.XI
LAI1		20mg/kg LA	20mg/kg LA	20mg/kg LA	ISO	+
	m	250	225	250	255	240
	LA	5	4,5	5	-	
	I (urethan)	-	-	-	25,5mg	(1,4ml)
LAI2		20mg/kg LA	20mg/kg LA	20mg/kg LA	ISO	+
	m	250	250	255	260	240
	LA	5	5	5,1	-	
	I (urethan)	-	-	-	26 mg	(1,4ml)
LAI3		20mg/kg LA	20mg/kg LA	20mg/kg LA	+	
	m	250	250	260	240	
	LA	5	5	5,2		
	I (urethan)	-	-	-	(1,4ml)	
LAI4		50mg/kg LA + ISO	+			
	m	275	245			
	LA	13,75				
	I (urethan)	27,5mg	(1,5ml)			
LAI5		50mg/kg LA + ISO	+			
	m	260	245			
	LA	13				
	I (urethan)	26 mg	(1,5ml)			

m - hmotnost zvířete v g

LA - dávka laktoferinu v mg

I (urethan) - dávka isoprenalinu, v závorce dávka 20% w/V roztoku urethanu

m(s) - hmotnost srdce v g

Získané hodnoty a veličiny týkající se podání LA a ISO konkrétním potkanům sloužily k indexaci a grafickému znázornění vztahu podání isoprenalinu, laktoferinu nebo laktoferinu a isoprenalinu na vitální funkce srdce (viz 4. Výsledky).

3.2 Histologické zpracování odebraných vzorků

3.2.1 Chemikálie, přístroje a nástroje

Chemikálie

aceton (LACH – NER s.r.o., Neratovice)
eosin G (Merck, Darmstadt, SRN)
ethanol 96% (Lihovar Chrudim a.s.)
ethylenglykol (Lachema n.p., Brno)
formol konc. (PENTA, Chrudim)
glycerol (ALMA)
hematoxylin (Lachema n.p., Brno)
chlorid železitý (Lachema n.p., Brno)
jodičnan sodný (Lachema n.p., Brno)
kanadský balzám (Lachema n.p., Brno)
kyselina fosfomolybdenová (LACH – NER s.r.o., Neratovice)
kyselina chlorovodíková (Lachema n.p., Brno)
kyselina octová (LACH – NER s.r.o., Neratovice)
kyselina pikrová (Polskie Odczynniki Chemiczne, Polsko)
kyselý fuchsin (Fisher Scientific, Velká Británie)
kyselina octová ledová (LACH – NER s.r.o., Neratovice)
oranž G (Fisher Scientific, Velká Británie)
parafin (PARAMIX, Holic)
Ponceau RR (Loba-Chemie, Wien, Rakousko)
síran hlinitý (PENTA, Chrudim)
světlá zeleň (Fluka AG, Švýcarsko)
xylen (Kulich, Hradec Králové)
žlutá krevní sůl (kalium ferrokyanatum) $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ (PENTA, Chrudim)

Přístroje a nástroje

mikropipety
pH metr (pH 538 WTW)
míchačka (MM1, Laboratorní přístroje Praha)
termostat

kovové komůrky, špaličky

nůž

laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce apod.), kyvety

podložní a krycí sklíčka

diamant k popisu sklíček

preparační jehly a štěteček

sáňkový mikrotom (Leitz-Wetzlar, Reichert)

rotační mikrotom (MPS-2)

elektrická ploténka

světelný mikroskop (Hund Wetzlar V 300)

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

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

software LUCIA verze 4.71 (Laboratory Imaging Prague ČR)

3.2.2 Zpracování materiálu pro histologickou analýzu

Tkáň odebraná pro histologické vyšetření jsme nejprve fixovali a označili číslem, pod nímž je vzorek evidován. Provedli jsme odvodnění, projasnění, prosycení parafinem a vlastní zalití vzorku do parafinu. Dále jsme připravili histologické řezy, které jsme ještě dále upravovali. Po odparafinování preparátů jsme přistoupili k histologickému barvení. Obarvené preparáty jsme zamontovali do kanadského balzámu a po zaschnutí byly připraveny pro analýzu světelnou mikroskopií.

Fixace vzorků

Fixace je rychlé vysrážení (denaturace) bílkovin, protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky. Cílem je zabránit samovolnému rozkladu tkáně neboli autolýze. Ta je podmíněna působením enzymů a vede rychle k hrubým změnám protoplazmy až k úplnému rozkladu buněk a tkání. Fixace musí být šetrná, aby byla zachována pokud možno taková struktura tkáně, jakou má tkáň zaživa. Fixace dále nesmí porušovat barvitelnost tkáně a musí do tkáně rychle pronikat. Tkáň resp. vzorek tkáně je nutno vložit do fixace co nejrychleji po odebrání. U celých orgánů se fixační roztok vstříká přímo do cév. Minimální doba fixace je 24 hodin, záleží na velikosti vzorku.

K fixaci jsme použili Bouinovu tekutinu. Po skončení fixace bylo nutno vzorek dále zpracovávat.

Bouinova fixační tekutina

nasycený roztok kyseliny pikrové ...300 ml
neutrální formol100 ml

Před upotřebením jsme na každých 100 ml takto připraveného roztoku přidali 5 ml kyseliny octové ledové.

Neutrální formol

K neutralizaci formolu se používá práškového CaCO_3 nebo MgCO_3 . Nasype se do láhve s formolem asi do výše 2 – 5 cm, občas se protřepe a během několika dnů je formol zneutralizován. Ředí se vodou.

Další zpracování

Tato procedura sestávala z odvodnění, projasnění, prosycení parafinem a následně vlastního zalití vzorku do parafinu. Při projasnění jde o odstranění ethanolu z tkáně. Při prosycování nesmí teplota parafinu překročit 58°C. Následně jsme připravili histologické řezy, které jsme ještě upravili k vlastní histologické analýze. Vzorky z fixační tekutiny jsme postupně vkládali do následujících tekutin na uvedenou dobu:

<u>Odvodnění tkáně:</u>	50% ethanol.....1 hod.
	70% ethanol.....1 hod.
	80% ethanol.....1 hod.
	aceton.....3x vyměnit během 24 hod.
<u>Projasnění:</u>	xylen 1.....10 min.
	xylen 2.....10 min.
<u>Prosycení:</u>	parafin 1 (56-58 °C).....24 hod.
	parafin 2 (56-58 °C)24 hod.

Zaliti vzorků do parafinu

Poté jsme zalévali vzorky do bločků zkvalitněným a přefiltrovaným parafinem (3-5 g včelího vosku na 100 g přepáleného parafinu). To jsme prováděli tak, že jsme vzorek tkáně umístili doprostřed čtverce, vytvořeného dvěma kovovými lištami tvaru L (komůrky), položenými na podkladu, a do čtverce jsme nalili teplý parafin a celý preparát jsme nechali ztuhnout asi jeden den. Po odejmutí kovových lišt jsme bloček se zalitým vzorkem ořízli pomocí nože na vhodnou velikost (vrstva parafinu kolem vzorku 3-5 mm) a uložili do označeného sáčku do chladu.

Příprava histologických řezů a další úprava

Před krájením jsme bloček nalepili na dřevěný špalíček, pomocí něhož jsme bloček se vzorkem upevnili do svorek sáňkového či rotačního mikrotomu. Nejprve jsme bloček nahrubo prokrájeli k vlastní tkáni. Pak jsme nařídili hlavici mikrometrického šroubu na požadovanou tloušťku řezů a krájeli tenké řezy o tloušťce 5 – 7 mikrometrů. Parafinové řezy jsme kladli na podložní sklíčka, předem označená příslušným číslem pomocí diamantu, potřená směsí bílku s glycerínem a kapkou destilované vody. **Směs bílku s glycerolem** je zde proto, aby se řez na sklíčko přilepil a později během barvení ze sklíčka neodplaval. Uvedenou směs jsme připravili ze stejného dílu vaječného bílku a glycerínu ušleháním a přefiltrováním. K filtrátu jsme přidali malý kousek káfru za účelem konzervace.

Na každé sklíčko jsme pomocí preparační jehly a štětečku přenášeli 2-4 preparáty. Ty jsme nechali na sklíčkách narovnávat položením na elektrickou ploténku o teplotě okolo 50 °C. Po napnutí řezu jsme preparát sejmuli z plotny a přebytečnou destilovanou vodu slili přes hranu sklíčka a sklíčko nechali volně oschnout. Podložní sklíčka s řezy jsme uložili do termostatu vyhřátého na 38 °C až 40 °C. Nakonec jsme preparáty odparafinovali.

Odparafinování: 3x xylén5 min
96 % ethanol5 min
70 % ethanol5 min
destilovaná voda5 min

Po odparafinování jsme sklíčka opatrně otřeli hadříkem a následovalo **barvení** (viz 3.3).

Zamontování do kanadského balzámu

Obarvené preparáty jsme vyzvedli z kyvety s xylemem, řádně a naposledy otřeli sklíčko v okolí preparátů. Poté jsme preparáty přikryli krycím sklíčkem, na němž byla kapka kanadského balzámu, a nechali několik dní zaschnout.

3.2.3 Histologická barvení pro světelnou mikroskopii

Pokud prohlížíme preparát v optickém mikroskopu, jednotlivé složky tkáně se takřka neliší lomivostí světla. Při barvení využíváme toho, že různé součásti buněk a tkání vážou různá barviva, takže je v mikroskopu zřetelně rozlišíme. Základním barvením preparátu je hematoxylin a eosin.

