

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Ovlivnění časně fáze ischemického poškození myokardu potkana vybranými flavonoidy

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

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpal, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

podpis

Poděkování

Za vedení, odborné rady a pomoc při psaní této diplomové práce bych rád poděkoval panu Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. Rovněž bych rád poděkoval kolegům z Katedry farmakologie a toxikologie, a to především pánům Doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi a PharmDr. Tomáši Filipskému, kteří poskytli informace a data k experimentální části diplomové práce. Také bych rád poděkoval paní laborantce Pavlíně Lukešové za pomoc a rady týkající se nejen zpracování histologických preparátů.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Bc. Petr Hruška

Školitel: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Název diplomové práce: Ovlivnění časné fáze ischemického poškození myokardu potkana vybranými flavonoidy

Flavonoidy jsou látky, které jsou nedílnou součástí rostlin, a jimž je zároveň přisuzováno mnoho zdraví prospěšných biologických aktivit. V této práci jsme zkoumali případné kardioprotektivní účinky jejich dvou zástupců, quercetinu a rutinu.

Cílem tohoto pokusu bylo zaznamenat účinek quercetinu a rutinu na ovlivnění možných patologických změn stavebních součástí myokardu. Látky byly podávány potkanům po dobu 7 dnů p.o. intragastrickou sondou.

Modelové poškození srdce laboratorního potkana (dospělý samec Wistar) bylo navozeno v případě obou studovaných látek jednorázovým podáním isoprenalinu (ISO) s.c. v dávce 100 mg/kg. ISO vyvolané změny byly sledovány v průběhu 24 hodin. Kontrolním skupinám u obou experimentů nebyl aplikován ISO. Kontrolní skupině v pokusu s rutinem byl podán hydrogenuhličitan sodný místo rutinu.

U skupin, jež nebyly premedikovány quercetinem ani rutinem, byl po podání ISO nalezen podobný histologický obraz. Ve srovnání s kontrolní skupinou bylo přítomno středně významné edematózní rozšíření intersticia, mírná místní kapilární hyperémie, nekrotizace kardiomyocytů, a mírná fragmentace myofibril v endokardu, myokardu, i epikardu. Leukocytární infiltrát byl přítomen rovněž ve všech částech myokardu.

Všem potkanům v experimentu s rutinem byl podán buď hydrogenuhličitan sodný, nebo rutin. Každá látka byla denně aplikována ve dvou odlišných dávkách: 2,3 a 4,6 mg/kg hydrogenuhličitanu, 11,5 a 46 mg/kg rutinu. U skupin, jimž byl podáván rutin, nebylo nalezeno v porovnání s kontrolními skupinami významných změn histologického obrazu tkání myokardu. Při obou dávkách byl nález podobný.

Ve výzkumné skupině s quercetinem byla jeho denní dávka 10 mg/kg aplikována polovině jedinců. Druhá polovina místo něj obdržela fyziologický roztok (2 mg/kg). V tomto pokuse jsme spolu s histologickými změnami zaznamenali i vybrané hemodynamické a biochemické parametry (krevní tlak, tepová frekvence, ejekční frakce, EKG, cTnT, vitamín C, vitamín E, MDA). Současně byla stanovována vlhká hmotnost komor. V porovnání s kontrolními skupinami, ISO skupiny premedikované touto látkou vykazaly podobné histologické, biochemické a hemodynamické změny jako ISO skupina bez premedikace.

U kontrolních skupin potkanů, jimž byly podány flavonoidy, byl histologický nález obdobný jako u kontrol, jež obdržely náhradní roztoky.

Z našich výsledků vyplývá, že v tomto pokusném uspořádání došlo po premedikaci rutinem k úbytku morfologických změn ISO vyvolaného srdečního poškození. Preventivní podání quercetinu znaky kardiotoxicity neovlivnilo.

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Bc. Petr Hruška

Supervisor: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Title of thesis: Influencing the early phase of ischemic injury of rat myocardium selected flavonoids

Flavonoids are integral constituent of plants, to which are attributed many health beneficial biological activities. In this work we have studied possible cardioprotective effects of their two representatives, quercetin and rutin.

The aim of this experiment was to record the effect of quercetin and rutin on influence of possible pathological changes of building components of myocardium. The substances were given to the rats for 7 days p.o. through intragastric tube.

The model heart injury of a laboratory rat (adult male Wistar) was induced by one-time administration of isoprenaline (ISO) in both cases of studied substances. The changes caused by ISO have been observed for 24 hours. ISO hasn't been applied to the control groups in either of the experiments. The control group in the experiment with rutin was given sodium bicarbonate instead of rutin.

In the groups that weren't pretreated with either quercetin or rutin, there was found similar histological picture after ISO administration. Compared to the control group, there was markedly significant interstitial edema with dilatation, moderate local capillar hyperemia, necrotization of cardiomyocytes, and moderate fragmentation of myofibrils in endocardium, myocardium, and epicardium. The infiltration of leucocytes was also present in all parts of myocardium.

All the rats in the experiment with rutin have been given either sodium bicarbonate or rutin. Each substance has been applied in two different doses daily: 2,3 and 4,6 mg/kg of bicarbonate, 11,5 and 46 mg/kg of rutin. Compared to the control groups, in the groups pretreated with rutin there weren't found any marked changes of histological picture of myocardial tissue. The finding was similar at both doses.

The daily dose of 10 mg/kg quercetin has been applied to the first half of the specimen in the experimental group. The second half got physiological solvent (2 mg/kg) instead. While the experiment had been conducted, we have been noting histological changes, and also representative haemodynamic and biochemical parameters (blood pressure, heart rate, ejection fraction, ECG, cTnT, vitamin C, vitamin E, MDA). The wet weight of ventricles had been determined at the same time. Compared to the control groups, the ISO group pretreated with this substance showed similar histological, biochemical, and haemodynamical changes as the ISO group without pretreatment.

There was similar histological picture in the control groups of rats pretreated with flavonoids and in the control groups, to which were given substitute solutions.

According to our results, there were less morphological changes of ISO-induced heart injury after rutin premedication in this experimental setting. The pretreatment with quercetin didn't influence any signs of cardiotoxicity.

Zadání a cíl diplomové práce

Na Katedře farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové se ve spolupráci s Katedrou biologických a lékařských věd dlouhodobě sleduje možnost protektivního působení vybraných farmak přírodních i připravených semisyntetickou cestou na modelové toxické poškození částí myokardu laboratorního potkana isoprenalinem.

Cílem této diplomové práce je popsat patologické změny stavebních částí myokardu, jež byly navozeny jednorázovou aplikací isoprenalinu (100 mg/kg s.c.) dospělým samcům laboratorního potkana Wistar. Vybraní potkani byli premedikováni flavonoidy – quercetinem (10 mg/kg p.o.) či rutinem (11,5 mg/kg nebo 46 mg/kg p.o.). Případné změny byly sledovány v průběhu 24 hodin. Histologické nálezy budou konfrontovány s hemodynamickými a biochemickými nálezy v experimentální skupině s aplikací quercetinu.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AKS	akutní koronární syndrom
ALT	alanin transamináza
AMI	akutní infarkt myokardu
AST	aspartát transamináza
ATP	adenosintrifosfát
CAT	kataláza
CK	kreatinkináza
CK-MB	kreatinkináza s podjednotkami M a B
CRP	C-reaktivní protein
cTn	kardiální troponin
cTnI	kardiální troponin I
cTnT	kardiální troponin T
EKG	elektrokardiogram
GDF-15	růstový diferenciační faktor 15
GPx	glutathionperoxidáza
GR	glutathionreduktáza
GSH	glutathion
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
GST	glutathion-S-transferáza
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
H-E	hematoxylin-eosin
H-FABP	srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny
IL-6	interleukin 6

IMA	ischemií modifikovaný albumin
ISO	isoprenalin
LDH	laktátdehydrogenáza
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
MDA	malondialdehyd
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NO [•]	oxid dusnatý
NO-syntáza	syntáza oxidu dusnatého
O ₂ ^{•-}	superoxidový anion
OH [•]	hydroxylový radikál
ONOO ⁻	peroxynitrit
ONOOH	kyselina peroxynitridová
SD	směrodatná odchylka
SOD	superoxiddismutáza
TBARS	reaktivní látka kyseliny thiobarbiturové
TGF- β	transformující růstový faktor β
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
TnI	troponin I
TnT	troponin T
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě

OBSAH

Seznam použitých zkratk	9
Obsah	12
Úvod	15
Teoretická část	16
1 Ischemie myokardu	16
1.1 Ischemie	16
1.2 Nekróza	17
1.3 Histologické změny	17
1.4 Ischemicko-reperfuzní poškození	18
1.5 Oxidační stres	19
2 Laboratorní markery	20
2.1 Biomarkery nekrózy myokardu	20
2.1.1 Troponiny	20
2.1.2 Myoglobin	21
2.1.3 H-FABP	21
2.1.4 Ischemií modifikovaný albumin	21
2.2 Biomarkery zánětu	22
2.2.1 C-reaktivní protein	22
2.2.2 Prozánětlivé markery	23
2.3 Nové biomarkery používané v diagnostice AMI	23
2.3.1 Cholin	23
2.3.2 F2 izoprostany	23
2.3.3 Růstový diferenciační faktor 15	23
2.3.4 Adiponektin	24
2.4 Ostatní biomarkery	24
2.4.1 Glutathion	24
3 Isoprenalinový model kardiotoxicity	25

3.1	Isoprenalin	25
3.1.1	Struktura a názvy	25
3.1.2	Farmakokinetika.....	25
3.1.3	Mechanismus účinku.....	26
3.1.4	Účinky na myokard.....	26
3.2	Histologické změny.....	27
3.3	Biochemické a funkční změny	28
4	Flavonoidy.....	29
4.1	Quercetin	30
4.1.1	Struktura a chemické vlastnosti.....	30
4.1.2	Výskyt v potravě.....	30
4.1.3	Vlastnosti z hlediska medicíny	30
4.2	Rutin.....	33
4.2.1	Struktura.....	33
4.2.2	Výskyt v potravě.....	34
4.2.3	Vlastnosti z hlediska medicíny	34
	Praktická část.....	37
5	Provedení experimentu	37
5.1	Zpracování materiálu pro histologickou analýzu.....	37
5.1.1	Hematoxylin a eosin (H-E)	39
5.1.2	Zelený trichrom podle Goldnera.....	41
5.2	Quercetin	43
5.2.1	Použité látky a přístroje.....	43
5.2.2	Pokusná zvířata	44
5.2.3	Příprava k experimentu	45
5.2.4	Histologie.....	45
5.2.5	Hemodynamická studie.....	45
5.2.6	Biochemické markery.....	46
5.3	Rutin.....	47
5.3.1	Zpracování experimentu	47
5.3.2	Histologie.....	47

6	Výsledky.....	49
6.1	Quercetin	49
6.1.1	Histologická analýza.....	49
6.1.2	Hemodynamické parametry	54
6.1.3	Biochemické markery a vlhká hmotnost komor	54
6.2	Rutin.....	55
6.2.1	Histologická analýza	55
7	Diskuze.....	68
	Závěr	72
	Seznam obrázků.....	73
	Seznam grafů a tabulek.....	75
	Seznam použité literatury	76

Úvod

V rozvinutých zemích jsou kardiovaskulární onemocnění jednou z nejčastějších příčin úmrtí. Poškození srdce a cév se může projevit v mnoha podobách, jako např. ischemická choroba dolních končetin, cévní mozková příhoda, vysoký krevní tlak, srdeční arytmie, křečové žíly, a v neposlední řadě akutní infarkt myokardu (AMI). AMI je jedním z nejzávažnějších koronárních syndromů, který nastává při náhle vzniklém nedostatku kyslíku v srdečním svaly a následné nekrotizaci tkáně. Tento stav zpravidla nastává při obstrukci koronární tepny, k níž nejčastěji dochází v důsledku aterosklerózy.

Výzkum AMI se v řadě případů provádí na zvířecím experimentálním modelu, jímž bývá laboratorní potkan. Kromě chirurgického zákroku je možné napodobit AMI za pomoci syntetického katecholaminu – isoprenalinu (ISO). I v této práci je využit ISO k vyvolání ischemického poškození myokardu laboratorního potkana, avšak zde je rovněž věnována pozornost údajně kardioprotektivním účinkům látek, jež jsou známy jako flavonoidy.

S flavonoidy přicházíme do styku prakticky denně, poněvadž jsou součástí rostlin, a tedy i naší potravy. Je jim připisována řada pozitivních účinků na lidské zdraví, mimo jiné i ty kardioprotektivní. V mnoha studiích bylo popsáno zmírnění ISO navozené kardiotoxicity právě prostřednictvím flavonoidů, z nichž nejčastěji jsou prozkoumávány quercetin a rutin. Proto jsme se rozhodli sestavit experiment, v němž bychom se i my pokusili ověřit účinky obou látek na histologické změny srdce navozené podáním ISO.

TEORETICKÁ ČÁST

1 ISCHEMIE MYOKARDU

Vyvolávajícím prvkem ischemie myokardu bývá uzavření epikardiální tepny. Vlastní poškození tkáně však nastává v důsledku poruchy mikrocirkulace. [1]

1.1 Ischemie

Ischemie myokardu je charakterizována jako stav vzniklý při nepoměru mezi spotřebou a dodávkou kyslíku v srdci. Po obstrukci tepny klesá obsah kyslíku v zasažené oblasti prakticky k nulovým hodnotám.

Snižuje se činnost mitochondrií a nastupují kompenzační mechanismy v podobě anaerobní glykolýzy. Z tohoto důvodu je zpočátku navýšen transport glukózy, jenž je regulován α_1 -receptory. Vyčerpáván je rovněž intracelulární glykogen po stimulaci proteinkinázovou reakcí.

Prohlubující se ischemie má za následek hromadění laktátu a H^+ iontů, čímž dochází k intracelulární acidóze a útlumu glykolýzy.

Protože jsou energetické rezervy v myokardu poměrně malé, rychle se vyčerpají. V rámci 30 sekund poklesne hladina adenosintrifosfátu (ATP) o 20% a kreatinfosfát o 50%, avšak množství laktátu vzrůstá až na trojnásobek. Po 30 minutách se pak sníží hladina ATP i kreatinfosfátu o 80%, laktát je zvýšen desetinásobně.

Tyto změny jsou nejvíce patrné v subendokardu. Vzniklý pH gradient totiž prochází celou stěnou srdeční, přičemž vyšší acidóza se nachází v oblasti subendokardu.

Zasaženy jsou i membránové pumpy, díky nimž dochází ke ztrátám intracelulárního draslíku a hořčíku. Zvyšuje se naopak buněčný sodík a vápník, tedy roste i osmolalita.

Nastává hypopolarizace buněk, zkracuje se jejich napětí, zároveň je zpomaleno jejich vedení. Ischemické buňky se zkráceným akčním potenciálem se vyskytují spolu s buňkami s normálním nebo prodlouženým napětím. Tyto změny pak vedou k arytmiickým poruchám. Přitom jsou aktivovány i receptory bolesti.

Biochemické i funkční odchylky jsou vratné, jestliže dojde k nápravě ischemie do 20 minut. [1]

1.2 Nekróza

Při dlouhotrvající ischemii nastávají ireverzibilní změny, které, přímo úměrně s časem, nabývají většího rozsahu. Ischemická nekróza je koagulačního charakteru. Podle velikosti zasažené oblasti rozlišujeme infarkt mikroskopický (fokální nekróza), malý (postiženo méně než 10% levé komory), střední (10-30% levé komory), a velký (více než 30% levé komory).

Při rozpadu buněk a organel se jsou z nich uvolňovány lysozomální kyselé hydrolázy a další látky, jejichž prostřednictvím nastává oxidační stres (viz kapitola 1.5). Nekrotické, tedy násilně odumřelé buňky, jsou postupně nahrazovány vazivem. Kromě nich lze nalézt i apoptotické buňky, které byly usmrceny v důsledku naprogramované buněčné smrti – roli zde hraje aktivace kaspáz. Uvolněná apoptotická tělíška jsou fagocytována.

Nekrotizace postupuje od subendokardu vlnovitě k subepikardu. Celý její rozvoj trvá 3 až 6 hodin. Většina infarktů je takto ukončena kolem 6 hodin od obstrukce koronární tepny, stav může probíhat i déle. [1]

1.3 Histologické změny

Od počátku vzniku ischemie lze pozorovat ireverzibilní změny kardiomyocytů za 15 až 20 minut. Tyto změny jsou však patrné jen pod elektronovým mikroskopem, což je pro diagnostiku v klinické praxi nepoužitelné.