Hotové preparáty jsme barvili čtverým způsobem: hematoxylin-eosinem, zeleným trichromem, Pearlsovým barvením trojmocného železa a Weigertovým železitým hematoxylinem – van Giesonovým pikrofuchsinem (Weigert-Van Giesonem).

Preparáty jsme pozorovali pomocí světelného mikroskopu (HUND WETZLAR V300). Fotodokumentace a digitalizace mikroskopických nálezů byla provedena pomocí mikroskopu Olympus AX-70 (Olympus Ltd., Japan), digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA) a za pomoci softwaru LUCIA verze 4.71 (Laboratory Imaging Prague, ČR).

Hematoxylin a eosin

Roztoky:

Roztok hematoxylinu Hill

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

Roztok jsme připravili rozpuštěním hematoxylinu, jodičnanu a síranu v destilované vodě a promíchali. Poté jsme přidali ethylenglykol a znovu zamíchali. Nakonec jsme přidali kyselinu octovou. Před použitím jsme roztok nechali uzrát a přefiltrovali. Roztok hematoxylinu se uchovává v láhvi, do které se plní až po zátku.

Roztok eosinu je 1% roztok eosinu v destilované vodě

<u>Barvení:</u>	hematoxylin6-8 min
	pramenitá voda10 min (modření)
	otření sklíček
	eosin2 min
	destilovaná voda – opláchnutí
<u>Odvodnění:</u>	2x 96 % ethanol – opláchnutí
	ethanol – xylen (2:1).....3 min
	ethanol – xylen (1:2).....3 min
<u>Projasnění:</u>	3x xylen3 min
	otření sklíček

Zamontování do kanadského balzámu

Výsledek barvení: Jádra buněk a chrupavka modře, kolagenní vazivo a cytoplazma růžově, svalstvo a erytrocyty červeně.

Zelený trichrom (Massonovy trichromy)

Roztoky:

Roztok kyselého alkoholu:

kyselina octová10 ml
96% ethanol990 ml

Roztok kyselého fuchsinu – ponceau:

roztok A1 díl
roztok B2 díly

Roztok A: barvivo jsme rozpustili ve vařící vodě a až po vychladnutí jsme přidali kyselinu octovou.

kyselý fuchsin2 g
destilovaná voda200 ml
kyselina octová2 ml

Roztok B: postup jako u roztoku A

ponceau 2R2 g
destilovaná voda200 ml
kyselina octová2 ml

Roztok oranže G a kyseliny fosfomolybdenové:

destilovaná voda200 ml
kyselina fosfomolybdenová ...10g
oranž G4 g

Roztok metylenové zeleně:

destilovaná voda 100 ml
metylenová zeleň0,2 g
kyselina octová0,5 ml
hematoxylin.....4 min

Barvení:

destilovaná voda – opláchnutí
diferenciace v kyselém alkoholu za kontroly mikroskopem
pramenitá voda5 min
destilovaná voda – opláchnutí
kyselý fuchsin-ponceau...4 min
1% kyselina octová – opláchnutí
diferenciace roztokem oranže G a kyseliny fosfomolybdenové za kontroly v mikroskopu (až kolagenní vazivo zůstane téměř bezbarvé)
1% kyselina octová – opláchnutí
metylenová zeleň2,5 min
1% kyselina octová – 3x opláchnutí

Odvodnění:

96% ethanol.....3 min
ethanol – xylen (2:1)3 min
ethanol – xylen (1:2)3 min

Projasnění:

3x xylen3 min
otření sklíček

Zamontování do kanadského balzámu

Výsledek barvení: kolagenní vlákna zbarvena zeleně

Pearlsova reakce na trojmocné železo

Reakce:

Smísili jsme stejná množství čerstvě připraveného roztoku 4% ferrokyanidu draselného a 4% kyseliny chlorovodíkové, vzniklý roztok jsme zahřivali ve vodní lázni na 60°C, poté jsme barvili přibližně 2 minuty.

destilovaná voda5 min (vypírání)

jádrová červeněněkolik sekund (dobarvení)

Odvodnění:

2x 96 % ethanol – opláchnutí

ethanol – xylen (2:1).....3 min

ethanol – xylen (1:2).....3 min

Projasnění:

3x xylen3 min

otření sklíček

Zamontování do kanadského balzámu

Výsledek barvení: Trojmocné železo je zbarveno tmavě modře, jádra buněk červeně

Weigertův železitý hematoxylin – Van Giesonův pikrofuchsin

Roztoky:

Weigertův železitý hematoxylin: roztok A : roztok B (1:1)

roztok A:

ethanol 96%.....100,0 ml

hematoxylin1,0 ml

roztok B:

destilovaná voda95,0 ml

chlorid železitý.....0,6 g

HCl.....0,75 ml

Pikrofuchsin:

za studena nasycený roztok kyseliny pikrové...100,0 ml

2% roztok kyselého fuchsinu.....6,0 ml

před použitím jsme okyselili 1 kapkou 2% kyseliny octové na 10 ml

Barvení: Weigertův hematoxylin...15 – 20 min
pramenitá voda5 min
destilovaná voda.....opláchnutí
pikrofuchsin.....5 – 10 min
destilovaná voda.....opláchnutí (rychle)
ethanol 70%opláchnutí (rychle)
ethanol 80%.....opláchnutí (rychle)

Odvodnění: 2x 96 % ethanol – opláchnutí
ethanol – xylen (2:1).....3 min
ethanol – xylen (1:2).....3 min

Projasnění: 3x xylen3 min
otření sklíček

Zamontování do kanadského balzámu

Výsledek barvení:

Jádra se barví černohnědě, kolagenní vazivo červeně, svalstvo žlutě. (56)

4. VÝSLEDKY

Byla provedena pilotní studie, která ukázala základní parametry podávání laktoferinu, následně na ni navázala studie vlivu laktoferinu na model akutního infarktu myokardu.

4.1 Pilotní studie

Při intravenózním podání laktoferinu (LA) byly pozorovány markantnější projevy poškození tkání LA (edém a hematurie) pouze při nejvyšší podané dávce 100 mg/kg.

Tab. č. 1: Jednotlivá i.v. podání laktoferinu

pořadové číslo samic	hmotnost samice [mg]	dávka LA [mg/kg]
1.	330	21,2
2.	370	100,0
3.	350	47,19

V průběhu hodiny došlo u samice s nejvyšší dávkou LA k otoku v čelistní oblasti s výrazně rozšířenými póry a vyskytla se u ní hematurie. Samice byla tedy pozorována v pravidelných časových intervalech a po 6 hodinách byl otok zmenšen o 75 %, ale póry byly stále rozšířené.

U zbylých dvou samic se v čelistní oblasti vyskytl velice nepatrný otok, hematurie se nevyskytla vůbec.

4.2 Vliv laktoferinu na model akutního IM

Podání nekrogenních dávek isoprenalinu navozuje u potkanů nejdříve absolutní ischémii, která je následována stavem podobným IM s manifestovanými morfologickými a funkčními změnami.

Získané hodnoty týkající se podání LA a ISO konkrétním potkanům sloužily k indexaci a následnému grafickému znázornění.

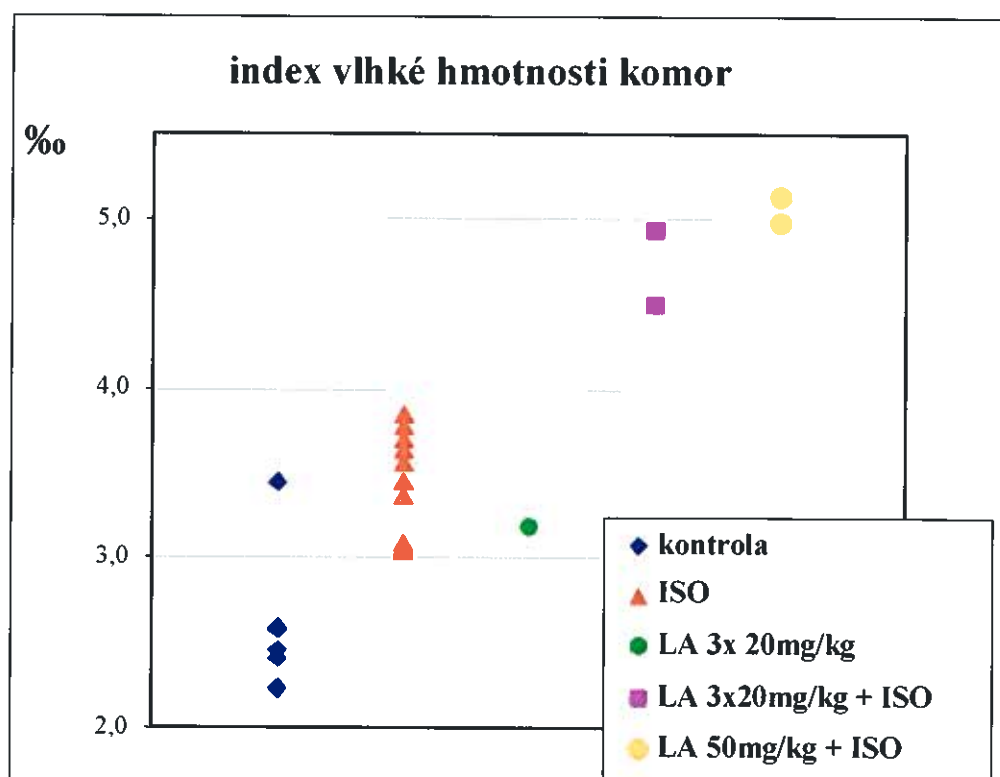
Index vlhké hmotnosti komor (wet ventricle index) (viz Graf č. 1)

Index vlhké hmotnosti komor představuje poměr hmotnosti komor a hmotnosti zvířete [‰]. Index má u zdravého kontrolního zvířete nízké hodnoty kolem 2,5 ‰ – nevyskytuje se zde žádný otok. Hodnoty od 3,0 do 4,0 ‰ vykazuje vzorek s isoprenalinem. Zvýšení indexu je dáno navozením infarktu myokardu.