Nejranější pozorovatelnou změnou je ztenčení, protažení a zvlnění mrtvých vláken (tzv. vlnky), jež nastává tahem okolní živé svaloviny. K edematózním změnám intersticia dochází po 4 až 8 hodinách.

Nekrotické změny můžeme pozorovat po 8 až 16 hodinách: cytoplazma vykazuje výraznější eozinofilní zbarvení a jádro naopak bledne v důsledku rozpadu jádra (karyolýza). Nebo jádro naopak tmavne a svrašťuje se, načež zmizí (pyknotizace jádra). Mizí rovněž příčné pruhování.

Po 24 hodinách se na okraji ložiska objevují neutrofilní leukocyty, přičemž nejvýraznější infiltrát je pozorovatelný za 2 až 3 dny. Poté se začíná ztrácet. K rozkladu mrtvých buněk dochází třetí až pátý den, načež jsou nahrazovány granulační tkání (vlásečnice s endotelem, fibroblasty, makrofágy, a lymfocyty). Tato náhrada postupuje od okrajů ložiska k jeho centru. Většinou bývá poškozená tkáň vyměněna kolem desátého dne. Následujících šest týdnů je granulační tkáň nahrazována kolagenním či hyalinním vazivem.

Odlíšné změny můžeme pozorovat při méně výrazné ischemii – myomalacii, při níž dochází k zániku kardiomyocytů. Rána se nehojí jizvou a není pozorovatelná ani buněčná reakce.

U dalšího typu nekrózy myokardu nacházíme kontrakční pruhy, u nichž jsou výrazně ztluštělé Z-linie postižených buněk. Tento jev nastává v důsledku hyperkontrakce mrtvých sarkomer. S tímto úkazem se setkáváme např. u katecholaminové kardiotoxicity, feochromocytomu, na okrajích infarktu, po reperfuzi, či po dlouhé resuscitaci. Pruhy můžeme pozorovat i jako artefakt v okrajích histologických řezů. [1]

1.4 Ischemicko-reperfuzní poškození

Stav, kdy dojde k obnovení průtoku v ischemické oblasti, nazýváme reperfuze. Její účinek bývá komplexní a vždy příznivý. Při reperfuzi je zkrácena doba trvání ischemie, a zároveň se omezí i velikost ložiska. Vývoj nekrózy je reperfuzí sice urychlen, zato je však postižená oblast menší.

Dojde tedy k rychlému, prudkému, avšak krátkému vzestupu kardiospecifických enzymů. Díky reperfuzi je urychlen proces hojení, zachována je srdeční funkce, a dochází i k zlepšení prognózy pacienta.

V raných stádiích ischemie pomáhá reperfuze k záchraně postiženého myokardu, ale při dlouhotrvající ischemii může nastat ischemicko-reperfuzní poškození. Typicky při něm dochází k přeplnění buněk vápníkem (calcium overload), endotelové dysfunkci, aktivaci komplementu, a zánětlivých buněk. Nadbytek vápníku však může nastat i u dalších situací, například po úrazu elektrickým proudem, nebo po srdeční operaci. [1]

1.5 Oxidační stres

Poškození tkáně myokardu je rovněž následkem oxidačního stresu. Ten vzniká při porušení rovnováhy mezi tvorbou radikálů RONS (reaktivní formy kyslíku a dusíku) a aktivitou antioxidantních mechanismů, které mají za úkol RONS neutralizovat.

V lidském srdci nejčastěji vznikají tyto volné radikály: superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}), peroxid vodíku (H_2O_2), singletový kyslík, peroxyinitrit ($ONOO^{\cdot-}$), oxid dusnatý (NO^{\cdot}). $O_2^{\cdot-}$ funguje jako prekurzor, ze kterého vzniká řada dalších radikálů.

Za běžných podmínek vznikají radikály jen v malé míře, a to fyziologicky při úniku elektronů z mitochondrie během jejich transportu. Odpověď kardiomyocytu na běžnou produkci $O_2^{\cdot-}$ spočívá v jeho přeměně na H_2O_2 enzymem superoxidodismutázou (SOD) v cytoplasmě či mitochondriích. H_2O_2 bývá zpravidla přeměňován na vodu systémem katalázy (CAT) nebo glutathionperoxidázy (GPx).

Při ischemii a reperfuzi dochází ke zvýšení produkce $O_2^{\cdot-}$, která navíc pochází z více buněčných zdrojů (např. transport mitochondriálního elektronu, NADPH oxidáza, NO syntetáza, xantin oxidáza, cytochrom P450, cyklooxygenáza). Antioxidační obrana, zahrnující enzymy SOD, CAT, GPx, GR (glutathionreduktáza), je navíc během ischemie a reperfuze snížena. Míra reakcí RONS, jež v buňkách probíhají, rozhoduje o tom, zda bude nastalé poškození reverzibilní, nebo fatální.

Během ischemie a časně reperfuze dochází jak ke snížení pH, tak i k hypoxii, což napomáhá uvolňování Fe^{2+} z enzymů metaloproteináz. Volné železnaté kationty pak katalyzují průběh Fentonovy reakce, při níž je H_2O_2 konvertován na OH^{\cdot} .

Nadále je při ischemii a reperfuzi zvýšena produkce OH^{\cdot} , který je považován za nejvíce poškozující radikál. Vyšší je i produkce NO^{\cdot} , jež s $O_2^{\cdot-}$ vytváří $ONOO^{\cdot-}$. Při nízkém pH dochází navíc k připojení protonu na $ONOO^{\cdot-}$, takže vzniká kyselina peroxyinitridová $ONOOH$, jejíž degradace přispívá spolu s Fentonovou reakcí k tvorbě OH^{\cdot} radikálu.

Reperfuze stimuluje enzymy NADPH oxidázu, cytochrom P450, a cyklooxygenázu ke zvýšení a zrychlení produktivity volných radikálů. Opětovné okysličení tkání tak paradoxně vede rozsáhlé tvorbě RONS, jež může spolu se závažným nedostatkem ATP vyvolat nekrózu kardiomyocytu. [3]

2 LABORATORNÍ MARKERY

Stanovení diagnózy při akutní hrudní bolesti bývá problematické. Opožděná diagnóza nejen zvyšuje cenu terapie, ale může vést i ke zhoršení stavu pacienta, případně k jeho úmrtí. Důležitá je tedy včasná a přesná diagnóza.

Myokard může být poškozen mnoha mechanismy, z nichž nejzávažnější je dlouhotrvající ischemické zranění. Důsledkem takového zranění je nekróza buněk, již známe jako akutní infarkt myokardu (AMI).

Diagnóza AMI vyžaduje klinický obraz, v němž lze nalézt příznaky ischemie, charakteristické změny EKG, a v neposlední řadě změny hladin biomarkerů charakteristických pro AMI. [4]

2.1 Biomarkery nekrózy myokardu

2.1.1 Troponiny

Srdeční troponiny (cTn) jsou součástí tropomyozinového komplexu kardiomyocytů. Jejich stanovení dosud patří mezi nejcitlivější a nejspolehlivější biochemické ukazatele akutní nekrózy myokardu.

Jmenovitě kardiální troponin I (cTnI) a T (cTnT) jsou nezbytné pro hodnocení akutních koronárních syndromů (AKS) při odhadu vývoje kardiovaskulárních komplikací. cTnT je navíc patentován pouze jedním výrobcem, což zajišťuje jeho celosvětovou standardizaci.

Hodnoty cTn se udávají v arbitrárních jednotkách, přičemž od roku 2007 je u zdravých osob mladších 60 let stanoven cut-off pro AMI 99. percentil.

Při vzniku akutní ischemické nekrózy je pozorován nárůst cTn v periferní krvi po 2-4 hodinách, avšak diagnosticky využitelný vzestup nastává až po 4-6 hodinách. cTn je z nekrotických buněk uvolňován postupně, a při rozsáhlém poškození myokardu můžeme sledovat zvýšenou plazmatickou koncentraci cTn až 14 dní. Množství uvolněného cTn vypovídá i o rozsahu nekrózy. Pro recidivu svědčí akutní nárůst cTn v plazmě alespoň o 20%. [5]

2.1.2 Myoglobin

Myoglobin patří mezi malé cytoplasmatické hemoproteiny. Zvýšení jeho hladiny nastává do 1 až 3 hodin od počátku nekrózy myokardu a vrcholu dosahuje po 6 až 9 hodinách. K jeho normalizaci dochází do 24 hodin.

V diagnostice AMI patří myoglobin mezi klasické biomarkery. K jeho vzrůstu dochází nejdříve po nástupu AMI (do dvou hodin od počátku hrudní bolesti). Kromě AMI může být zvýšený i při renální insuficienci či při poranění kosterního svalstva. K diagnostice časného AMI by měl být myoglobin diagnostikován spolu s cTn. [4]

2.1.3 H-FABP

H-FABP (srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny) je cytosolický nízkomolekulární protein, jehož funkce spočívá v transportu mastných kyselin a metabolismu. Nejvíce je exprimován v myokardu, ale nalézt ho můžeme i v mozku, ledvinách, a kosterní svalovině. Díky své malé velikosti snadno proniká póry cytoplasmatické membrány u ischemických kardiomyocytů.

Používá se především ke sledování časného AMI spolu s dalšími markery (cTnI), a lze ho rovněž použít ke stanovení prognózy při poranění myokardu. S jeho pomocí můžeme stanovit mortalitu u pacientů s akutním koronárním syndromem. Tento marker se zatím rutinně nepoužívá. [4]

2.1.4 Ischemií modifikovaný albumin

Albumin je protein sloužící k transportu řady látek prostřednictvím krevní plasmy, mimo jiné i stopových prvků (např. kobalt, měď, a nikl). Při ischemii však dochází ke strukturním změnám v N-terminální části této bílkoviny, načež je omezena schopnost albuminu vázat tyto kovy. V takovém případě je albumin označován jako ischemií modifikovaný albumin (IMA).

IMA vzniká pravděpodobně v důsledku změn vyvolaných ischemií (aktivní formy kyslíku, hypoxie, acidóza, reperfuze). Díky těmto změnám se rovněž uvolňuje měď z bílkovin (např. z ceruloplasminu), která následně soutěží o vazbu na albumin

s kobaltem na N-terminálním konci IMA. Samotné stanovení hladiny IMA je založeno na posouzení schopnosti albuminu vázat exogenní Co^{II}.

IMA je pro svou velkou senzitivitu vhodný pro diagnostiku akutních koronárních syndromů, zejména v kombinaci s cTnT a EKG. K vzestupu hladin IMA dochází během několika minut po začátku ischemie, vrcholu dosahuje po 2 až 3 hodinách. Normalizace nastává po 6 hodinách. Výhoda jeho použití spočívá v tom, že hladina IMA se neliší u mužů a žen, a nebyla pozorována ani korelace s věkem.

Prozatím však není IMA běžně používán u pacientů s podezřením na akutní koronární syndrom. Dosud totiž nebyla jednoznačně stanovena maximální hladina, již lze ještě považovat za fyziologickou. Není ani jasný vliv hladiny albuminu na IMA, a proto je zvažována možnost použití podílu IMA a albuminu. Nadále není ani jednoznačně určena senzitivita IMA – může vznikat při jakékoli ischemii, nejen myokardiální. [6]

2.2 Biomarkery zánětu

2.2.1 C-reaktivní protein

C-reaktivní protein (CRP) je protein uvolňovaný hepatocyty v odpověď na stimulaci zánětlivými cytokiny. CRP je schopen aktivovat klasickou dráhu komplementu, díky němuž je schopen se navázat na poškozené buňky – včetně ischemických kardiomyocytů.

CRP patří mezi nespecifické markery zánětu, a proto je jeho využití jako diagnostického markeru AMI velmi omezené. U pacientů s akutním koronárním syndromem je jej možné použít jako prognostický marker – avšak jen v dlouhodobé perspektivě. Jeho schopnost předvídat srdeční příhody v blízké budoucnosti je nespolehlivá.

Pro doplnění a zpřesnění diagnózy je optimální používat CRP v kombinaci s dalšími biomarkery. [4]

2.2.2 Prozánětlivé markery

Imunologická odpověď na ischemicko-reperfuční poškození je spojena s produkcí řadou cytokinů, například IL-6 a TNF- α . IL-6 slouží k aktivaci zánětlivých buněk i jater, která pak vylučují proteiny akutní fáze (např. CRP). Může mít rovněž negativně inotropní efekt prostřednictvím myokardiální NO-syntázy.

TNF- α je cytokin vyskytující se v endoteliálních buňkách, makrofázích, a v myocytech hladkého svalstva. Je schopen snížit srdeční kontraktilitu buď přímo, nebo indukci NO-syntázy. [7]

2.3 Nové biomarkery používané v diagnostice AMI

2.3.1 Cholin

Cholin je enzymatický produkt enzymu fosfolipázy D, který slouží nejen jako marker nestability aterosklerotického plátu, ale rovněž i jako marker závažné ischemie myokardu. Ukázalo se, že izomery cholinu jsou důležité složky buněčné signalizace, jež se vyskytují i při zánětu a destabilizaci koronárního plátu.

V současné době se uvažuje o použití cholinu jako biomarkeru k předvídání negativních důsledků ischemie, k nimž patří například srdeční smrt, zástava srdce, infarkt myokardu, rozvoj srdečního selhání, revaskularizace, a život ohrožující arytmie. [7]

2.3.2 F2 izoprostany

F2 izoprostany jsou biologicky aktivní produkty metabolismu kyseliny arachidonové. Jejich biosyntéza probíhá v mnoha odlišných buňkách při vytváření aterosklerotického plátu, a to včetně monocytů. Zvýšené hladiny volných F2 izoprostanů byly nalezeny u pacientů s akutním koronárním syndromem, a zároveň lze s jejich pomocí předvídat rozvoj srdečního selhání, revaskularizaci, a smrt. [7]

2.3.3 Růstový diferenciační faktor 15

GDF-15, neboli růstový diferenciační faktor 15, patří do nadrodiny cytokinů TGF-b, a je začleněn do regulace zánětlivých a apoptotických cest. Za fyziologických podmínek

GDF-15 produkuje ve významné míře placenta, avšak je vylučován i u mnoha druhů rakovin, a tkáních vystaveným stresu (např. při poranění, ischemii).

Za pomoci GDF-15 je možné předvídat fatální či nefatální AMI – avšak pro tento účel se zdá být přínosnějším cTnT. [7]

2.3.4 Adiponektin

Adiponektin je protein sekretovaný zralými adipocyty a má inzulin senzitivující, protizánětlivé, antiaterogenní, i antiangiogenní účinky. Pravděpodobně zvýrazňuje komplikace spojené s obezitou, a je nepřímo úměrně spjatý s kardiovaskulárními rizikovými faktory, jimiž jsou např. diabetes typu 2, hypertenze, a onemocnění koronárních arterií.

Při poškození endoteliální bariéry je adiponektin schopen se akumulovat v subendokardu a omezit adhezi monocytů na endoteliální buňky. Takto inhibuje proliferaci a migraci hladkého svalstva v cévách. Má tedy přímo antiaterogenní účinky.

Nižší hladina adiponektinu byla pozorována u žen, obézních lidí, u diabetu druhého typu nebo při inzulinové rezistenci. Byla prokázána korelace mezi nízkou hladinou plazmatického adiponektinu a zvýšeným rizikem AMI během šesti let u pacientů bez předchozího kardiovaskulárního onemocnění. Nízká hladina adiponektinu byla rovněž pozorována po prodělání AMI, a u mužů trpících následnými komplikacemi AMI (smrt spojená se srdečními příhodami, rekurentní AMI, nestabilní angina pectoris, srdeční selhání). [7]

2.4 Ostatní biomarkery

2.4.1 Glutathion

Obvykle jsou reaktivní formy kyslíku neutralizovány antioxidanty, přičemž glutathion (GSH) ve své redukované formě patří mezi nejsilnější intracelulární antioxidanty. Poměr mezi GSH a jeho oxidované formy GSSG pak může sloužit jako reprezentativní marker antioxidační kapacity buňky.