U kontrolního vzorku LA1 (dle Tab. č. 3: Schéma podávání laktoferinu) s opakovaným podáním LA 3x20 mg/kg se objevilo zvýšení hodnot. LA sám o sobě zvyšuje hodnoty podobně jako podání isoprenalinu – to vyplývá z jeho biologických účinků plynoucích z i.v. podání, které stimuluje imunitní reakci (viz edematózní projevy v pilotní studii).

Markantně vyšší hodnoty 4,0 až 5,0 ‰ byly dosaženy u LA11 a LA12, kombinací opakovaného podání LA 3x20 mg/kg a podání ISO. Kolem 5,0 ‰ se pohybovaly hodnoty u případu s jednorázovým podáním LA 50 mg/kg a ISO (LA13 a LA14).

Graf č. 1: Index vlhké hmotnosti komor



Index srdečního výdeje (cardiac index) [ml/min/kg] (viz Graf č. 2)

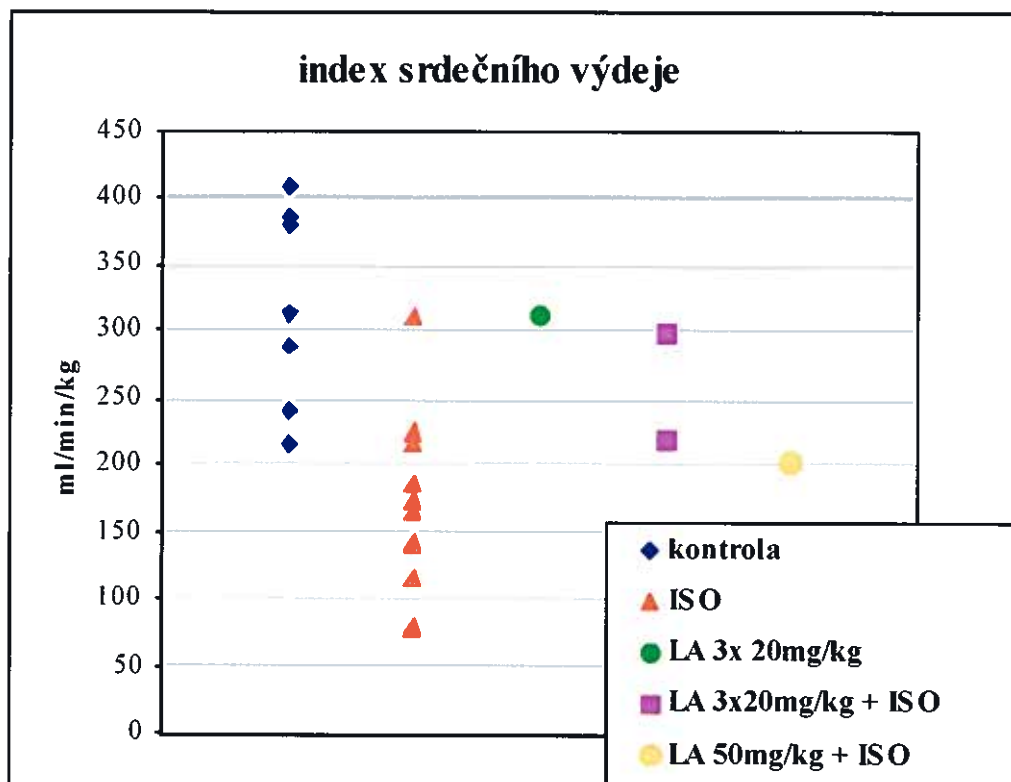
Index srdečního výdeje je poměr srdečního výdeje [ml/min] a hmotnosti zvířete [kg]. Vyšší hodnoty tohoto indexu (až do 400 ml/min/kg) představují zdravá srdce (kontrola). Po aplikaci isoprenalinu v nekrogenních dávkách (kolem 25 mg) dochází k ischemizaci myokardu, což se projeví poklesem srdečního výdeje - krajní hodnoty až pod 100 ml/min/kg.

Hodnota u kontrolního vzorku LA1 s opakovaným podáním LA 3x20 mg/kg se blížila hodnotě 300 ml/min/kg.

Po opakovaném podání kombinace LA 3x20 mg/kg + ISO (LAI1 a LAI2) se hodnoty pohybovaly v rozmezí 200 až 300 ml/min/kg. Jednorázové podání LA 50 mg/kg + ISO (LAI3 a LAI4) vedlo k hodnotám kolem 200 ml/min/kg.

Díky značné variabilitě a individualitě výstupů při podání laktoferinu nelze jednotlivé druhy podání pro nízký počet zvířat hodnotit.

Graf č. 2: Index srdečního výdeje



Histologické zhodnocení

Na histologické ověření změn, které po experimentálním podání laktoferinu a následně isoprenalinu vyvolaly ve struktuře myokardu obraz podobný nálezu při akutní infarktizaci, jsme zvolili příčné i podélné řezy celým vypreparovaným srdcem.

Fotodokumentace a digitalizace mikroskopických nálezů byla provedena pomocí mikroskopu Olympus AX-70 (Olympus Ltd., Japan), digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA) a za pomoci softwaru LUCIA verze 4.71 (Laboratory Imaging Prague, ČR). Sterologická analýza nebyla v těchto preparátech realizovatelná, protože změny nalezené v poškozeném myokardu byly příliš difúzní a nebylo je možno odlišit pomocí plošné či barevné diference.

Pro lepší instruktivnost nálezů uvádíme na počátku obrazové dokumentace histologický řez kontrolního intaktního myokardu (obr.1).

Při středním a větším zvětšení vidíme, že svalové buňky v oblasti čerstvého infarktu jsou dobře ohraničené, zachovávají svůj tvar, ale jejich cytoplazmy se stává abnormálně eozinofilní. Příčné pruhování je v některých kardiomyocytech zachováno, v některých však již nebylo pozorovatelné. Na některých úsecích byla patrná i forma hrubšího granulárního rozpadu takto postižených buněk (obr. 2 a 3). Jádra v takovýchto oblastech se rozpadla karyolýzou nebo karyorexií. Na určitých úsecích hranice nekrotické a zachovalé tkáně byly pozorovatelné i průřezy dystroficky změněnými myocyty s výrazným hydropickým vakuolizováním cytoplazmy (obr.4). Velmi nápadným nálezem byla přítomnost leukocytálního infiltrátu v interstitiu a rovněž výrazná leukostáza v kapilárách myokardu (obr. 5). Zvláště na přehledných podélných řezech je dobře patrný gradient směru a hustoty leukocytárního infiltrátu od střední části myokardu ke jeho hrotu (obr. 6).

Při větším zvětšení bylo možné tento infiltrát lokalizovat jednak v subendokardiálních oblastech (tam měl dokonce ložiskový charakter), jednak v obdobném uspořádání, ale spíše v difusní formě i v subepikardiálních lokalizacích (obr. 7 a 8).

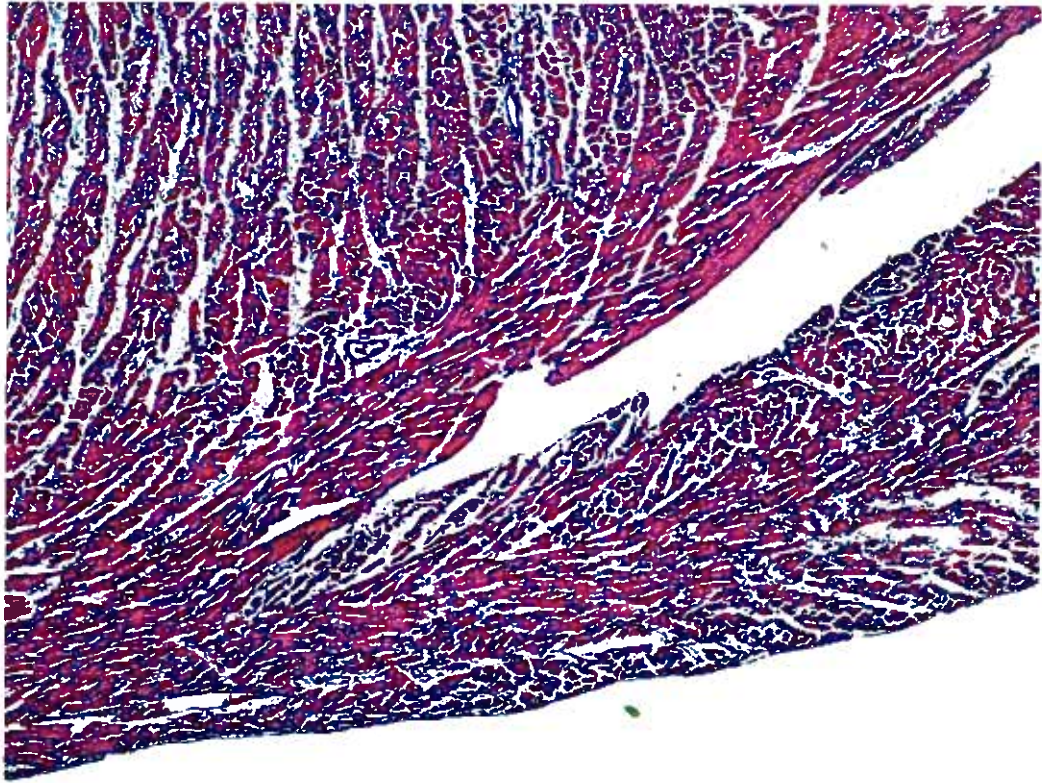
Při velkém zvětšení byly dobře pozorovatelné histologické změny způsobené ischemickou nekrózou srdeční svaloviny.

Leukostáza vytvořená v kapilárním řečišti zásobujícím myokard je tvořena převážně nahromaděnými neutrofilními leukocyty. Postupně tyto buňky prostupují intersticiem, které je edematózně prosáknuté a oddaluje od sebe kardiomyocyty intaktní

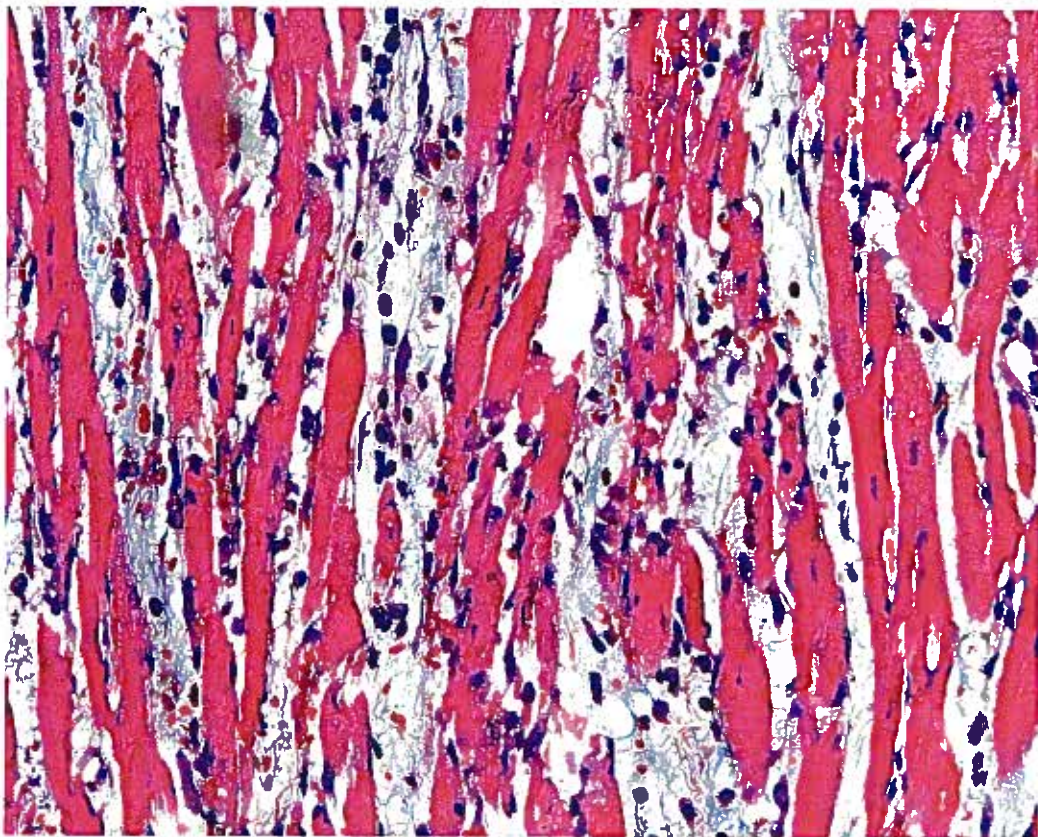
i ty, které již podlely úplné nekróze s rozpadem jader, ztrátou příčného pruhování a zvýšenou eozinofilií cytoplasmy, způsobenou koagulací bílkovinných komponent (obr.9).

Zvláště instruktivní obraz byl pozorován při velkém zvětšení na preparátech barvených pomocí kombinace jádrového barvení železitým hematoxylinem podle Weigerta a van Giesonova a barvení pikrofuchsinem. Tam se nekrotický rozpad myocytů a jejich degranulovaný obsah dobře barevně odlišil od červenofialového zbarvení vláknitých komponent vazivové tkáně intersticia a tmavých vřetenovitých jader fibroblastů. Současně byla pozorována ve stejné lokalitě přítomnost elementů polymorfonukleárního infiltrátu (obr.10).

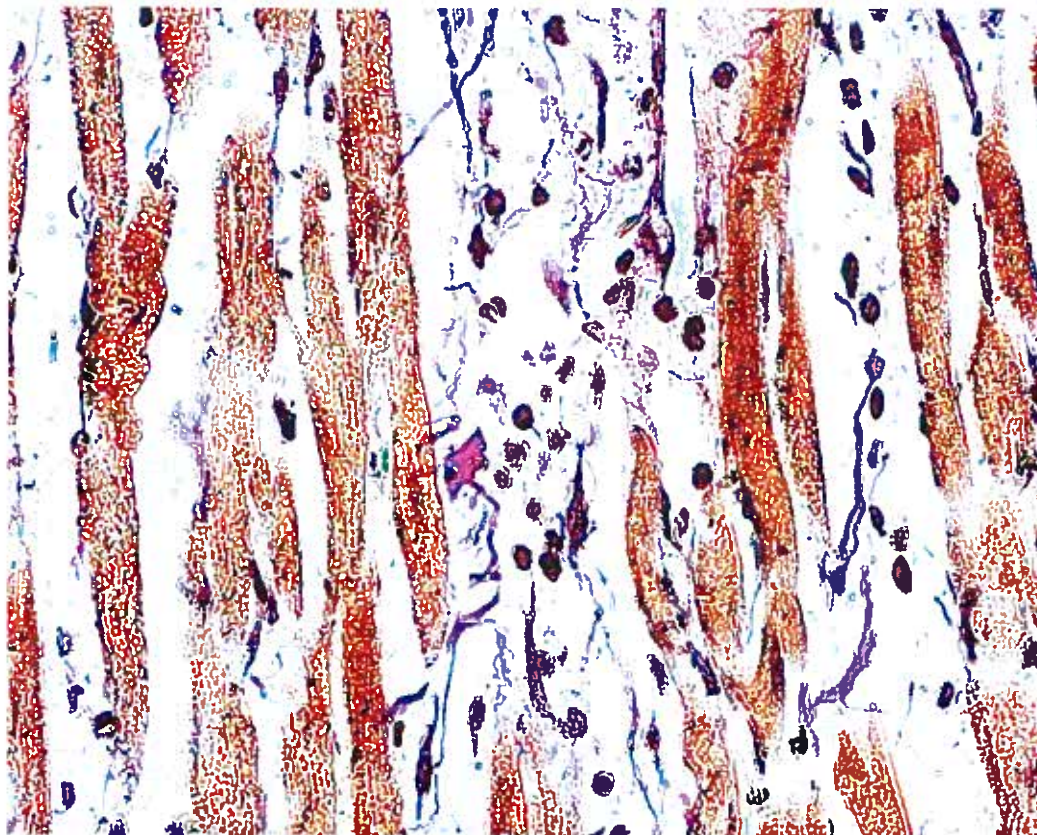
Nutno poznamenat, že tento typ ischemické nekrózy v čase odběru po 24 hod. od expozice isoprenalinu neměl ještě zaznamenané charakteristické znaky pozdních změn akutního infarktu myokardu – tj. ložiska kompletního rozpadu buněk svalů i intersticia s demarkační linií leukocytárního valu, jaká jsou v takovýchto časových intervalech obvykle přítomná.