Ke snížení hladiny GSH dochází i u klinických stavů, při nichž dochází rovněž k poklesu buněčného redoxního potenciálu. GSH spolu s redoxním potenciálem jsou součástí

signalizačního systému, jenž reguluje syntézu cytokinů a adhezních molekul. U pacientů s AMI nalézáme v krvi nižší hladiny GSH. [8, 9]

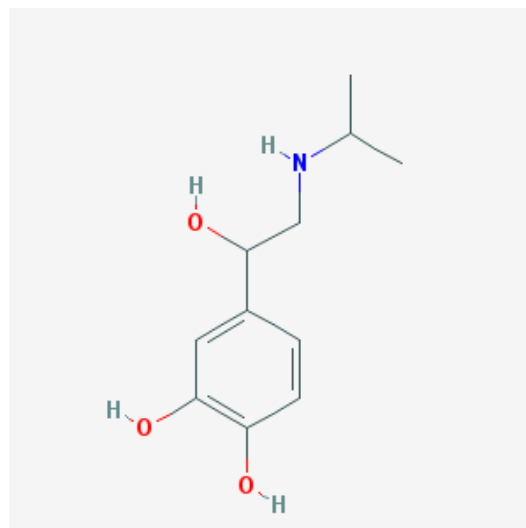
3 ISOPRENALINOVÝ MODEL KARDIOTOXICITY

Akutní infarkt myokardu je v současnosti jedním z intenzivně zkoumaných jevů, k jehož výzkumu se používají zvířecí modely. Samotná ischemie je u nich vyvolávána podáním syntetického katecholaminu, jímž zpravidla bývá ISO.

V minulosti byl ISO podáván astmatikům v kombinaci s dalšími bronchodilatátory, avšak tato kombinace vedla ke zvýšení mortality pacientů. Následující studie pak ukázaly jeho schopnost vyvolat ischemizaci myokardu, a pro tyto účely je nyní laboratorně používán. [10]

3.1 Isoprenalin

Užívání ISO na zvířecích modelech má několik výhod: jedná se o relativně levnou látku, neinvasivní, jeho velkou dávku lze připravit v krátkém čase, a rozsah nekrózy myokardu je ovlivnitelný množstvím podaného ISO. [11]



Obr. 1: Strukturální vzorec ISO [12]

3.1.1 Struktura a názvy

Sumární vzorec ISO je $C_{11}H_{17}NO_3$ a jeho molekulová hmotnost je 211,25758 g/mol. Jeho strukturální název je *4-[1-hydroxy-2-(propan-2-ylamino)ethyl]benzene-1,2-diol*. V zahraniční literatuře se můžeme setkat i s jeho alternativními názvy, jimiž jsou isoproterenol, norisodrin, novodrin, aludrin, asiprenol, a assiprenol. [12]

3.1.2 Farmakokinetika

V lidském organismu je ISO metabolizován v játrech, plicích, a v dalších tkáních enzymem katechol-O-metyltransferázou. Vzniklé metabolity mají malou aktivitu, a jsou vylučovány močí ve formě sulfátových konjugátů. Stejně je exkretován i nezměněný ISO.

Biologický poločas ISO se pohybuje v rámci jedné až několika minut, k úplnému vyloučení z organismu dochází do cca 24 hodin po podání. [13]

3.1.3 Mechanismus účinku

ISO působí na srdeční tkán prostřednictvím β_1 i β_2 adrenergických receptorů sympatiku, přičemž kontraktilita myokardu je ovlivňována zejména β_1 receptory. Stimulací β_1 receptorů je vyvoláno snížení prahu dráždivosti, zrychlení atrioventrikulárního vedení, zvýšení dráždivosti srdečního svalu (pozitivně bathmotropní účinky) a zrychlení srdeční činnosti (pozitivně chronotropní účinky).

Stimulované β_2 receptory zapříčiňují systémovou i plicní vazodilataci, jež má za následek pokles odporu, proti němuž je krev vyháněna ze srdce. Vyšší dávky ISO snižují žilní návrat i systolický krevní tlak. [13]

3.1.4 Účinky na myokard

Katecholaminy obecně zvyšují kontraktilitu myokardu a srdeční tepovou frekvenci, což vede k významně zvýšenému srdečnímu výdeji i ke zvýšené spotřebě kyslíku. Podání ISO snižuje periferní odpor tkání a způsobuje vazodilataci mnoha cév, načež dochází ke snížení diastolického a systolického krevního tlaku. Nadbytek katecholaminů v oběhu pak má za následek poškození tkáně myokardu, které můžeme pozorovat u srdeční ischemie, anginy pectoris, infarktu myokardu, a srdeční arytmie.

Pokud je srdeční tkáň vystavena nadměrnému množství katecholaminů, dochází k remodelaci myokardu a kardiomyocytů na subcelulární úrovni. Chronická stimulace β -adrenergických receptorů může způsobit nejen progresivní dysfunkci kardiomyocytů, ale i přestavbu celého myokardu - hypertrofii.

Kontraktilita srdce je regulována β -adrenergními receptory, přičemž jejich nadměrná aktivace přispívá k rozvoji zvýšené srdeční činnosti. Naopak jejich snížená aktivita má za následek i zklidnění myokardu.

Podání ISO způsobí závažný stres v myokardu právě kvůli aktivaci adrenergního systému. Pokud toto dráždění přetrvává, dochází ke kompenzaci tohoto stavu právě

remodelací srdce, které pak má posílenou kontraktilitu a zvýšenou kapacitu endoplazmatického retikula pro Ca^{2+} ionty.

Stimulace β -adrenergních receptorů isoprenalinem je spojena s aktivací transdukčních mechanismů, jimiž jsou kinázy, G proteiny, adenosin nukleotidy, aktivace systému renin-angiotenzin-aldosteron, indukce oxidačního stresu, Na^+/H^+ a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pump. Dochází dále ke zvýšení hladin endotelinů, změnám v produkci oxidu dusnatého, i ke zvýšení fibrogenních faktorů. [14]

3.2 Histologické změny

Rozsah poškození tkáně myokardu je závislý na velikosti použité dávky ISO, i na jeho způsobu podání. Vysoká dávka ISO, v rozmezí 85-300 mg/kg, je schopna vyvolat u potkanů podobné poškození, k jakému dochází u AMI u člověka. Z tohoto důvodu se používá ISO k vytváření potkaního modelu srdečního selhání podobnému lidskému AMI. [14]

Jedna dávka 150 mg/kg ISO vyvolala u potkanů nekrotické změny během 24 hodin. Ve tkáni bylo možné pozorovat degeneraci myocytů a nekrózu, intersticiální a perivaskulární fibrózu obzvláště v levé srdeční komoře. [15]

Ve své studii se skupina Pick et al. 1989 podrobněji zabývala fibrotizací myokardu vyvolanou ISO při několikadenní expozici. Byla použita dávka 1 mg/kg po dobu dvou dnů, přičemž pokus byl sledován v sekvenci 1, 2, 3, 4, a 8 dní.

Podle výsledků studie reagovaly fibroblasty myokardu na ISO ve druhém dni produkcí kolagenu I a III ve formě tenkých vláken, zatímco mezibuněčné prostory byly téměř uzavřeny. Síť kolagenu se během pokusu dále roztahovala přes sousedící svalová vlákna a narůstala tloušťka kolagenových vláken. Osmý den tlustá vlákna převládala. [16]

U potkanů dochází po administraci jedné vysoké dávky ISO k formaci infarktových oblastí, jež obsahují nekrotickou tkáň ve ventro-laterální části levé komory nad apexem.

Ultrastrukturální změny kardiomyocytů se odehrávají i mimo nekrotické oblasti na úrovni myofibril, mitochondrií a t-tubulů. U myocytů levé komory byl pozorován výskyt

vezikul v t-tubulech a longitudinálním sarkoplazmatickém retikulu. Mitochondriální změny byly obzvláště patrné na myocytech papilárního svalu, kde narušení ultrastruktury bylo možné sledovat i na úrovni myofibril. [14]

Při administraci ISO v množství 100 mg/kg je možné sledovat závažné fokální nebo difuzní poškození kardiomyocytů. Zánětlivý infiltrát byl pozorován zejména pod epitelem endokardu nebo v tenké fibrozní tkáni pod epitelem epikardu. Jen vzácně se infiltrát vyskytoval v centrálním myokardu. [17]

3.3 Biochemické a funkční změny

Pro sledování změn spojených s poškozením myokardu je možno použít mnoho biochemických markerů, ke kterým patří kreatinkináza (CK), včetně její podjednotky CK-MB, aspartát transamináza (AST), alanin transamináza (ALT), a laktát dehydrogenáza. Všechny tyto markery se zpravidla stanovují v krevním séru. [18]

Troponin T (TnT) a troponin I (TnI) jsou složkami regulačního komplexu troponin-tropomyosin v příčně pruhovaném svalu. V srdečním svalu se pak vyskytují jejich izoformy cTnT a cTnI. K jejich vzestupu, jenž má velkou diagnostickou senzitivitu, dochází v rámci několika hodin po srdeční ischemii.

Kromě myokardu lze sledovat expresi cTnT v malém množství ve fetálním kosterním svalstvu, a jeho opětovná exprese byla zaznamenána i u kosterní svaloviny dospělých potkanů. Naopak cTnI je jediná izoforma TnI v myokardu, jež se jinde nevyskytuje. To činí z cTnI vysoce specifický marker myokardového poškození. [19]

Srdeční ischemie vyvolaná ISO (ve studii použita dávka 100 mg/kg) je provázena zvýšením krevního tlaku, tepu, a hypertrofií komor. Mimo vzestupu sérového cTnT bylo možné sledovat i vzestup hladiny vápníku v myokardu.

Svou roli v poškození vyvolaném ISO sehrávají i reaktivní formy kyslíku (ROS), jež se pravděpodobně uplatňují v počátku vzniku ischemie. Je i možné, že se některé biochemické markery normalizují během 24 hodin.

Srdeční mikroelementy, kam patří železo, měď, zinek a selen, jsou konstituenty antioxidantních enzymů a dalších fyziologicky významných molekul. Železo s mědí jsou navíc schopni katalyzovat vznik ROS, přičemž zvýšená hladina mědi může působit jako

významný faktor oxidačního stresu. Výrazná změna v obsahu železa ani zinku nebyla zaznamenána, hladina selenu vzrostla statisticky nevýznamně. [11]

Změny byly pozorovány i u aktivit SOD a glutathion-S-transferázy (GST) při použití dávky 85 mg/kg ISO. Spolu s enzymy CAT a GPx tvoří první obrannou linii během oxidačního stresu. Ve srovnání s kontrolní skupinou došlo u potkanů, jimž byl aplikován ISO, k významnému poklesu koncentrace GSH a na něm závislých enzymů (GPx a GST v srdeční tkáni).

GPx tvoří hlavní enzymatický mechanismus, jímž se v myokardu neutralizují peroxidy, a jeho dlouhodobý pokles může vést k akumulaci intracelulárních peroxidů. Stejně tak GST odstraňuje stabilní peroxidy. Pokles GSH, jenž je substrátem pro oba enzymy, je pak přímo spojen se snížením aktivity GPx a GST.

Zaznamenán byl současně pokles hladin vitamínu C a E u potkanů, jimž byl podán ISO. Oba sehrávají roli v obraně proti oxidačnímu stresu, přičemž vitamín E je schopen zastavit peroxidaci lipidů a regenerovat vitamín C.

Dalším markerem, podle kterého se posuzuje oxidační stres, je malondialdehyd (MDA), jenž se převádí na barevný komplex TBARS (thiobarbituric acid reactive substance). Vzestup hladin TBARS pak indikuje vzestup peroxidace lipidů, což můžeme pozorovat v srdeční tkáni i plasmě právě po administraci ISO. [18, 20]

4 FLAVONOIDY

Pro účely prevence a případné léčby kardiovaskulárních onemocnění je v současnosti prozkoumávána celá řada látek, s nimiž se můžeme setkat i v potravě. Již víme, že rostliny obsahují velké množství prospěšných substancí, které mají antioxidační účinky, a proto je tedy nazýváme antioxidačními fytochemikáliemi. Do této skupiny můžeme zařadit rodinu polyfenolů, do nichž patří podskupina látek, již známe jako flavonoidy.

Flavonoidy ubikviterně nacházíme v rostlinné říši, kde hrají důležitou funkci při regulaci růstu a obraně vůči infekcím. Jsou využívány nejen botaniky pro taxonomickou klasifikaci, ale i tvoří důležitou složku léčivých rostlin užívaných v tradiční medicíně.

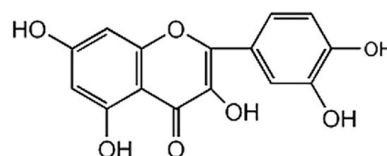
Co se chemické struktury týče, flavonoidy patří mezi deriváty benzo- γ -pyronu, jenž sestává z fenolických a pyranových kruhů, a jejich klasifikace je odvozována podle

jednotlivých substitucí. Rozlišujeme pak tyto třídy flavonoidů: flavanoly, flavony (rutin), flavonoly (quercetin), flavanony, isoflavony, a anthocyanidiny. [21, 22]

4.1 Quercetin

4.1.1 Struktura a chemické vlastnosti

Quercetinu, látce patřící mezi flavonoly, je dodnes věnována velká pozornost. Jedná se o látku nerozpustnou ve vodě, zato dobře rozpustnou v alkoholu a lipidech. Jeho chemický název je 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-



Obr. 2: Strukturní vzorec quercetinu [45]

on. Připojení glykosylové skupiny může změnit jak jeho rozpustnost, tak jeho účinky in vivo. [23, 24]

4.1.2 Výskyt v potravě

Quercetin patří mezi nejhojněji se vyskytující flavonoidy, jež jsou široce rozšířeny v rostlinné říši – například v jablku, bobulovitých plodech, brukvovité zelenině, kapary, hroznech, cibuli, šalotce, čaji, a v rajčatech. Jedná se tedy o nejhojněji přijímaný flavonoid v lidské stravě. Přijímán je nejčastěji ve formě glykosidu s jedním či dvěma zbytky glukózy, případně rutinózy (např. v čaji). Aglykonní forma je v potravě daleko méně častá.

Během trávení je quercetin zbavován cukerných zbytků například enzymy v ústní dutině, střevech, na hydrolýze se podílí i střevní mikroflóra. V aglykonní formě je totiž více lipofilní, a tedy i snáze vstřebatelný buňkami. U potkanů je částečně resorbován i v žaludku. [23, 25]

4.1.3 Vlastnosti z hlediska medicíny

Tato látka je zkoumána pro své antialergenní účinky (in vitro inhibuje uvolňování histaminu z bazofilů a mastocytů), a protirakovinové (in vitro antioxidační, antiproliferativní, pro-apoptotické účinky). Výzkum se provádí i v souvislosti

s diabetem, hypertenzí, a mnoha dalšími stavy a nemocemi, ale v neposlední řadě jsou zkoumány i jeho kardioprotektivní vlastnosti. [23]

Například byla prokázána přímá souvislost mezi výší jeho příjmu v potravě a zvýšení odolnosti LDL vůči oxidaci (avšak bez ovlivnění hladiny lipoproteinů). [26]

Mezi jeho další kardioprotektivní vlastnosti patří schopnost zneškodňovat superoxidový aniont, singletový kyslík a lipidoperoxidové radikály. V neposlední řadě i volné radikály. Je schopen vytvářet komplexy s kovovými ionty, a tedy zabránit jejich oxidaci, jež vede k vytváření ROS. [27, 25, 28]

Podle nedávné studie je quercetin schopen u myší bránit agregaci destiček, a tedy i formaci trombu. [29]

Orální podávání quercetinu nevykázalo jednoznačný vliv vůči antioxidantním enzymům, avšak byla prokázána inhibice oxidativního poškození DNA lymfocytů. Není bez zajímavosti, že v kombinaci s isorhamnetinem a rhamnetinem byl quercetin schopen snížit koncentrace lipidů u potkanů krmených stravou obohacenou o cholesterol. [26, 30]

Dále u zvířecích modelů diabetu byl prokázán pozitivní vliv quercetinu na obnovení endoteliální funkce, na systolický krevní tlak, a na hladinu lipidů v plazmě. [29]

Podle nizozemské kohortové studie je příjem flavonolů/flavonů nepřímo úměrný k výskytu mrtvice v populaci. [31]

Časně in vitro studie polyfenolů, včetně quercetinu, prokázaly několik závažných potenciálních reakcí s izolovanými mitochondriemi - ačkoli tyto účinky byly sledovány při vyšších dávkách, než bychom očekávali in vivo. Například inhibice respirace quercetinem nastává nejméně při 10 μM , zatímco dosažitelná plazmatická koncentrace se pohybuje v rozmezí 100-600 nM. [26]

Quercetin je zkoumán nejen samostatně, ale i v kombinaci s jinými látkami, ve snaze posílit jeho antioxidantní účinky. Například s α -tokoferolem byl schopen normalizovat biochemické parametry (membránově vázané ATPázy a lyzozomální enzymy srdeční tkáně) při navození ischemie isoprenalinem. [32]

Zaafan et al. ve své studii zkoumal vliv atorvastatinu a quercetinu na ischemii vyvolanou isoprenalinem. Byli použiti samci potkanů Wistar vážící 150-200 g, kteří byli rozděleni do pěti skupin po osmi jedincích.