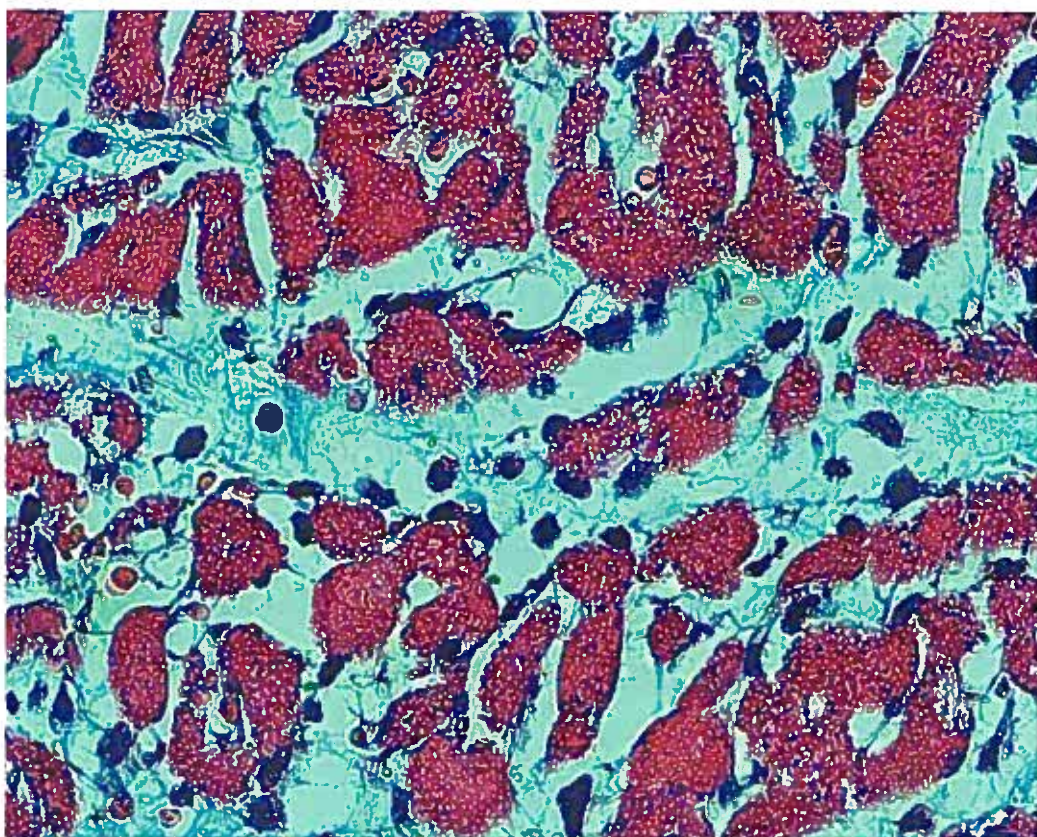
Obr. 1 – KONTROLA – nepoškozený myokard – barvení H-E, zvětš. 40 x



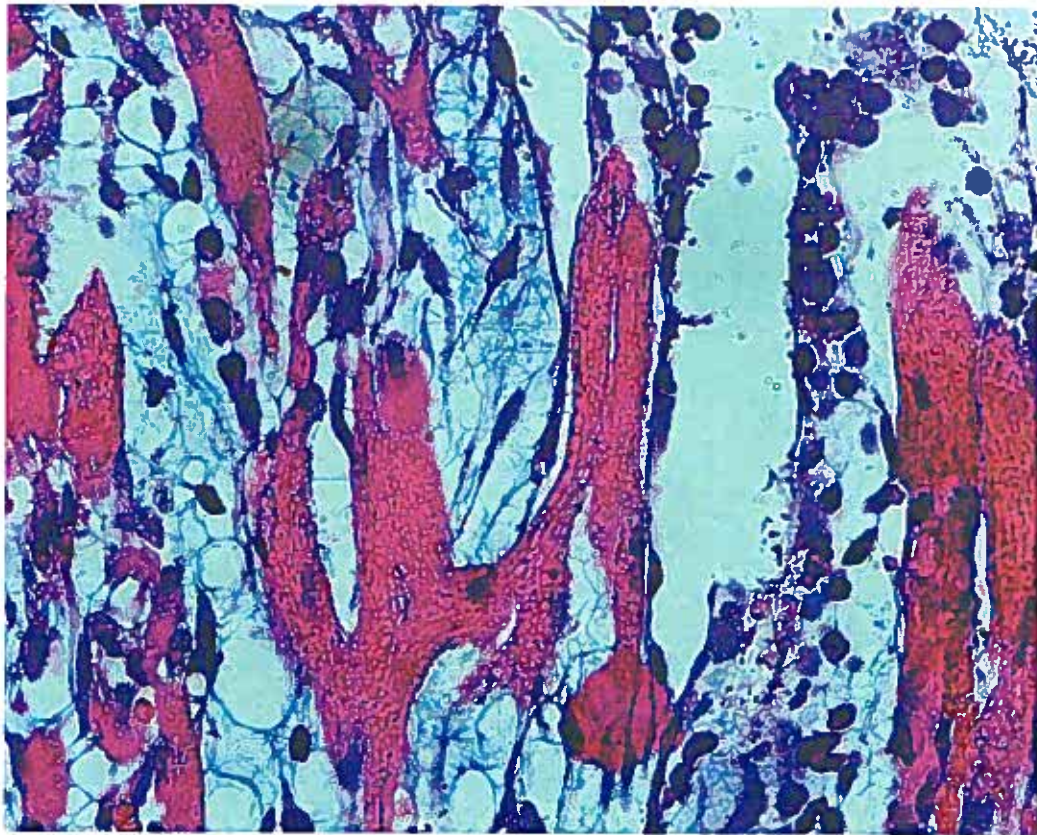
Obr. 2 – LAC+ISO - myokard – barvení H-E, zvětš. 200 x



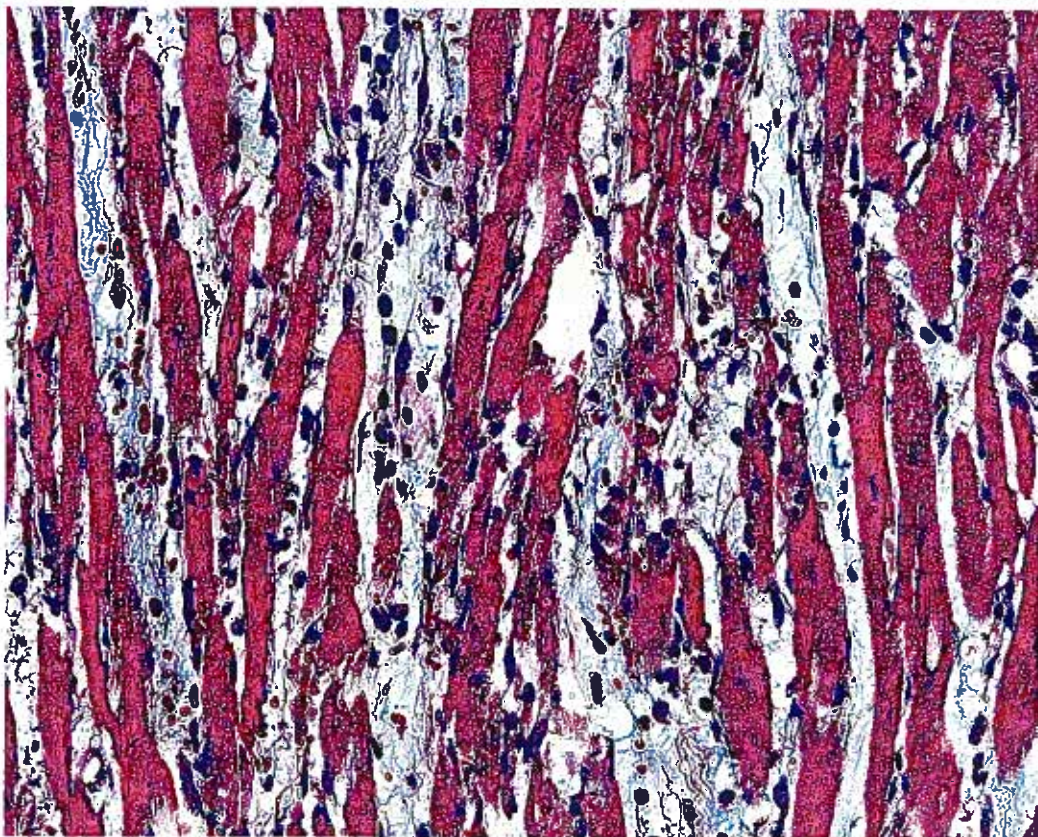
Obr. 3 – LAC+ISO- myokard – barvení W-G, zvětš. 200 x



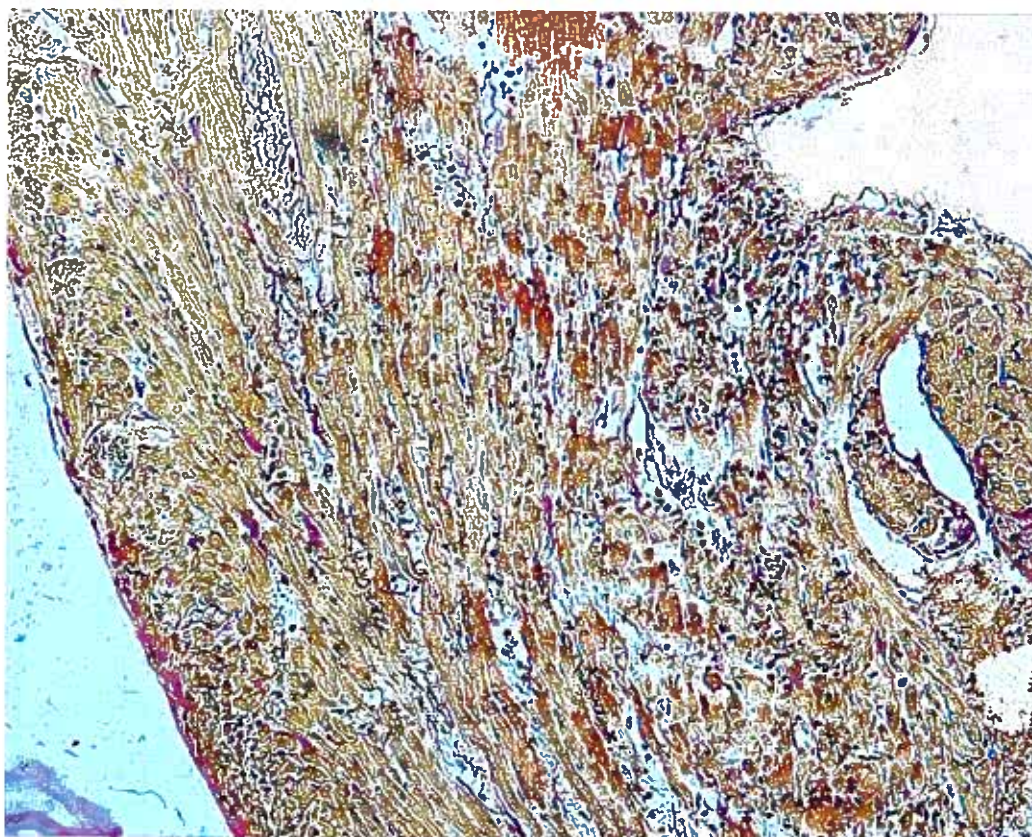
Obr. 4 – LAC+ISO – myokard –barvení H-E, zvětš. 400 x



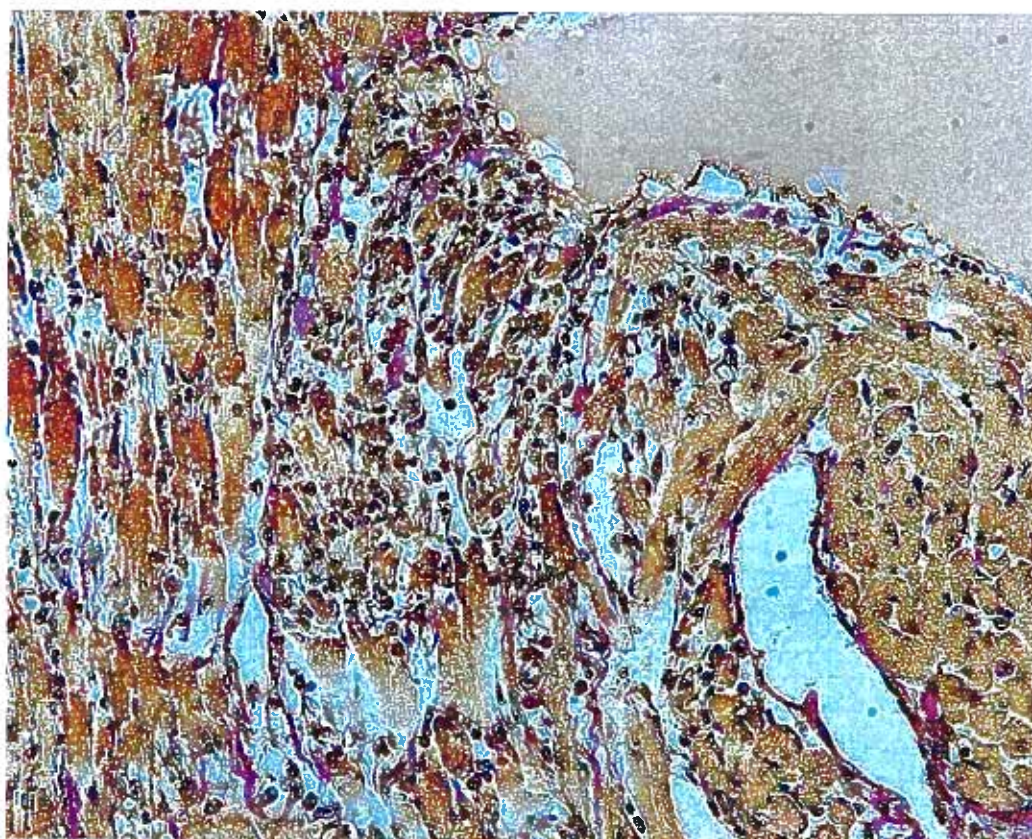
Obr.5 – LAC+ISO-myokard-barvení H-E, zvětš. 400 x



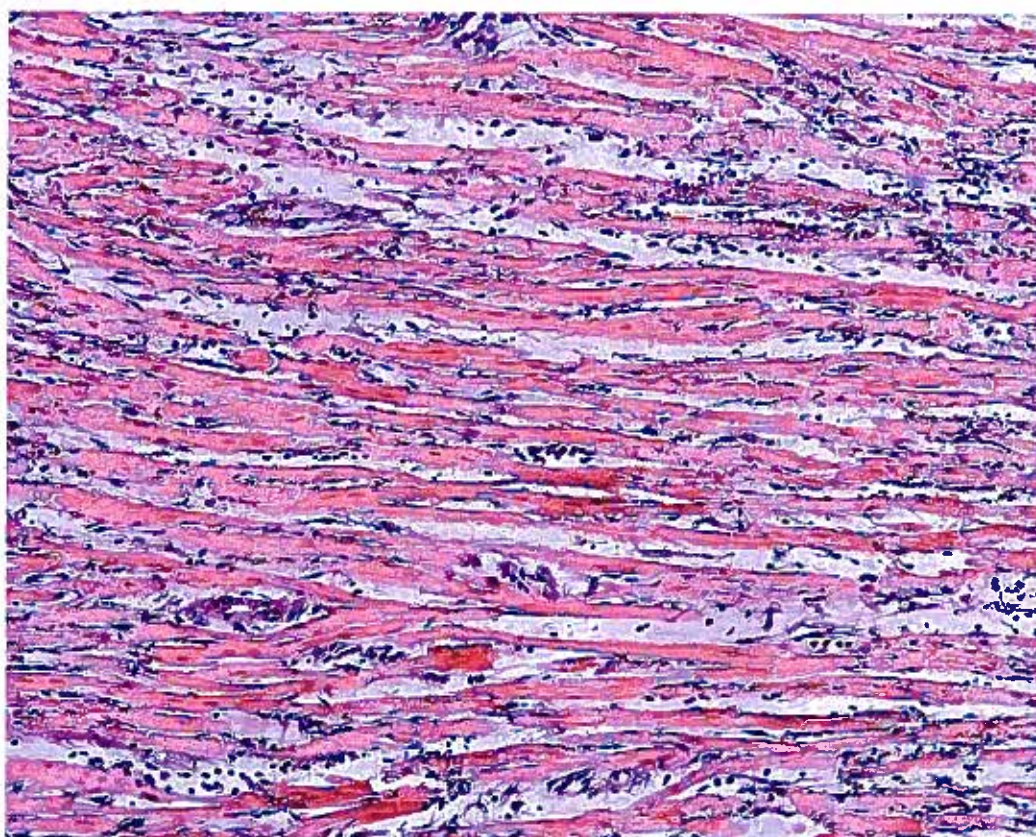
Obr.6 – LAC+ISO – myokard – barvení H-E, zvětš. 200 x



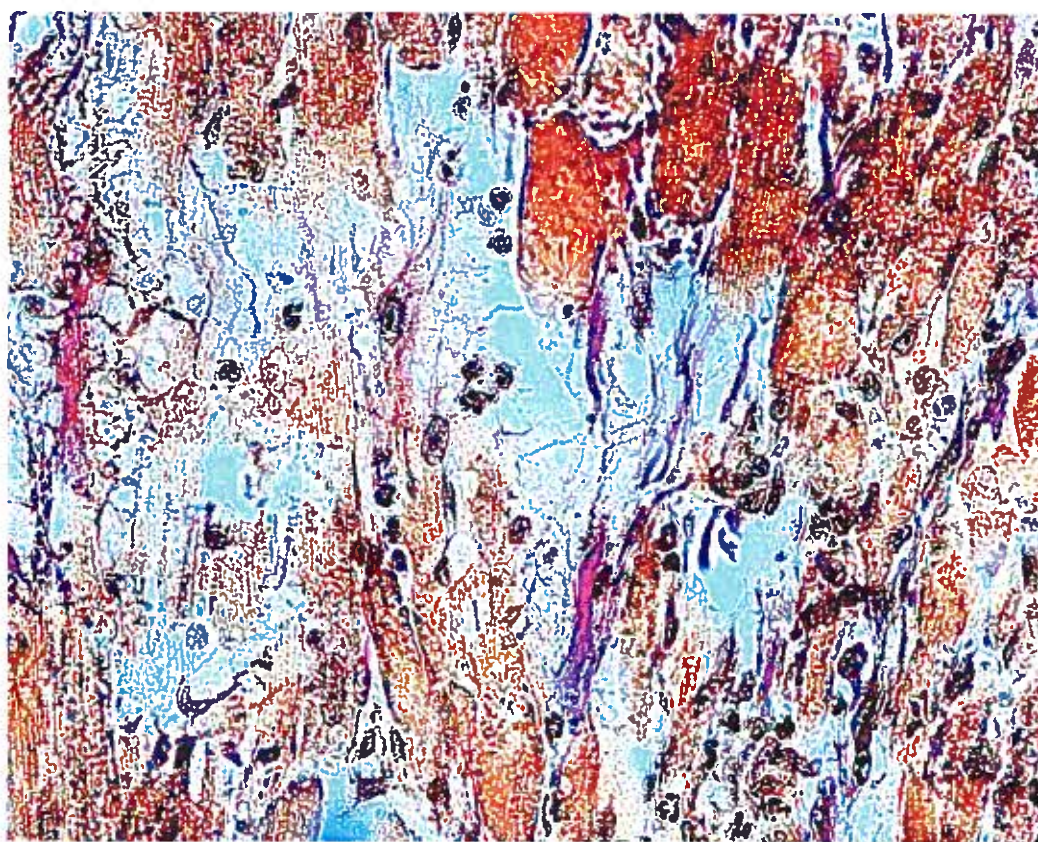
Obr.7 – LAC+ISO- barvení W-G, zvětš. 100 x



Obr.8 – LAC+ISO-myokard-barvení W-G, zvětš. 200 x



Obr.9 – LAC+ISO – myokard – barvení H-E, zvětš. 100 x



Obr.10 – LAC+ISO – myokard- barvení W-G, zvětš. 400 x

Je zřejmé, že podání laktoferinu vyvolává u experimentálních jedinců výrazný zásah do integrity organismu. Tyto změny jsme pozorovali především v pilotní studii, kde se projevíly i v makroskopickém měřítku.