Jedna skupina dostávala 14 dní quercetin (50 mg/kg p.o.). Poslední dva dny jim byl podáván ISO v dávce 100 mg/kg. Po 24 hodinách bylo snímáno jejich EKG a odebrána krev ke sledování biochemických markerů. Následovalo odebrání myokardu pro histologickou analýzu. Kontrolní skupina nebyla premedikována quercetinem ani jí nebyl podán ISO.

Po aplikaci ISO byly v myokardu přítomny (ve srovnání s kontrolní skupinou) tyto patologické změny: mnohočetné fokální oblasti s degenerovanými kardiomyocyty, edémem, a infiltrátem zánětlivých buněk. U skupin premedikovaných quercetinem došlo po podání ISO v porovnání s ISO k výraznému zlepšení histologického obrazu.

Na EKG byla po podání isoprenalinu pozorována ve srovnání s kontrolní skupinou pozitivní T vlna, zvýšení ST segmentu, a pokles amplitudy vlny R. U skupiny, již byl podáván quercetin, došlo oproti čistě isoprenalinové skupině ke zredukování vzestupu ST segmentu, a ke zvýšení amplitudy R vlny.

Z biochemických markerů byly sledovány cTnI, malondialdehyd, a další. Po podání quercetinu byla hladina cTnI o 64,68% nižší ve srovnání s isoprenalinovou skupinou. Stejně tak měl quercetin příznivý vliv na hladinu malondialdehydu - byl pozorován pokles o 21,3%. [33]

Problematice quercetinu a myokardiální ischemie se věnovala i studie Pandey a Kara. Potkani Wistar o váze 200-210 g byli rozděleni do pěti skupin, z nichž třetí byl podán quercetin o dávce 10 mg/kg p.o. po dobu 14 dnů. Poslední dva dny jim byl aplikován isoprenalin (100 mg/kg s.c.). Po anestezii ketamin hydrochloridem byly zpracovány histologické řezy, rovněž bylo monitorováno jejich EKG, a stanoveny biomarkery z krevního séra.

V histologickém obrazu potkanů, jimž byl podán pouze ISO, bylo ve srovnání s kontrolní skupinou patrné rozsáhlé narušení a fragmentace myofibril, ztráta pruhování, nekrotizace kardiomyocytů, a edém intersticia. U skupiny, jež byla před podáním ISO

premedikována quercetinem, byly ve srovnání s ISO skupinou menší nekrotizace i zánětlivý infiltrát.

Získané biochemické parametry byly podobné jako u ostatních zde uvedených prací, měřena byla rovněž i jejich srdeční činnost. Ukázalo se, že při podávání quercetinu došlo ve srovnání s isoprenalinovou skupinou k normalizaci srdečního tepu. [34]

Punithavathi a Prince se rovněž ve své studii věnovali vlivu quercetinu na ischemii vyvolanou isoprenalinem; tentokrát v kombinaci s α -tokoferolem. Experiment byl proveden obdobně, jako je právě výše uvedený, avšak s několika odlišnostmi. Váha potkanů se pohybovala v rozmezí 180-200 g, isoprenalin byl podáván subkutánně (s.c.) v dávce 100 mg/kg po dva dny ve 24 hodinovém intervalu.

Potkanům z šesté skupiny byl před aplikací ISO podáván pouze quercetin denně v dávce 10 mg/kg po dobu 14 dnů za pomoci intragastrické sondy. Páté skupině byl podán pouze isoprenalin. Vyjmutí myokardu bylo provedeno po 12 hodinách od poslední ISO injekce.

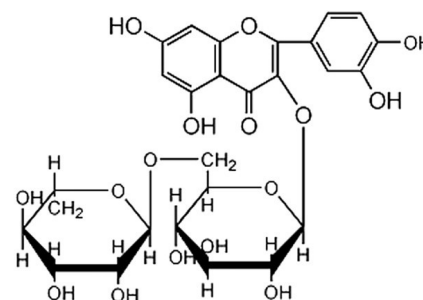
Byla zde sledována řada parametrů, včetně hladiny vitamínu C v krevní plazmě. Oproti kontrolní skupině došlo k jeho poklesu u skupiny, již nebyl podán quercetin ani α -tokoferol. Po podání quercetinu byl zaznamenán její částečný vzestup, při použití směsi quercetin a α -tokoferol byla plazmatická hladina vitamínu C po ISO aplikaci normalizována. [35]

Všechny tyto výsledky jsou z hlediska kardioprotektivních účinků quercetinu dosti zajímavé, a je to tedy i důvod, proč byl quercetin použit pro výzkumnou část této práce.

4.2 Rutin

4.2.1 Struktura

Rutin, rovněž jako quercetin, patří mezi flavonoidy, a přitahuje pozornost svými fytochemickými vlastnostmi. Jeho systematický název je quercetin-3-rutinosid a jak toto pojmenování napovídá, jedná se o jednu



z glykosidických forem quercetinu. Můžeme se setkat i s odlišným pojmenováním rutinu, a to vitamín P. [36]

4.2.2 Výskyt v potravě

Rutin se obvykle vyskytuje spolu s quercetinem, přičemž je lze nalézt v rostlinách, jako jsou např. cibule, jablka, bobulovité plody, víno, a čaj. Za bohatý zdroj této látky je ve stravě považována pohanka.

Quercetin i rutin slouží jako substráty pro rostlinné peroxidázy, přičemž rutin je jimi hydrolyzován na quercetin a rutinosu. Quercetin je při stresu zpracováván na kyselinu 3,4-dihydroxybenzoovou, která má antifungální účinky. Rutinosa je pak schopná zvýšit rychlost respirace. Dále bylo prokázáno, že rutin poskytuje rostlinám ochranu před škodlivým UV zářením, a zřejmě z těchto důvodů se oba flavonoidy vyskytují společně. [36, 37,38]

Hydrolýza rutinu je v lidském organismu uskutečňována enzymatickými glykosidázami, a jejím produktem jsou quercetin spolu s rutinosou. Jak quercetin, tak rutin, jsou výtečné zdroje farmaceutických produktů určených pro fytoterapii. [37, 39]

4.2.3 Vlastnosti z hlediska medicíny

Většina biologických aktivit (např. protizánětlivé, antimikrobiální, antitumorové a antiastmatické účinky) je zpravidla připisována antioxidantním vlastnostem rutinu. Dokonce vykazuje větší stabilitu vůči oxidaci než quercetin.

Díky svým antioxidantním účinkům je rutin používán nejen ve farmacii, ale i v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Častá je jeho kombinace s vitamínem C. [37]

Mnoho studií prokázalo antioxidantní vlastnosti rutinu, a to zejména schopnost neutralizovat volné radikály. Tím dokáže zabránit mnoha patologickým stavům, a je ho rovněž možné jej použít k terapeutickým účelům. Dokáže se navázat na ionty železa, čímž zabraňuje další tvorbě volných radikálů. [40, 41]

Rutin přispívá k ochraně vůči oxidaci odevzdáním elektronu reaktivním volným radikálům, čímž je stabilizuje, a přerušuje tak řetězovou reakci radikálů. To umožňují

fenolické kruhy a volné hydroxylové skupiny v jeho chemické struktuře. Hydroxylové skupiny mohou rovněž darovat vodík, díky čemuž opět zabrání další oxidaci. [42]

Jak již bylo řečeno, rutin se vyskytuje v četných rostlinách. Stejně jako ostatní flavonoidy je v nich přítomen v glykosidové formě, avšak jeho přesný metabolismus je nejasný. Obecně se však předpokládá, že glykosidy jsou hydrolyzovány střevními mikroflórou před vlastní absorpcí. Je však vstřebáván pomaleji než quercetin. Podle některých studií se rutin absorbuje jen z malé části, či zcela vůbec, protože je ve střevech rozkládán na metabolity. [37]

Ačkoli existuje mnoho studií zkoumajících biologické účinky rutinu, jejich mechanismus je stále nejasný. Z toho důvodu se v západní medicíně rutin dosud příliš nevyužívá. K tomu lze přičíst i jeho nepříliš dobrou absorpci po perorálním podání.

Nicméně by rutin mohl ovlivňovat některá chronická onemocnění. Například byly sledovány jeho antidiabetické vlastnosti u potkanů, jimž byl podáván stravou ve vysokém množství. Podle dalších studií byl rutin schopen oddálit poškození ledvin diabetických potkanů, a zároveň je potenciálním lékem pro prevenci časně diabetické neuropatie. Mohl by dokonce zabránit glykosilaci hemoglobinu, která může mít za následek nervové poškození a slepotu.

Některé studie prokázaly, že rutin dokáže snížit hladinu lipidů v krvi, a to zejména LDL a VLDL. HDL se naopak zvýšily. Rutin byl i označen jako slibný flavonoid z důvodu snížení rizika aterosklerózy, kdy prokázal svou kapacitu inhibovat oxidaci LDL. Dále byl schopen zabránit agregaci trombocytů a zpevnit kapiláry. [37, 39]

Prince a Priya se ve své studii věnovali účinku rutinu na lysozomální enzymy u ISO navozené kardiotoxicity potkaních samců Wistar (150–170 g). Rutin jim byl podáván po 42 dnů p.o. v dávce 80 mg/kg. Vybraným skupinám byl podáván ISO (100 mg/kg s.c.) po dva dny v intervalu 24 hodin. 12 hodin po druhé aplikaci ISO byl okamžitě vyjmut a uložen celý myokard. Kontrolním skupinám nebyl podán ISO.

Histologická analýza se zabývala patologickými změnami v celém myokardu. U skupin, jež dostaly pouze ISO, zahrnoval histologický obraz ve srovnání s kontrolními skupinami značnou nekrózu, četný zánětlivý infiltrát, a hojně bylo rovněž rozdělení svalových vláken. Avšak u skupin, jež byly před aplikací ISO premedikovány rutinem, nastalo

zlepšení. Nebyla pozorována nekróza, nebyla oddělena svalová vlákna, a byl jen malý zánětlivý infiltrát. [43]

I skupina Li et al. se věnovala ve své studii vlivu podávání rutinu na isoprenalinem vyvolanou kardiotoxicitu. Potkani Wistar o váze 200 ± 20 g obdrželi denní dávku rutinu 25 mg/kg nebo 50 mg/kg po dobu 21 dnů p.o. V den 0 byl všem potkanům, kromě kontrolních skupin, podán isoprenalin v dávce 15 mg/kg s. c. Poté byla provedena histologická analýza, hemodynamické měření, stanoveny byly i biochemické markery, a western blot analýza.

V histologickém obrazu ISO skupiny bylo pozorovatelné narušení struktury celého myokardu. Při porovnání s kontrolní skupinou byla patrná nekrotizace v oblasti subendokardu, dilatace kapilár a leukocytární infiltrát. Po aplikaci rutinu došlo, ve srovnání s ISO skupinou, k výraznému zlepšení všech uvedených patologických změn. Myokard ve všech kontrolních skupinách nepodlehł žádným změnám.

Isoprenalin vyvolal významný pokles $+dp/dt_{max}$ a $-dp/dt_{max}$. Rutin v dávce 25 mg/kg znatelně zmírnil účinky ISO na $+dp/dt_{max}$ i na $-dp/dt_{max}$. Výrazný nárůst plazmatické koncentrace MDA byl pozorován po aplikaci isoprenalinu. Rutin byl schopen zabránit tomuto nárůstu způsobem, jenž byl přímo úměrný jeho dávce. [44]

Rovněž Karthick a Prince se ve své studii zabývali ochrannými účinky rutinu vůči srdeční ischemii vyvolané isoprenalinem. Byli použiti samci bílých potkanů Wistar o váze 150-170 g, na nichž byl sledován účinek rutinu v dávkách 40 a 80 mg/kg. Rutin byl podáván po dobu 42 dnů perorálně (p.o.) intragastrickou sondou. Isoprenalin byl aplikován podkožní injekcí poslední dva dny v dávce 150 mg/kg v intervalu 24 hodin. Následně proběhlo stanovení vybraných enzymů (LDH, AST, ALT, SOD, GPx) a vitamínu C.

Skupina, již byl aplikován pouze ISO, vykazala významný pokles hladiny vitamínu C (z $229,69 \pm 15,39$ mg/dl na $121,04 \pm 8,46$ mg/dl). Na druhé straně u skupin, jimž byl podáván rutin, byl zaznamenán nárůst koncentrací tohoto vitamínu (při 40 mg/kg rutinu $172,92 \pm 10,12$ mg/dl; při 80 mg/kg rutinu $205,40 \pm 9,98$ mg/dl). Vyšší hladina vitamínu C oproti kontrolní skupině byla zaznamenána u skupin, jimž byl podáván rutin, ačkoli již ne isoprenalin (při 40 mg/kg rutinu $235,88 \pm 16,19$ mg/dl; při 80 mg/kg rutinu $238,33 \pm 16,33$ mg/dl). [45]

PRAKTICKÁ ČÁST

5 PROVEDENÍ EXPERIMENTU

5.1 Zpracování materiálu pro histologickou analýzu

Standardní histologická analýza sestává z řady kroků, mezi něž patří fixace odebrané tkáně a její odvodnění, projasnění, prosycení, zalití do parafinu, krájení na mikrotomu, lepení řezů na podložní sklička, barvení, montování, a v neposlední řadě pozorování připravených preparátů pod mikroskopem.

Pro zabránění autolýzy (samovolnému rozkladu způsobeným enzymy) tkáně je třeba preparát nejprve fixovat. Procesem fixace se rychle vysráží bílkoviny v protoplasmě buněk a tkání za pomoci fixačních prostředků, jež musí splňovat následující požadavky: zachovat co neoptimálnější strukturu tkáně, rychle pronikat do tkáně a zároveň neporušovat její barvitelnost.

V experimentu s rutinem byl k fixaci použit studený roztok 10% pufrovaného formalinu po dobu cca 24 hodin. U pokusu s quercetinem byl k rapidní fixaci použit studený roztok 10% paraformaldehydu po cca 24 hodin.

V tab. 1 je pak uveden postup odvodňování fixovaného vzorku.

Tab. 1: Odvodňování vzorku fixovaného ve studeném 10% formalinu

Použitá látka	Doba fixace
70% etanol	30 minut
70% etanol	30 minut
80% etanol	3 hodiny
90% etanol	2 hodiny
96% etanol	přes noc
aceton I.	30 minut
aceton II.	30 minut
xylén I.	2 hodiny
xylén II.	4 hodiny
parafin I.	přes noc
parafin II.	přes noc

Vzorek byl odvodněn za pomoci vzestupné alkoholové řady a acetonu. Následovalo projasnění, při němž byl ze vzorku odstraněn etanol za pomoci xylenu - parafin je totiž nerozpustný v etanolu. Xylén je naopak mísitelný s etanolem a dokáže rozpouštět parafin.

Následovalo prosycení vzorku parafinem, a zalit byl rovněž do parafinu. Ze vzniklých bločků byly připravovány příčné řezy na automatickém sáňkovém mikrotomu LEICA DSC 1 o tloušťce 5-7 μm . Řez byl pak přenesen do kapky vody na upravené podložní sklíčko, jež bylo potřeno směsí glycerolu s bílkem. Tato úprava sloužila k tomu, aby se

řez na sklíčko přilepil a zůstal na něm fixován pro další zpracování.

Protože se k barvení histologických preparátů používají zpravidla vodné roztoky barviv, bylo třeba řezy nejprve odparafinovat dle postupu, jenž je uveden v tab. 2.

Pro hodnocení ve světelném mikroskopu jsme využili dvou typů barvení - hematoxylin s eosinem (H-E), a zelený trichrom dle Goldnera.

Tab. 2: Postup odparafinování

Látka	Doba působení
xylén	5 minut
xylén	5 minut
xylén	5 minut
96% etanol	5 minut
70% etanol	5 minut
destilovaná voda	5 minut
otření sklíček	-

5.1.1 Hematoxylin a eosin (H-E)

Ve světelné mikroskopii jsou hematoxylin a eosin nejčastěji používaným základním barvením. Zatímco hematoxylin je zásadité barvivo, jež zvýrazňuje kyselé (bazofilní) buněčné komponenty, eosin je naopak barvivo kyselé a je výrazně přitahován strukturami zásaditými.

Při jeho použití je zbarven preparát takovýmto způsobem:

- Jádra buněk a chrupavka – modře
- Kolagenní vazivo – růžově

- Svalstvo – červeně

K samotnému barvení byl použit 1% roztok eosinu v destilované vodě, hematoxylin byl pak zhotoven dle rozpisu v následující tab. 3:

Tab. 3: Složení roztoku Hematoxylin Hill

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

Proces samotného barvení je shrnut v tab. 4:

Tab. 4: Barvení H-E

Látka	Čas
hematoxylin	6-8 minut
pramenitá voda (modření)	10 minut
otření sklíček	-
eosin	2 minuty
destilovaná voda	opláchnutí

Po nabarvení preparátu následovalo jeho odvodnění, jež zahrnovalo dvojnásobné opláchnutí v 96% etanolu, ponoření do směsi etanol-xylenu (2:1) na 3 minuty, a posléze opět do etanol-xylenu (tentokrát v poměru 1:2) opět na 3 minuty.