Z následné studie vyplývá, že nedochází k předpokládanému zřetelně protektivnímu účinku laktoferinu při ischemickém poškození myokardu. Očekávaný výsledek sice nebyl prokázán, ale vzhledem k malému počtu experimentálních jedinců, jej nemůžeme zcela jednoznačně vyloučit. Na experimentálním jedinci s opakovaným podáním laktoferinu LA11 3x20 mg/kg, se ukázala možnost pozitivního působení při ischemii navozené následným podáním isoprenalinu. Parametry poškození zde nebyly tak výrazné jako u jiných jedinců.

5. DISKUSE

V teoretické části jsme se zaměřili na fyziologické i patologické aspekty obecné přítomnosti železa v organismu. Jelikož se železo aktivně podílí na oxidativních patologických pochodech díky produkci kyslíkových radikálů, věnovali jsme pozornost také charakteristice oxidačního stresu v tkáních. Tyto pochody pak vytvářejí fenomén tkáňového poškození, který má své místo (kromě mnoha ostatních orgánů) hlavně v myokardiální tkáni, a to v průběhu ischemie a následně při reperfúzní periodě po IM. Vycházeli jsme z četných experimentálních studií (většinou zahraničních), které následně hledaly na základě všeobecně známých i nových poznatků o in vivo a in vitro chování železa spojitost mezi hladinami železa v těle a výskytem kardiovaskulárních komplikací. Většina z nich byla prováděna na zvířecích modelech, několik z nich vycházelo z lidských prospektivních studií. Řada z nich se navzájem doplňovala a podporovala navrhovanou hypotézu, na druhé straně zde však vystupovalo několik prací, v nichž se tato hypotéza nepotvrdila, či spíše byla vyvrácena.

Současná medicína se zabývá hojně problematikou protektivních látek, které by tlumily či eliminovaly následky ischemicko-reperfúzního poškození z hlediska obecného a nespecifického zásahu do oxidačních dějů řadou přírodních i syntetických antioxidantů. Svou pozornost v poslední době upřela i na ovlivnění oxidativních pochodů selektivním zásahem pomocí specifické chelatace iontů přechodných kovů. Laktoferin, jako železo chelatující, tělu vlastní glykoprotein, představuje perspektivní článek v protekci tkání vůči železem-katalyzovaným reakcím do budoucna.

Jako vhodný model studia nejzávažnější formy ICHS infarktu myokardu jsme použili isoprenalinový model. Poprvé byl sledován účinek laktoferinu a histologické změny po jeho podání v souvislosti s ischemicko-reperfúzním poškozením myokardu. Hodnotili jsme patologické změny po podání isoprenalinu pomocí analýzy funkčních parametrů a histopatologického vyšetření. Při ischemicko-reperfúzním poškození myokardu hraje velmi důležitou roli železo. Byla plánována lokalizace depozita železa ve strukturách poškozeného myokardu. Avšak i přes opakované použití specifických metod i jejich modifikací se toto nepodařilo. Sledování změn v transportu a depozici železa by bylo vhodné ke zjištění úlohy laktoferinu při tomto poškození.

Vyhodnocení parametrů a výsledků získaných během experimentu přineslo několik poznatků. Očekávaný protektivní účinek laktoferinu nebyl zcela prokázán. Vzhledem k malému počtu jedinců, však nemůžeme zcela vyloučit jeho pozitivní vliv při ischemii myokardu. U jednoho experimentálního zvířete byly po opakovaném podání laktoferinu zaznamenány menší známky poškození myokardu, než u jiných jedinců.

Laktoferin byl podáván pouze i.v. způsobem aplikace a v několika dávkách. Bylo by vhodné další studium vlivu laktoferinu při různých způsobech aplikace, zvláště výhodné se jeví p.o. podání.

V naší studii jsme podávali laktoferin maximálně tři dny nebo jednorázově. Pro odhalení protektivních účinků v souvislosti s předpokládaným vlivem na imunitní systém, by bylo vhodné sledování účinků při dlouhodobém podávání laktoferinu v různých dávkovacích schématech.

Přestože naše výsledky neukazují na jednoznačné protektivní působení laktoferinu při ischemicko-reperfuzním poškození myokardu, další studium této látky by mohlo vést k nalezení optimálního způsobu podávání, dávkového schématu, délky premedikace a osvětlení role laktoferinu při ischemickém poškození myokardu.

6. ZÁVĚR

Byla provedena pilotní studie, která ukázala základní parametry podávání laktoferinu, následně na ni navázala studie vlivu laktoferinu na model akutního infarktu myokardu. Pro studium infarktu myokardu jsme vybrali isoprenalinový model. V celkové anestezii jsme provedli měření srdečního výdeje a odvozených parametrů s využitím Stewartovy-Hamiltonovy termodiluční metody. Použili jsme k pokusům samce i samice laboratorního potkana.

Histopatologické vyšetření zahrnovalo odběr vybraných tkání (myokard, plíce, ledvina, játra, slinná žláza, slezina), zpracování konvenční histologickou technikou pro světelnou mikroskopii (Bouinova fixační tekutina a zalití do parafinových bločků) a vlastní barvení pro vyhodnocení nálezů světelnou mikroskopii (hematoxylin-eosin, zelený trichrom, Perlsova reakce a Weigert-Van Gieson). Obarvené preparáty jsme pozorovali pod světelným mikroskopem, přičemž jsme se kromě sledování ostatních orgánů zaměřili hlavně na myokard. Následně jsme pak provedli jejich fotodokumentaci.

Tato práce o transportu železa u potkana byla spolu s dvěma dalšími pracemi zpracována v rámci studia vlivu chelátora železa laktoferinu na model akutního IM a histologii vybraných orgánových systémů (prostředky na tento výzkum jsou čerpány z grantu GA UK 98/2005/C/FaF). Práce byla použita k zavedení metody stanovení železa v kardiomyocytu, ale také zjištění účinku laktoferinu na zdravé zvíře a zvíře s vyvolaným infarktem myokardu. Na základě získaných výsledků bude v příštích letech vypracována metoda kvantifikace a vyhodnocení možného protektivního účinku laktoferinu na poškození myokardu.

Je snaha nalézt vhodné látky, které snižují negativní následky infarktu myokardu a případně by také mohly působit protektivně i u jiných chorobných stavů zapříčiněných ROS. Hlavním cílem do budoucna je stanovit účinky laktoferinu na různých úrovních organismu jak u zdravého organismu, tak u organismu, u něhož byl vyvolán infarkt myokardu. Je zde snaha nalézt vhodné látky, které snižují negativní následky infarktu myokardu a případně by také mohly působit protektivně i u jiných chorobných stavů zapříčiněných ROS. Studium laktoferinu, látky tělu vlastní, by mělo být přínosem v terapii těchto onemocnění. Bude tedy snahou prozkoumat, zda by laktoferin nemohl být využíván jako léčivo.

7. POUŽITÉ ZKRATKY

AIM	akutní infarkt myokardu
AOX	antioxidanty
AT	ateroskleróza
CAD	chronická arteriální nemoc (chronic arterial disease)
DFO	deferoxamin
DMT1	divalentní kovový transportér (divalent metal transporter)
DTC1	divalentní kationtový transportér (divalent cation transporter)
EDNO	endotelově odvozený NO
FADH ₂	flavinadenindinukleotid
Ft	feritin
HH	hereditární hemochromatóza
HIF	hypoxií-indukovatelné faktory (transkripce)
CHD	chronická srdeční choroba (chronic heart disease)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IM	infarkt myokardu
IRE	element reagující na železo (iron responsive element)
Ireg1	transportér regulovaný železem (iron regulated transporter)
IRP	protein regulující železo (iron regulatory protein)
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
Lf	laktoferin
LIP	nestabilní zásoba železa (labile iron pool)
LMrFe	redox aktivní nízkomolekulární železo
mitDNA	mitochondriální DNA
MK	mastná kyselina
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NOS	NO syntáza
Nramp	H ⁺ /divalentní kov symportér (natural resistance-associated macrophage protein)
NTBI	transportní proces netransferinově vázaného železa
OFR	volné kyslíkové radikály (oxygen free radicals)
ox-LDL	oxidovaný LDL
PMN	polymorfonukleární leukocyty (neutrofilly)

RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
RP	reperfúzní poškození
SOD	superoxiddismutáza
Tf	transferin
TfR	transferinový receptor
TNF	tumor necrosis faktor
VR	volné radikály
XO	xanthinoxidáza