Následovalo projasnění v lázni xylenu, jež se opakovala třikrát po dobu 3 minut. Poté byla sklíčka otřena a obarvené řezy byly zamontovány do kanadského balzámu.

5.1.2 Zelený trichrom podle Goldnera

Kromě přehledového barvení, jímž byl hematoxylin a eosin, byly preparáty nabarveny zeleným trichromem podle Goldnera.

Takto byl získán mikroskopický preparát, na němž byly rozlišeny následující struktury:

- Kolagenní vazivo – zelené zbarvení
- Jádra – modré zbarvení
- Svalovina – cihlově červené zbarvení
- Erytrocyty – oranžové zbarvení
- Hyalinní vazivo – červené zbarvení

V tab. 5 a tab. 6 je zobrazen postup přípravy roztoku Goldner I a III, jež jsou spolu s Goldner II nezbytné pro zhotovení takto barveného preparátu. Podstatou následujícího postupu barvení je pak impregnace preparátu kyselým roztokemponcea (Goldner I), Fuchsinem S (rovněž Goldner I), a světlou zelení (Goldner III).

Tab. 5: Příprava roztoku Goldner I

Látka	Množství	Odebrané množství pro výsledný roztok
ponceu de xylidin	1 g	20 ml
koncentrovaná kys. octová	1 ml	
destilovaná voda	100 ml	
oranž G	1 g	10 ml
koncentrovaná kys. octová	1 ml	
destilovaná voda	100 ml	
Fuchsin S	1 ml	10 ml
koncentrovaná kys. octová	1 ml	
destilovaná voda	100 ml	

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

Tab 6: Příprava roztoku Goldner III

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

Postup samotného barvení lze shrnout do těchto kroků:

- 1) Odparafinování řezů.
- 2) Ponoření řezů do roztoku Hematoxylin Gill na 4 minuty.
- 3) Opláchnutí v 70% alkoholu a diferencování v kyselém alkoholu.
- 4) Opláchnutí tekoucí vodou – modření preparátu.
- 5) Ponoření do roztoku Goldner I na dobu 10 minut. Následoval oplach destilovanou vodou.
- 6) Vložení do roztoku Goldner II na 10 minut, posléze opět opláchnutí destilovanou vodou.
- 7) Ponoření do roztoku Goldner III na 10 minut a opláchnutí destilovanou vodou.
- 8) Odvodnění preparátu a posléze montování do Solakrylu.

5.2 Quercetin

Údaje pro experimentální část byly použity se svolením autorů Říhy et al. [46]

5.2.1 Použité látky a přístroje

V experimentu byly upotřebeny následující látky:

- Fyziologický roztok
- Quercetin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Isoprenalin
- Urethan (Sigma-Aldrich, Německo)
- Chlorid draselný (Sigma-Aldrich, Německo)

Využity byly tyto přístroje:

- Chirurgické nástroje (skalpely, nůžky, nitě,...)
- Tlakový snímač MLT0380/D (AdInstruments, Austrálie)
- PE katetry
- Tlakově-objemný katetr typu Millar (Millar pressure-volume catheter SPR-838 2 F, 4E, 9mm, Millar Instruments Inc., USA)
- EKG končetinové svody II MLA1215 (AdInstruments, Austrálie)
- PowerLab se softwarem LabChart 7 (AdInstruments, Austrálie)
- Elecsys 2010 (Roche, Švýcarsko) – elektrochemoluminiscenční imunoesej
- PrinCE 750 (Prince Technologies B. V., Nizozemsko) – kapilární elektroforéza
- HPLC system LC-10A (Shimadzu, Japonsko)
- System P/ACE 5100 (Beckman, USA) – deproteinizace elektroforézou
- Potter-Elvehjemův homogenizátor (B. Braun, Německo)
- Centrifuga VWR Compact Star CS4 (VWR International, LLC, USA)

5.2.2 Pokusná zvířata

K pokusu s quercetinem bylo použito 31 samců potkanů Wistar-Han (Česká republika), jenž byli dodáni firmou Meditox (Česká republika). 23 potkanů bylo použito pro základní studii s isoprenalinem, a zbylých 8 pro farmakokinetickou studii.

Potkani byli uchováváni po dva týdny v klecích v místnosti, která byla k tomu účelově zařízena – kromě klimatizace byl zde zajištěn světelný režim, v němž se střídalo světlo s tmou po 12 hodinách. Po aklimatizaci byli potkani vážící kolem 375 g (hemodynamická studie) a 456 g (farmakokinetická studie) použiti k experimentům.

Studie proběhla se svolením Etické komise Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a odpovídala podmínkám doporučení *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publikovaného americkou Národní Institucí Zdraví (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

5.2.3 Příprava k experimentu

Potkani byli náhodně rozděleni do dvou skupin, z nichž jedné byl podáván fyziologický roztok (2 mg/kg), zatímco druhá dostávala po dobu sedmi dnů intragastrickou sondou quercetin (10 mg/kg). Poslední den se, po podání těchto látek, potkani opět náhodně rozdělili k podání vody (2 ml/kg) s.c. nebo roztoku isoprenalinu (100 mg/kg).

Po dalších 24 hodinách začal vlastní experiment. Experimentální skupiny, jimž nebyl podán ISO, byly pak označeny jako kontrolní (fyziologický roztok) nebo Q (quercetin). Další dvě skupiny, jež dostaly ISO, byly označeny jako ISO (fyziologický roztok + isoprenalin) a Q+ISO (quercetin + isoprenalin).

5.2.4 Histologie

Myokardy byly bezprostředně po vyjmutí z experimentálního jedince ponořeny do pufovaného studeného 10 % roztoku paraformaldehydu na cca 24 hodin. Následovalo jejich rozdělení příčnými řezy na čtyři segmenty směrem od baze myokardu k jeho apexu. Takto získané části byly zality do parafinových bločků klasickou metodou. Z nich byly nakrájeny řezy o tloušťce cca 5 μ m, barveny hematoxylinem a eosinem pro světelně mikroskopickou analýzu. Získané nálezy byly pozorovány a dokumentovány na mikroskopu Olympus AX70 (Olympus, Japonsko) pomocí kamerového systému ProgRes CT3 (Jenoptik, Německo) a počítačové obrazové analýzy NIS Elements AR 4.00.11 (Česká republika).

5.2.5 Hemodynamická studie

K anestézii, již předcházelo 12 hodin lačnění experimentálních jedinců, byla použita intraperitoneální (i. p.) injekce vodného roztoku urethanu v koncentraci 1,2 g/kg. Poté následovalo sledování hemodynamických parametrů následujícím způsobem.

Při měření tlaku byl do levé společné kyčelní arterie zaveden heparinovaný polyetylenový (PE) katetr (0,5/1,0 mm). Na něho byl pak napojen tlakový snímač MLT0380/D. Přes pravou společnou karotidu byl do levé srdeční komory vložen tlakově-objemový katetr Millar. Potom byl snímač spolu s katetrem a subkutánními

EKG končetinovými svody II MLA1215 napojen na přístroj PowerLab se softwarem LabChart7.

Získávání dat probíhalo cca 30 minut, přičemž nezbytná kalibrace hypertonickou solí (dvakrát 20 μ l 25% w/w roztoku chloridu sodného) se uskutečnila při ukončení sběru dat. Krevní vzorky byly odebrány z břišní aorty do heparinizované testovací zkumavky (170 IU/10 ml). Poté byla zvířata usmrcena v anestézii intravenózní aplikací 1 ml vodního roztoku chloridu draselného (KCl) o koncentraci 1M. Před podáním KCl neuhynulo žádné zvíře.

5.2.6 Biochemické markery

V biochemické analýze byly stanovovány hladiny troponinu T myokardu (cTnT), vitamínu C a E z krevního séra a celkový glutathion (GSH) z plné krve. Bylo provedeno rovněž stanovení malondialdehydu (MDA) obsaženém v srdeční tkáni.

Hodnoty cTnT byly stanoveny pomocí vysoce senzitivní elektrochemoluminiscenční imunoeseje (Elecsys 2010, Švýcarsko), jenž využívá dvou monoklonálních protilátek specificky reagujících s cTnT.

K separaci GSH byla využita kapilární elektroforéza s UV detekcí při vlnové délce 200 nm (PrinCE 750; PrinCE Technologies, Nizozemsko).

Po deproteinizaci bylo možné stanovit množství vitamínu C prostřednictvím elektroforézy s UV detekcí (P/ACE 5100, Beckman Coulter, USA), i vitamínu E separací na HPLC systému LC-10A s fluorimetrickou detekcí (Shimadzu, Japonsko).

Hladina MDA byla stanovena po homogenizaci myokardiální tkáně za pomoci Potter-Elvehjemova homogenizátoru B. Braun ve fosfátovém pufru o pH 7,4. Získaný homogenát byl následně vložen do centrifugy na 10 minut při 2600 G. Množství stanoveného MDA pak bylo měřeno spektrofotometricky s kyselinou thiobarbiturovou.

5.3 Rutin

5.3.1 Zpracování experimentu

V tomto experimentu byl sledován vliv rutinu na ISO vyvolanou ischemii myokardu. K tomu bylo použito 54 samců potkanů Wistar:Han (MediTox, Česká Republika), jimž byla věnována při aklimatizaci stejná péče, jako při pokusu s quercetinem (viz 5.2.2.)

Studie byla rovněž schválena Etickou komisí Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za podmínek uvedených v *The Guide for The Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Samci o průměrné váze 390 g byli náhodně rozděleni mezi kontrolní a ISO skupiny. V kontrolní skupině byly podány roztoky hydrogenuhličitanu sodného (1,26% w/V ve vodném roztoku) a rutinů následujícím způsobem:

- Hydrogenuhličitan sodný – 2,3 ml/kg (SB2,3; 6 potkanů)
- Hydrogenuhličitan sodný – 4,6 ml/kg (SB4,6; 6 potkanů)
- Rutin – 11,5 mg/kg (2,3 ml/kg; Ru11,5; 6 potkanů)
- Rutin – 46 mg/kg (4,6 ml/kg; Ru46; 6 potkanů)

Rovněž ISO skupiny obdržely stejným způsobem výše uvedené látky, odlišný byl pouze počet jedinců v jednotlivých skupinách: SB2,3+ISO (9 potkanů); SB4,6+ISO (7 potkanů); Ru11,5+ISO (7 potkanů); Ru46+ISO (7 potkanů). O pět minut později jim byl podán vodný roztok isoprenalinu (100 mg/kg, s.c.). Anestézie před chirurgickým zákrokem byla provedena i. p. injekcí vodného roztoku urethanu (1,2 g/kg).

5.3.2 Histologie

K hodnocení experimentu s rutinem bylo použito jak H-E barvení, tak i trichrom podle Goldnera. Barvení proběhlo způsobem uvedeným v kapitole 5.1. Zároveň byly tkáňové bločky z myokardu experimentálních zvířat zpracovány metodou pro zhotovení polosilných řezů, která má obvyklé použití pro přípravu preparátů v transmisní elektronové mikroskopii.

Fixace tkáňových bločků byla provedena ponořením do 3% roztoku glutaraldehydu, a

následně 1% OsO₄ (obojí ve fosfátovém pufru při pH 7,2-7,4). Odvodnění vzorku proběhlo ve vzestupné řadě koncentrací acetonu a propylen oxidu. Následně byl vzorek zalit do směsi pryskyřic Durcupan ACM a Epon 812. Krájení o zvolené tloušťce cca 1 μm bylo provedeno na ultramikrotomu LKB a zhotovené řezy barveny toluidinovou modří.

Pro histologickou analýzu a fotodokumentaci byly použity příčné řezy vyšetřovaných částí myokardu. Snímky uvedené v této práci byly vybrány podle charakteristických nálezů u jednotlivých zvířat. Zhotovené preparáty byly pozorovány za pomoci světelného mikroskopu OLYMPUS AX-70 s digitální kamerou ProgRes CT3 (Jenoptik, Německo). Získané snímky byly zpracovány zobrazovacím programem NIS - ELEMENTS AR 4.00.11 (Česká republika).

6 VÝSLEDKY

6.1 Quercetin

6.1.1 Histologická analýza

Přehled změn jednotlivých experimentálních skupin je uveden níže v tab. 7. Pro zachování přehlednosti je zachováno jejich označení z kapitoly 5.2.3. Hodnocení je semikvantitativní, tzn. žádné patologické změny (-), málo (+), mírně (++), a středně (+++) významné změny.

Tab. 7: Semikvantitativní hodnocení histopatologických změn endokardu, myokardu a epikardu
Q

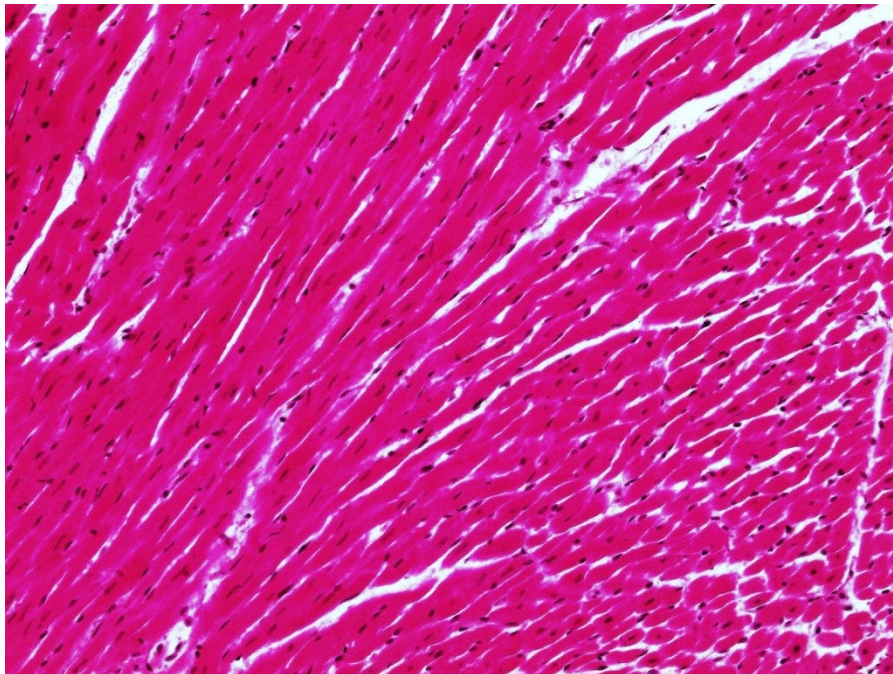
Změna	Oblast	Kontrola	Q	ISO	Q+ISO
Místní kapilární hyperémie	Endokard	+	+	+++	+++
	Myokard	+	+	+++	+++
	Epikard	+	+	+++	+++
Intersticiální otok s dilatací	Endokard	-	-	+++	+++
	Myokard	-	-	+++	+++
	Epikard	-	-	+++	+++
Otok pojivových vláken	Endokard	-	-	+++	+++
	Myokard	-	-	+++	+++
	Epikard	-	-	+++	+++
Nekrotické změny kardiomyocytů	Endokard	-	-	++	++
	Myokard	-	-	++	++
	Epikard	-	-	++	++
Fragmentace myofibril	Endokard	-	-	++	++
	Myokard	-	-	++	++
	Epikard	-	-	++	++
Fragmentace svalových trabekul	Endokard	-	-	+	+
	Myokard	-	-	+	+
	Epikard	-	-	+	+
Přítomnost makrofágů/ žírných buněk	Endokard	-	-	+++	+++
	Myokard	-	-	+++	+++
	Epikard	-	-	+++	+++

Jak bylo možné očekávat, podání ISO způsobilo ve srovnání s kontrolní skupinou častý zánětlivý infiltrát ve tkáni, otok velmi rozšířených intersticiálních prostorů, a nekrotické změny v oblasti komor (např. ztráta myofibrilárního pružování, pyknotizace jader).

Mírný až střední lymfocytární infiltrát, v němž jsou zahrnuty i aktivované makrofágy, se pohyboval od epikardiálních k subendokradiálním sekcím. Nález u zvířat, jimž byl preventivně podáván quercetin (Q+ISO), byl podobný jako u ISO skupiny.