8. LITERATURA

1. PÁCAL, L., KAŇKOVÁ, K.: *Novější poznatky o metabolismu člověka a jeho poruchách*. Časopis lékařů českých, Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 2004, 1/2004, 9-14.
2. CONNER, J. R., BEARD, J. L.: *Dietary iron supplements – Use or not to use?* Nutrition Today, 1997.
http://www.findarticles.com/p/articles/mi_m0841/is_n3_v32/ai_19588769/pg_3.
3. MUMBY, S., KOH, T. W., PEPPER, J. R., GUTTERIDGE, J. M. C.: *Risk of iron overload is decreased in beating heart coronary artery surgery compared to conventional bypass*. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1537: 204-210.
4. TSUSHIMA, R. G., WICKENDEN, A. D., et al.: *Modulation of iron uptake in heart by L-type Ca²⁺ channel modifiers: Possible implications in iron overload*. Circ. Res., 1999, 84: 1302-1309.
5. NAPIER, I., PONKA, P., RICHARDSON, D. R.: *Iron trafficking in the mitochondrion : novel pathways revealed by disease*. Blood, 2005, 105, 5: 1867-1874.
6. OUBIDAR, M., MARIE, C., et al.: *Effects of increasing intracellular reactive iron level on cardiac function and oxidative injury in the isolated rat heart*. Journal of Molecular and Cellular Cardiol, 1996, 28: 1769-1776.
7. CAIRO, G., PIETRANGELO, A.: *Iron regulatory proteins in pathobiology*. Biochem. J., 2000, 241-250.
8. VALK, B. DE, MARX, J. J. M.: *Iron, atherosclerosis, and ischemic heart disease*. Arch Intern Med, 1999, 159:1542-1548.
9. RACEK, J.: *Železo, volné radikály a ateroskleróza*. Vnitřní lékařství, Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 2004, 50, 3: 181-183.
10. PIETRANGELO, A.: *Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 282: G403-G414.
11. SANTOS, M., et al.: *Regulation of intracellular iron levels in iron-acceptor and iron-donor cells*. Transfusion Science, 2000, 23: 225-235.
12. HENTZE, M. W., MUCKENTHALER, M. U., ANDREWS, N. C.: *Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism*. Cell, 2004, 117: 285-297.
13. PENKA, M., et al.: *Hematologie I*. Praha: Grada Publishing, 2001, s. 15-16. ISBN80-247-0023-9.

14. ŠTÍPEK, S., et al.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. Praha: Grada Publishing, 2000, s. 21-23, 27, 54-55, 65-70, 76, 117, 286. ISBN80-7169-704-4.
15. MIMIĆ-OKA, J., SIMIĆ, D. V., SIMIĆ, T. P.: *Free radicals in cardiovascular diseases*. *Medicine and Biology*, 1999, 6, 1:11-22.
16. ROY, C. N., ENNS, C. A.: *Iron homeostasis: new tales from the crypt*. *Blood*, 2000, 96, 13: 4020-4027.
17. CRICHTON, R. R., WILMET, S., LEGSSYER, R., WARD, R. J.: *Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, 9-18.
18. ABOUND, S., HAILE, D. J.: *A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism*. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275: 19906-19912.
19. ANDREWS, N. C.: *Disorders of iron metabolism*. *The New England Journal of Medicine*, Medical Progress, 1999, 1986-1995.
20. KAPLAN, J.: *Mechanisms of cellular iron acquisition: Another iron in the fire*. *Cell*, 2002, 111: 803-806.
21. MASOPUST, J.: *Klinická biochemie*. Praha: Karolinum, 1998, s. 627-632.
22. PONKA, P., et al.: *Function and regulation of transferrin and ferritin*. *Semin Hematol.*, 1998, 35(1):35-54 (Abstract).
23. KRUSZEWSKI, M.: *The role of labile iron pool in cardiovascular diseases*. *Acta Biochimica Polonica*, 2004, 51, 2: 471-480.
24. HARRISON, P. M., AROSIO, P.: *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1275(3): 161-203 (Abstract).
25. SCHWARZ, K.A., et al.: *Earliest cardiac toxicity induced by iron overload selectively inhibits electrical conduction*. *J Appl Physiol*, 2002 Aug, 93:746-751.
26. EISENSTEIN, R. S., BLEMINGS, K. P.: *Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis*. *The Journal of Nutrition*, 1998, 128: 2295-2298.
27. TAKETANI, S.: *Acquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation*. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2005, 297-318.
28. WEINBERG, E. D.: *Iron loading and disease surveillance*. *Emerging Infectious Diseases*, 1999, 5: 346-352.

29. BUREŠ, J., HORÁČEK, J.: *Základy vnitřního lékařství*. Praha: Galén, 2003, s. 363-365. ISBN80-7262-208-0.
30. SEMPOS, C., T.: *Do body iron stores increase the risk of developing coronary heart disease?* Am J Clin Nutr, 2002, 76: 501-503.
31. GAENZER, H., MARSCHANG, P., et al.: *Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis*. J Am College of Cardiology, 2002, 40, 20: 2189-2194.
32. LIM, C. S., VAZIRI N. D.: *The effects of iron dextran on the oxidative stress in cardiovascular tissues of rats with chronic renal failure*. Kidney International, 2004, 65: 1802-1809.
33. MATTERA, R., STONE, G. P., BAHHUR, N., KURYSHEV, Y. A.: *Increased release of arachidonic acid and eicosanoids in iron-overload cardiomyocytes*. Circulation AHA, 2001, 103: 2395.
34. TUOMAINEN, T.-P., et al.: *Association between body iron stores and the risk of acute myocardial infarction in men*. Circulation, 1998, 97: 1461-1466.
35. BOZZINI, C., GIRELI, D., et al.: *Biochemical and genetic markers of iron status and the risk of the coronary artery disease: An angiography-based study*. Clinical Chemistry, 2002, 48, 4: 622-628.
36. DUFFY, S. J., BIEGELSEN, E. S., et al.: *Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease*. Circulation, 2001, 103: 2799-2804.
37. DANESH, J., APPLEBY, P.: *Coronary heart disease and iron status: Meta-analyses of prospective studies*. Circulation, 1999, 99: 852-854.
38. FERRARI, R., GUARDIGLI, G., et al.: *Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure*. Current Pharmaceutical Design, 2004 May, (10)14: 1699-1711.
39. AMBROSIO, G., TRITTO, I.: *Myocardial reperfusion injury*. European Heart Journal Supplements, 2002, 4 B: 28-30.
40. GIORDANO, F. J.: *Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure*. Journal of Clinical Investigation, 2005, 115: 500-508.
41. MOTT, J. L., ZHANG, D., et al.: *Oxidative stress is not an obligate mediator of disease provoked by mitochondrial DNA mutation*. Mutation Research, 2001, 474: 35-45.
42. HANSEN, P. R.: *Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion*. AHA Circulation, 1995, 91: 1872-1885.

43. KROMBACH, G. A., et al.: *MR imaging of spatial extent of microvascular injury in reperfused ischemically injured rat myocardium: Value of blood pool ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide 1*. Radiology, 2002, 225: 479-486.
44. KLAWITTER, P. F., MURRAY, et al.: *Reactive oxygen species generated during myocardial ischemia enable energetic recovery during reperfusion*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283: H1656-H1661.
45. DENDORFER, A., et al.: *Deferoxamine induces prolonged cardiac preconditioning via accumulation of oxygen radicals*. Free Radical Biology and Medicine, 2005 Jan, 38(1): 117.
46. JENSEN, P. D., JENSEN, F. T., et al.: *Evaluation of myocardial iron by magnetic resonance imaging during iron chelation therapy with deferoxamine: indication of close relation between myocardial iron content and chelatable iron pool*. Blood, 2003 Jun, 101, 11: 4632-4639.
47. ABDALLAH, F.B., EL HAGE CHAHINE, J.M.: *Transferrins: iron release from lactoferrin*. J Mol Biol., 2000 Oct, 303(2): 255-266.
48. BAKER, H. M., BAKER, E.N.: *Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release*. Bio Metals, 2004, 17: 209-216.
49. SANCHES, L., LUJAN, L., et al.: *Synthesis of lactoferrin and transport of transferrin in the lactating mammary gland of sheep*. J Dairy Sci, 1992, 75: 1257-1262.
50. NAGASAKO, Y., SAITO, H., et al.: *Iron binding properties of bovin lactoferrin in iron rich solution*. J Dairy, 1993, 76: 1876-1881.
51. STEIJNS, J.M., VAN HOOIJDONK, A.C.M.: *Occurrence structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin*. Br J Nutr., 2000 Nov, 84 Suppl 1: S11-7.
52. KUŘATA, H., YIP, T., et al.: *The survival of ingested lactoferrin in the gastrointestinal tract of adult mice*. Biochem. J., 1998, 334: 321-323.
53. KRUZEL, M.L., ZIMECKI, M.: *Lactoferrin and immunologic disonance: clinical implication*. Immun Therap Exper., 2002, 50: 399-410.
54. FARNAUD, S., ŠVAND, R.W.: *Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties*. Mol Immunol., 2003 Nov, 40(7): 395-405.
55. BLASIG, I.E., ZIPPER, J., et al.: *Absolute and relative myocardial ischemia by isopreterenol overdose*. Biomed Biochem Acta, 1985, 44: 1641-9.
56. VACEK, Z.: *Histologie a histologická technika*. Praha: Avicenum, 1998, s. 286-359.