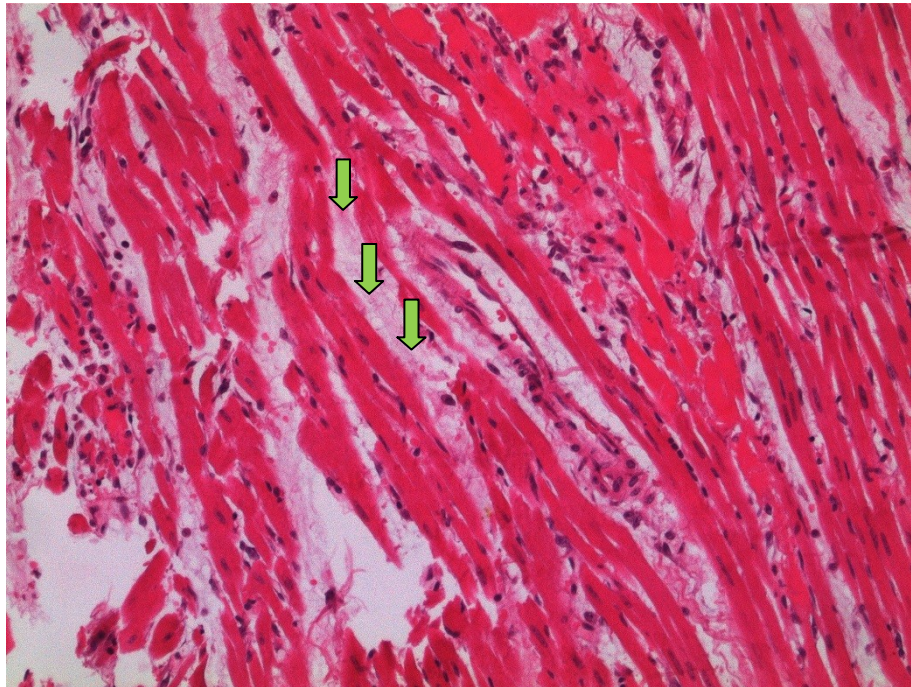
U skupiny, jež dostala pouze quercetin, byl histologický nález podobný kontrolní skupině – tedy s výjimkou jednoho zvířete, u něhož byl v epikardu nalezen mírný fokální intersticiální infiltrát lymfocytů.

Na obr. 4 je přehledový snímek myokardu kontrolní skupiny, u níž nebyl použit rutin ani ISO. Zde je možné pozorovat vlákna myokardiálního svalu a protáhlá jádra doutníkovitého tvaru. Rozšíření intersticiálního prostoru mezi kardiomyocyty je dáno chybou metody.



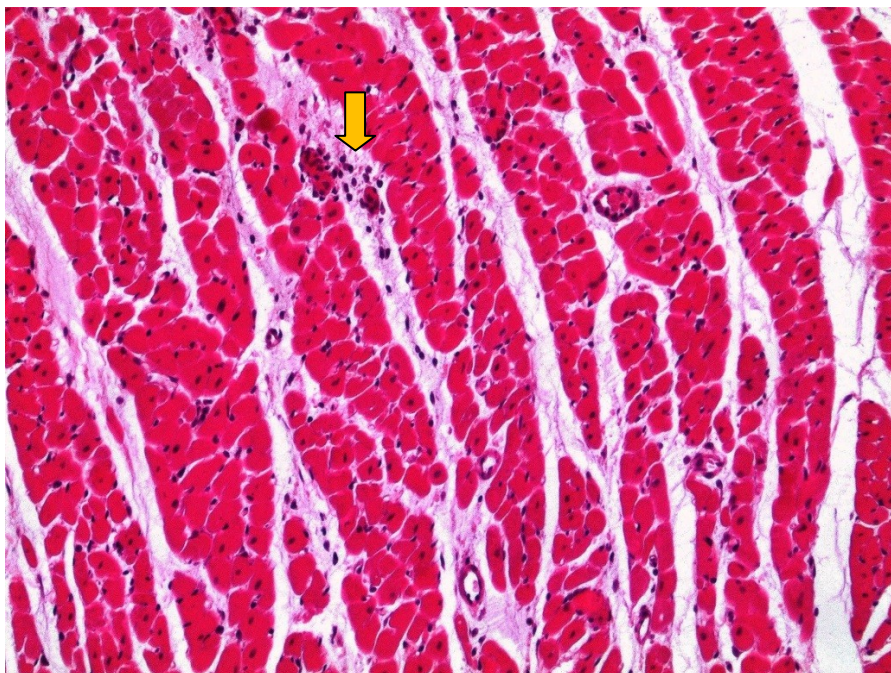
Obr. 4: Přehledový snímek myokardu (kontrola), barvení H-E, zv. 100x

Ve srovnání s obr. 4 nám obr. 5 ukazuje myokard, na nějž byl aplikován pouze ISO. Na něm je již pozorovatelná oblast ischemického poškození s nekrotickými myocyty, otok v široce rozšířeném intersticiu, a infiltrát zánětlivých buněk.



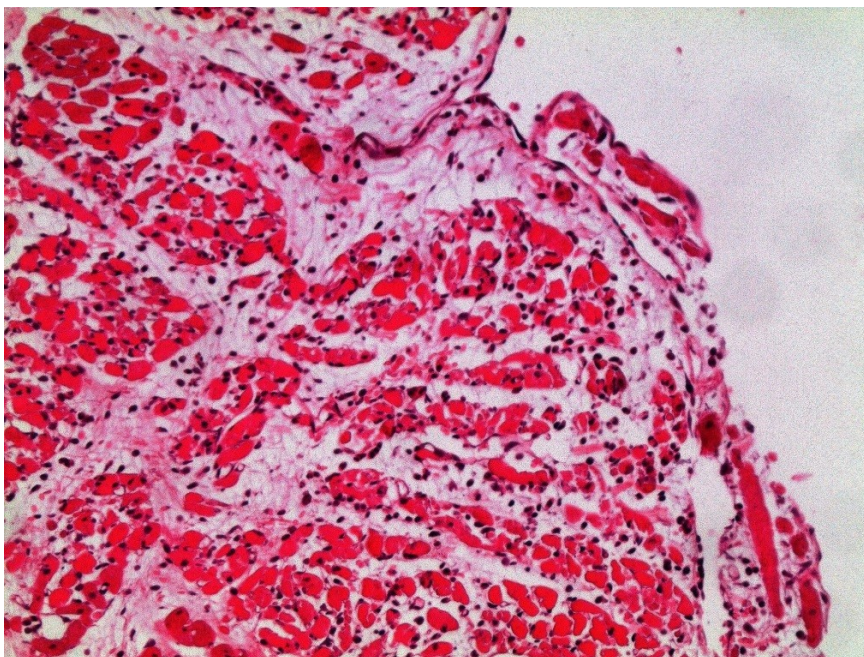
Obr. 5: Myokard (ISO), barvení H-E, zv. 100x; zelená šipka - edém

Přítomnost zánětlivého infiltrátu můžeme vidět i na obr. 6, který se nachází ve středně rozšířeném intersticiu.



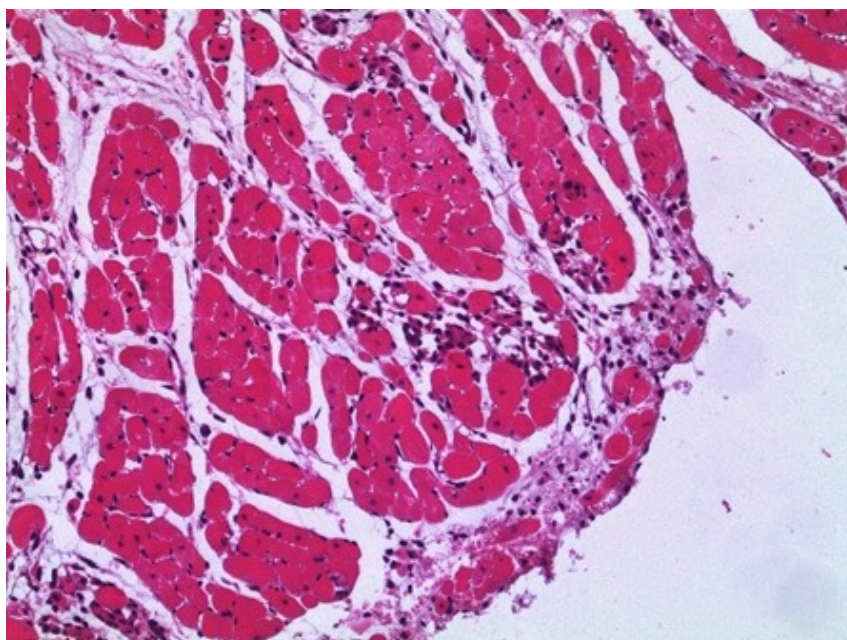
Obr. 6: Myokard (Q+ISO), barvení H-E, zv. 100x; oranžová šipka – lymfocytární infiltrát

Na obr. 7 můžeme vidět histopatologický nález subendokardiální části levého myokardu s aplikovaným ISO, na němž je patrné rozsáhlé poškození dané oblasti.



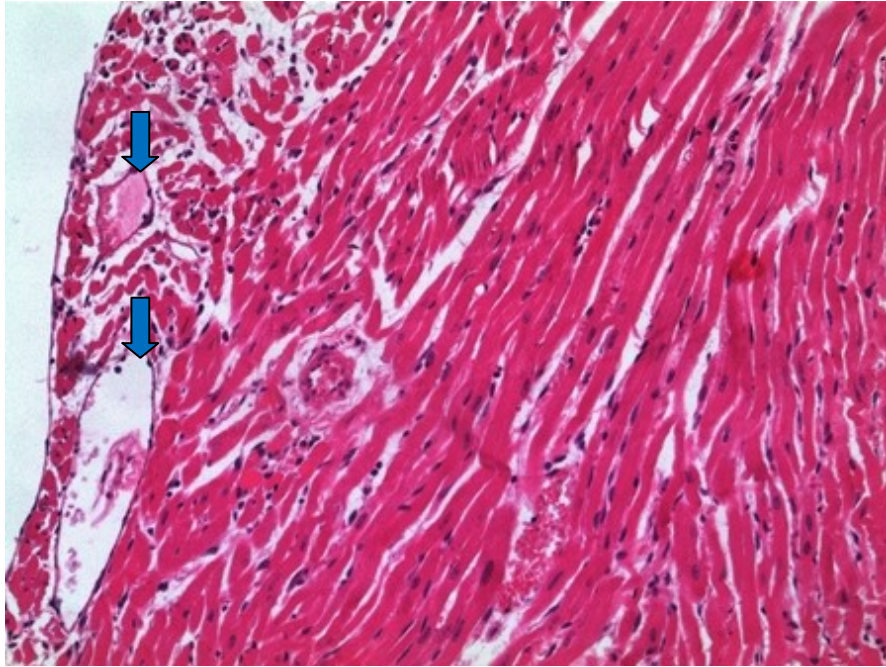
Obr. 7: Endokard a myokard (ISO), barvení H-E, zv. 100x

Na dalším obr. 8 je zobrazena subendokardiální a myokardiální část srdečního svalu, přesněji levé komory. V tomto případě byl aplikován ISO po krátké preventivní administraci quercetinu. Histopatologické změny tady zahrnují multifokální subakutní zánět myokardu a infiltrát mononukleárních buněk v subendokardiální tkáni.



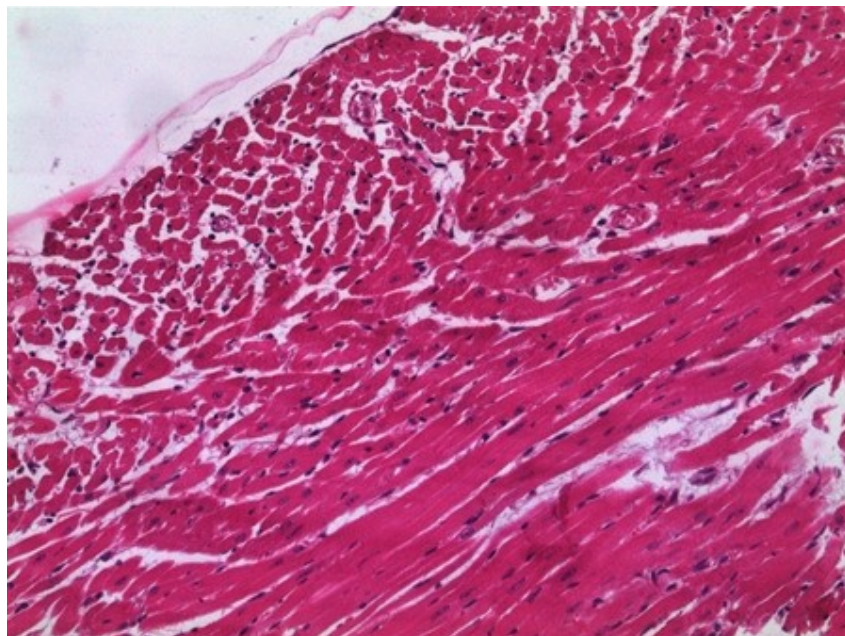
Obr. 8: Endokard a myokard (Q+ISO), barvení H-E, zv. 100x

Snímek (obr. 9) nám poskytuje souhrnný pohled na pravou komoru zvířete, jemuž byl podán quercetin a ISO. V epikardu je možné pozorovat silný intersticiální lymfocytární infiltrát a dilataci subepikardiálních krevních cév (označeno modrou šipkou v obr. 9).



Obr. 9: Epikard a myokard (Q+ISO), barvení H-E, zv. 100x

Rovněž obr. 10 ukazuje pravou komoru potkana, jemuž byl podán quercetin a ISO. V epikardu je přítomen mírný epikardiální a fokální intersticiální infiltrát lymfocytů.



Obr. 10: Epikard a myokard (Q+ISO), barvení H-E, zv. 100x

6.1.2 Hemodynamické parametry

Níže uvedená data jsou vyjádřena jako průměr \pm SD (směrodatná odchylka). Porovnání rozdílů proběhlo prostřednictvím ANOVA testu, po němž následoval Fisherův LSD test. Údaje k ANOVA testu byly získány ze setu individuálních t-testů. Ke statistické analýze byl použit software GraphPad Prism 5 pro Windows (GraphPad Software, USA). Za signifikantní byly považovány rozdíly $p \leq 0,05$.

U skupiny, jíž byl podán pouze ISO, se krevní tlak významně nezměnil, zato však došlo k významnému zrychlení tepové frekvence. Předcházející aplikace quercetinu neměla na tuto změnu žádný vliv.

ISO byl dále schopen významně snížit ejekční frakci ($39 \pm 15\%$) v porovnání s kontrolami (fyziologický roztok $67 \pm 18\%$, quercetin $67 \pm 13\%$). Premedikace quercetinem zde rovněž nevykázala pozitivní vliv ($40 \pm 8\%$). Takovýto pokles ejekční frakce ukazuje na srdeční selhání, a proto byly analyzovány i další parametry srdeční činnosti.

Po aplikaci ISO nastalo zvýšení end-diastolického tlaku levé komory a periferní rezistence. Zároveň ISO vyvolal nárůst diastolické isovolemické relaxace, avšak neovlivnil kontraktilitu. Ani v těchto případech se neukázal pozitivní vliv quercetinu, s výjimkou end-diastolického tlaku levé komory, u něhož byl protektivní účinek patrný.

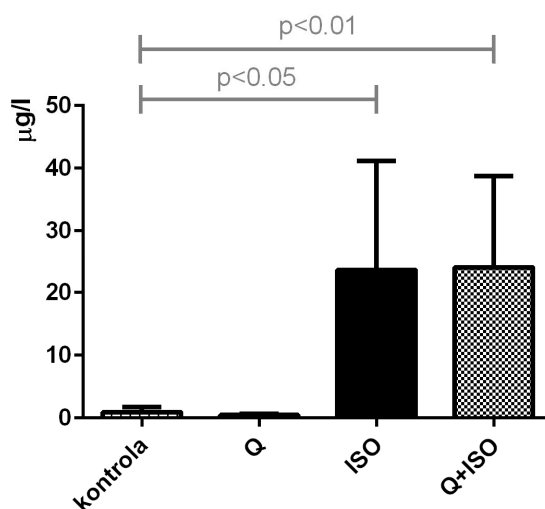
U obou skupin bylo pozorovatelné zvýšení spoje QRS-T, jež odpovídá elevaci ST segmentu na lidském EKG.

6.1.3 Biochemické markery a vlhká hmotnost komor

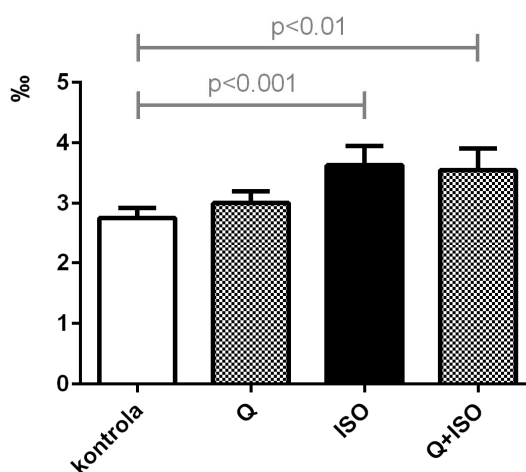
Po aplikaci ISO bylo pozorováno významné zvýšení cTnT, přičemž podaný quercetin neměl na tento parametr žádný vliv (viz graf 1). Stejně tak u skupiny, jíž byl před ISO podáván quercetin, nedošlo ke změně hladiny vitamínu C. Při srovnání kontrolní a ISO skupiny nebyly pozorovány ani žádné změny v hladinách vitamínu E a MDA.

Dále byla stanovena i vlhká hmotnost komor (viz graf 2). U ISO skupiny byl ve srovnání v kontrolní skupinou zaznamenán významný nárůst této hodnoty, avšak stejně jako u předchozích měření podávání quercetinu tento parametr neovlivnilo.

Graf 1: Hladina cTnT v krevním séru



Graf 2: Vlhká hmotnost komor



6.2 Rutin

6.2.1 Histologická analýza

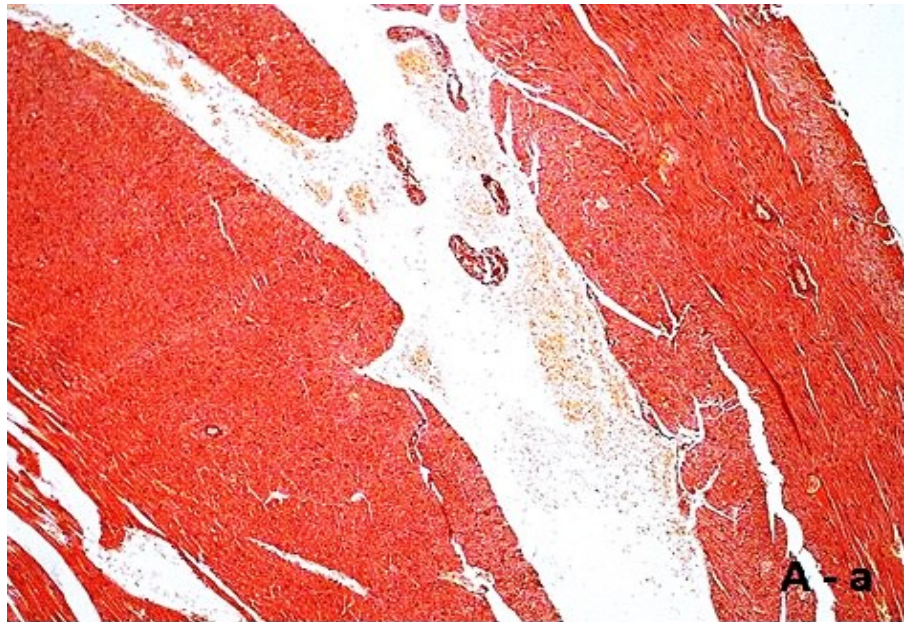
V tab. 8 je uvedeno přehledné semikvantitativní hodnocení patologických změn. Jednotlivé skupiny jsou označeny stejným způsobem, jenž je uveden v kapitole 5.3.1. Změny samotné byly hodnoceny jako absence patologických změn (-), málo (+), mírně (++) a středně (+++) významné změny.

Tab. 8: Semikvantitativní hodnocení histopatologických změn endokardu, myokardu a epikardu Ru

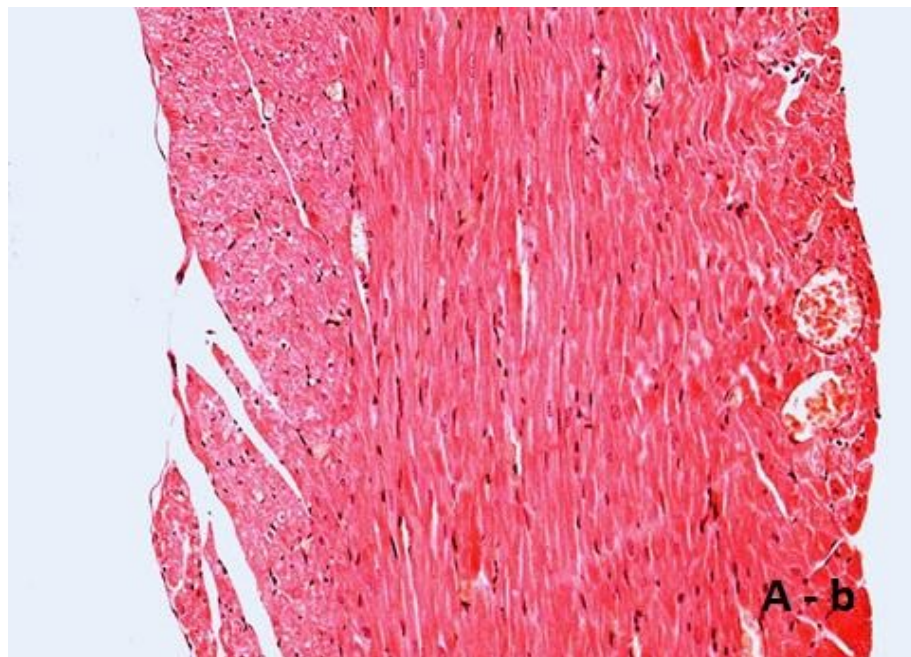
Změna	Oblast	SB 2,3	SB 4,6	Ru11,5	Ru46	SB2,3+ISO	SB4,6+ISO	Ru11,5+ISO	Ru46+ISO
Místní kapilární hyperémie	Endokard	-	-	+	+	+++	+++	++	++
	Myokard	-	-	+	+	+++	+++	+	+
	Epikard	-	-	+	+	+++	+++	++	++
Intersticiální otok s dilatací	Endokard	-	-	-	-	+++	+++	++	++
	Myokard	-	-	-	-	+++	+++	+	+
	Epikard	-	-	-	-	+++	+++	++	++
Otok pojivových vláken	Endokard	-	-	-	-	+++	+++	++	++
	Myokard	-	-	-	-	+++	+++	+	+
	Epikard	-	-	-	-	+++	+++	++	++
Nekrotické změny kardiomyocytů	Endokard	-	-	-	-	++	++	+	+
	Myokard	-	-	-	-	++	++	+/-	+/-
	Epikard	-	-	-	-	++	++	+	+
Fragmentace myofibril	Endokard	-	-	-	-	++	++	+	+
	Myokard	-	-	-	-	++	++	+	+
	Epikard	-	-	-	-	++	++	+	+
Fragmentace svalových trabekul	Endokard	-	-	-	-	+	+	-	-
	Myokard	-	-	-	-	+	+	-	-
	Epikard	-	-	-	-	+	+	-	-
Přítomnost makrofágů/ žírných buněk	Endokard	-	-	-	-	+++	+++	++	++
	Myokard	-	-	-	-	+++	+++	++	++
	Epikard	-	-	-	-	+++	+++	++	++

V histopatologické analýze experimentu byla k hodnocení použita následující barviva: H-E a Goldnerův zelený trichrom pro světelnou mikroskopii, toluidinová modř pro transmisní elektronovou mikroskopii.

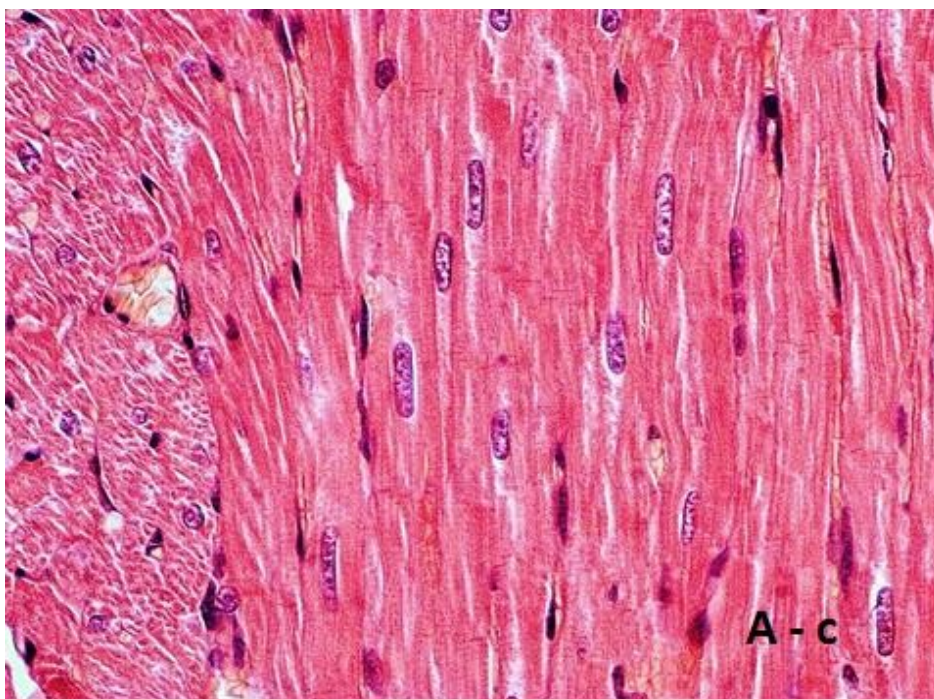
Ve světelné mikroskopii bylo u preparátů ze skupin SB2,3; SB4,6; Ru11,5 a Ru46 možné pozorovat fyziologickou strukturu tkáně – viz obrázky 11 (přehledný řez stěnou myokardu), 12 (oblast od endokardu k epikardu), 13 (detail příčného řezu myokardu).



Obr. 11: Přehledové zobrazení myokardu (SB2,3), H-E barvení, zv. 40x

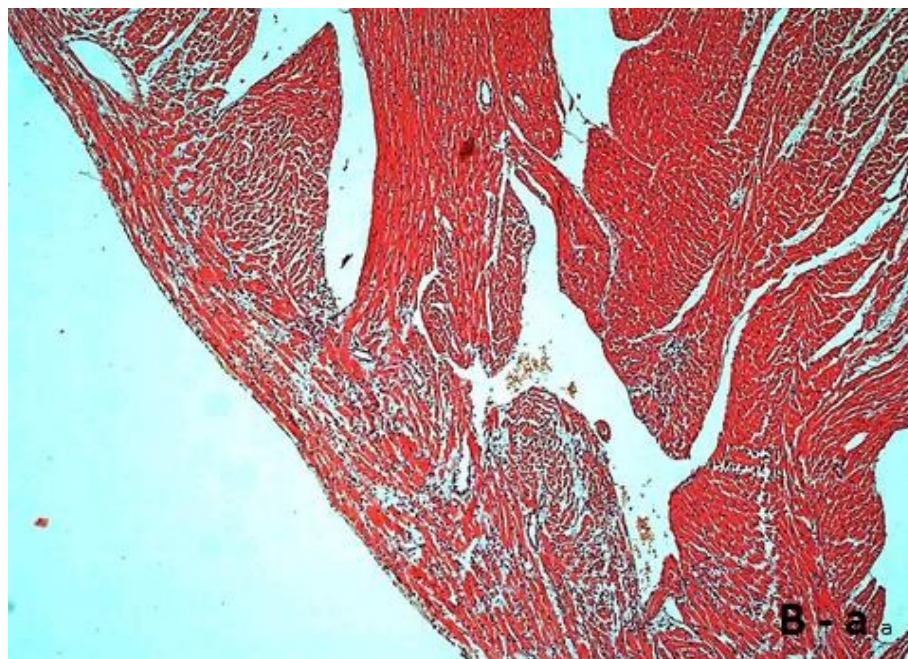


Obr. 12: Myokard (Ru11,5), H-E barvení, zv. 100x



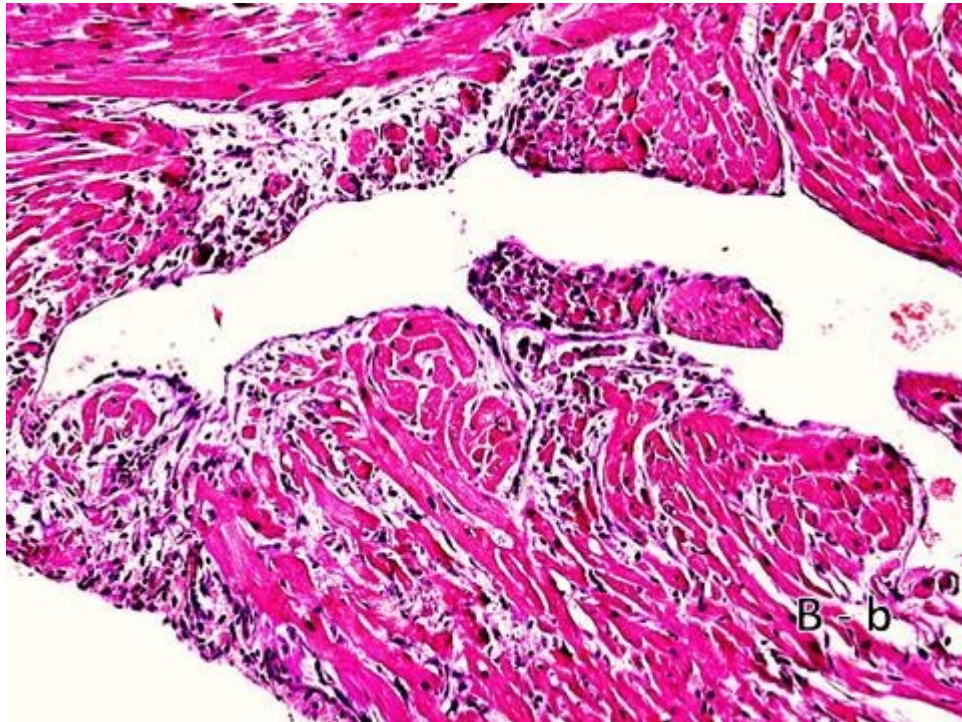
Obr. 13: Myokard (Ru46), H-E barvení, zv. 400x

U skupin Ru11,5+ISO, Ru46+ISO nalézáme oproti čistě ISO skupinám tyto změny: lokální kapilární hyperémie, mírný otok intersticia spolu s dilatací, otok kardiomyocytů, a menší infiltrát zánětlivých buněk. Nalézt je můžeme zejména v endokardu, ale částečně i v perikardu (viz obr. 14, 15 - , 16).

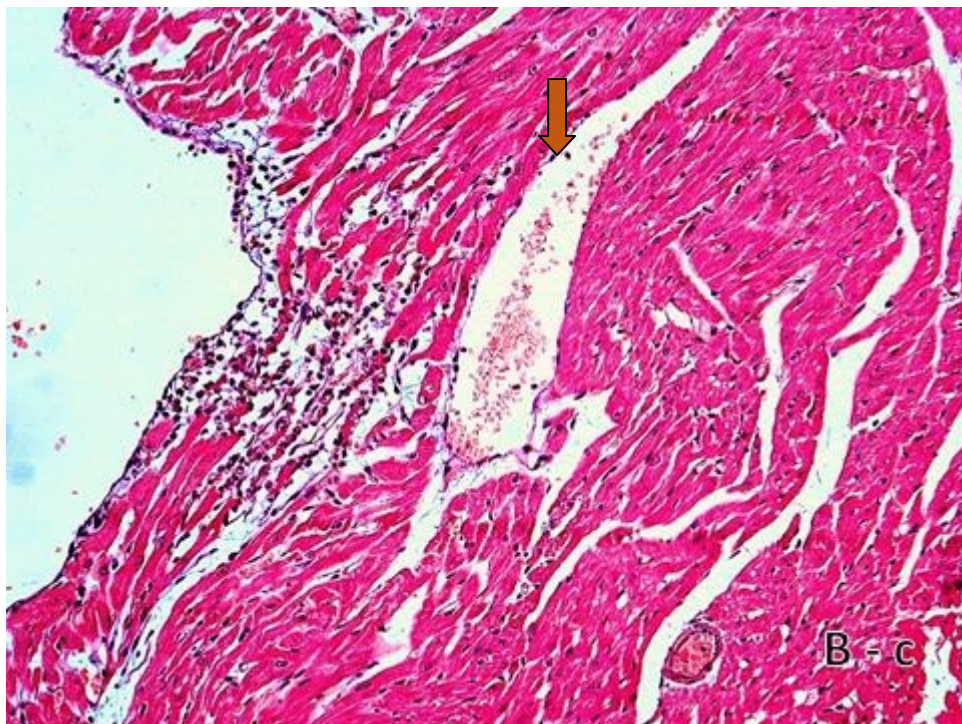


Obr. 14: Přehledový řez stěnou myokardu (Ru46+ISO), Goldnerův zelený trichrom, zv.

100x



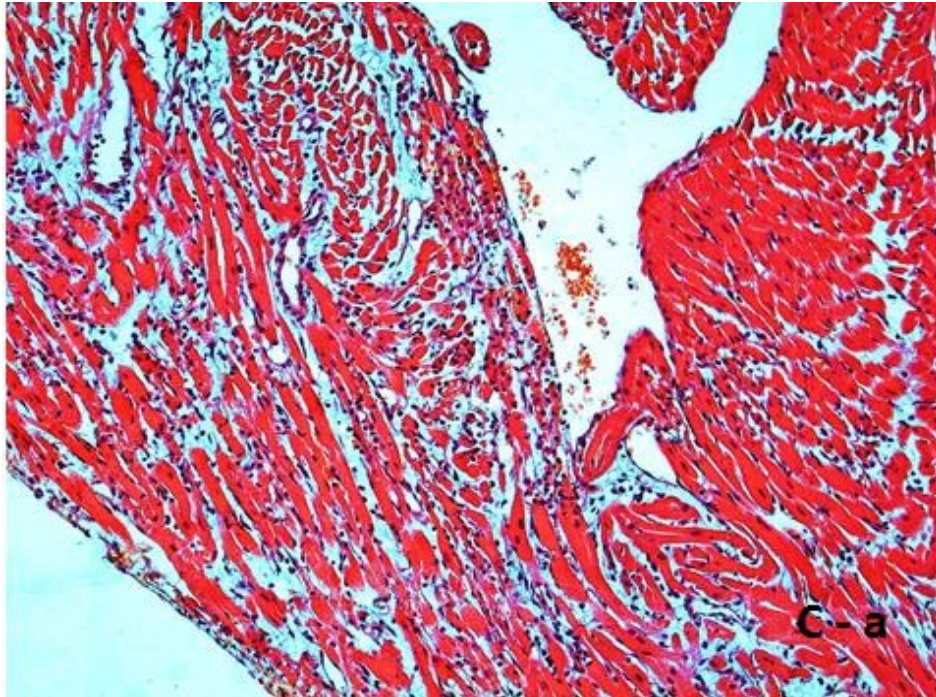
Obr. 15: Endokard (Ru46+ISO), H-E barvení, zv. 200x



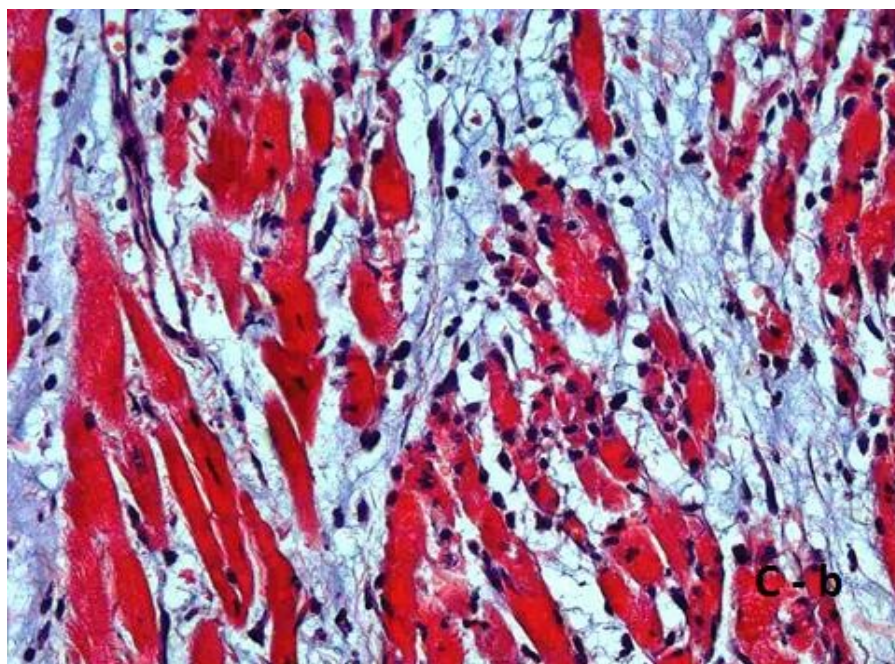
Obr. 16: Myokard a endokard (Ru11,5+ISO), Goldnerův zelený trichrom, zv. 200x; hnědá šipka – dilatovaná céva

Ve všech částech tkáně se nacházel masivní zánětlivý infiltrát (viz obr. 17, 18, 19). Při větším zvětšení bylo možné pozorovat velké množství fagocytů a mastocytů spolu

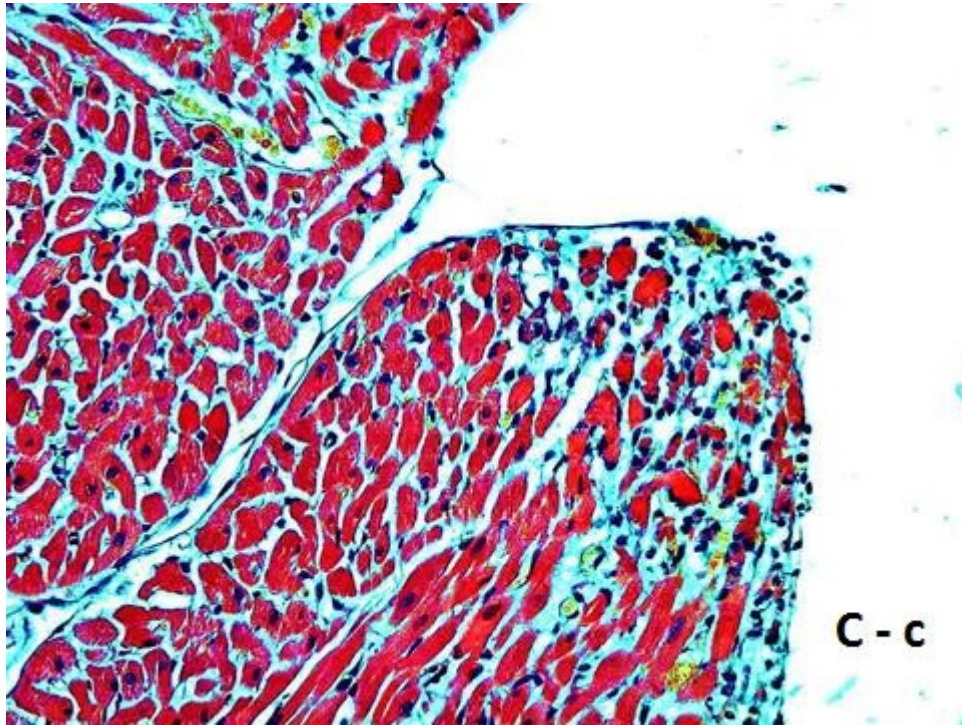
s významným intersticiálním edémem. Přítomna byla rovněž fokální ložiska nekrotických kardiomyocytů. U obou skupin Ru11,5+ISO a Ru46+ISO se tedy vyskytovala markantní alterace srdeční tkáně. Rozdíl mezi odlišnými koncentracemi rutinu nebyl patrný, avšak ve srovnání s kontrolními ISO skupinami došlo k mírnému zlepšení.



Obr. 17: Stěna myokardu (Ru11,5+ISO), Goldnerův zelený trichrom, zv. 100x

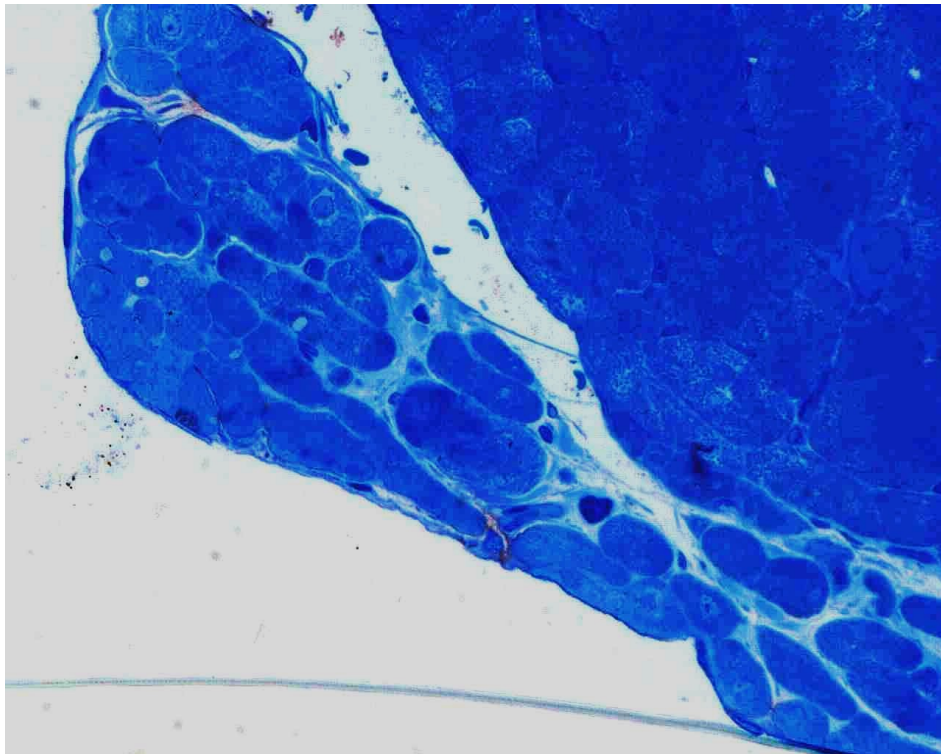


Obr. 18: Myokard (Ru46+ISO), Goldnerův zelený trichrom, zv. 200x

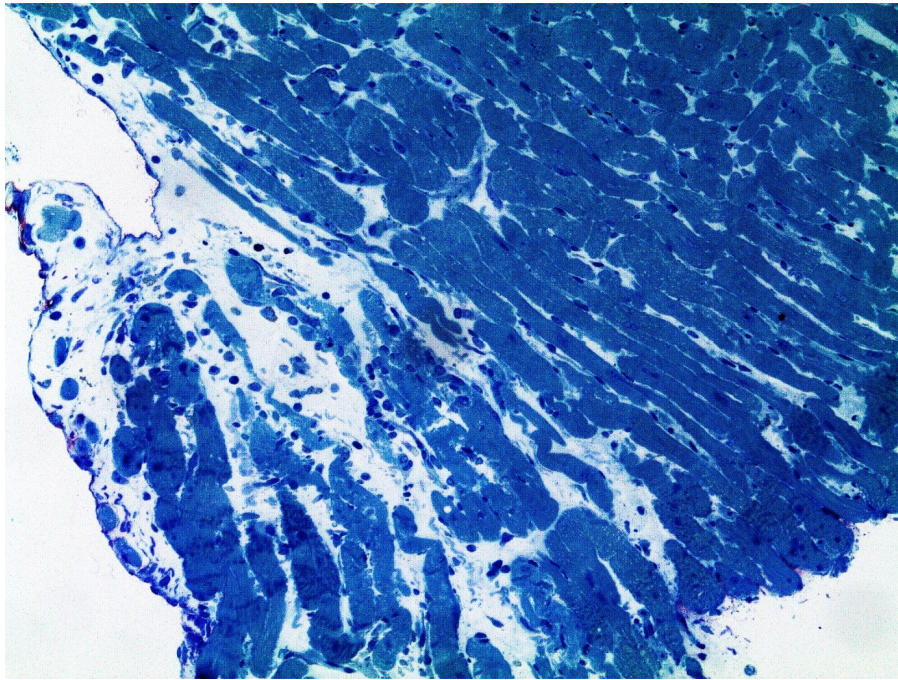


Obr. 19: Endokard (Ru11,5+ISO), Goldnerův zelený trichrom, zv. 200x

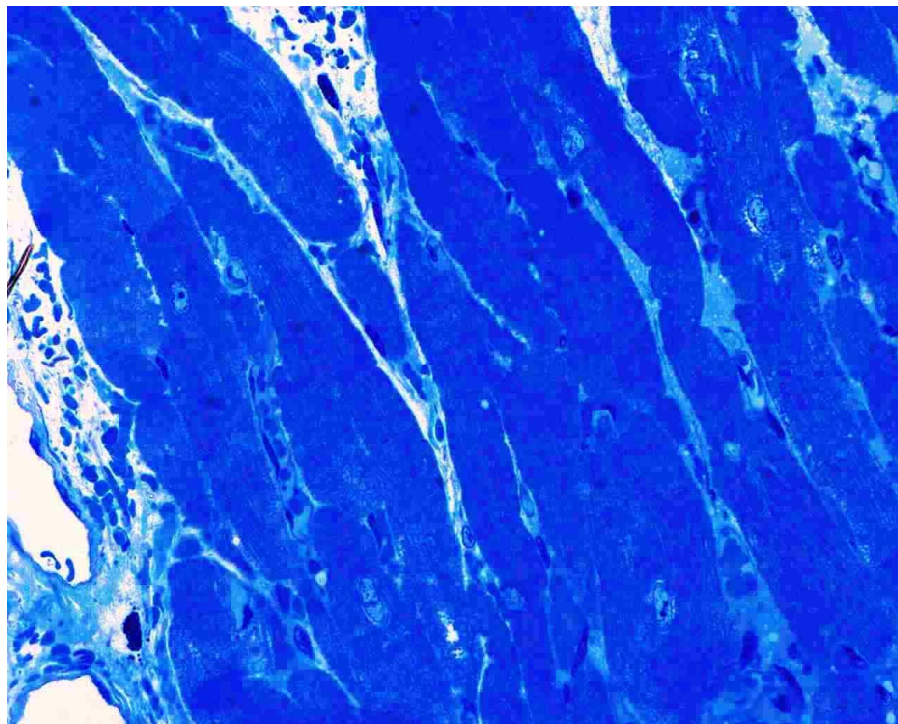
Níže jsou uvedeny snímky barvené toluidinovou modří, jež nám poskytují lepší rozlišení změn v srdečních komorách experimentálních potkanů.



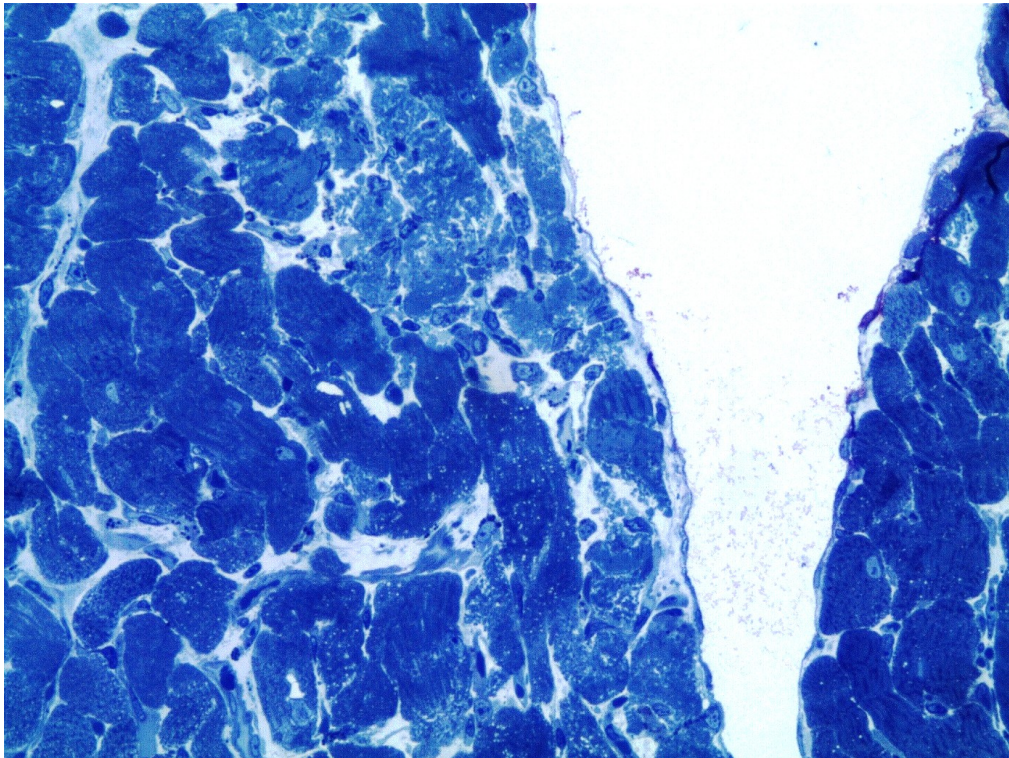
Obr. 20: Endokard a myokard (SB2,3), toluidinová modř, zv. 400x



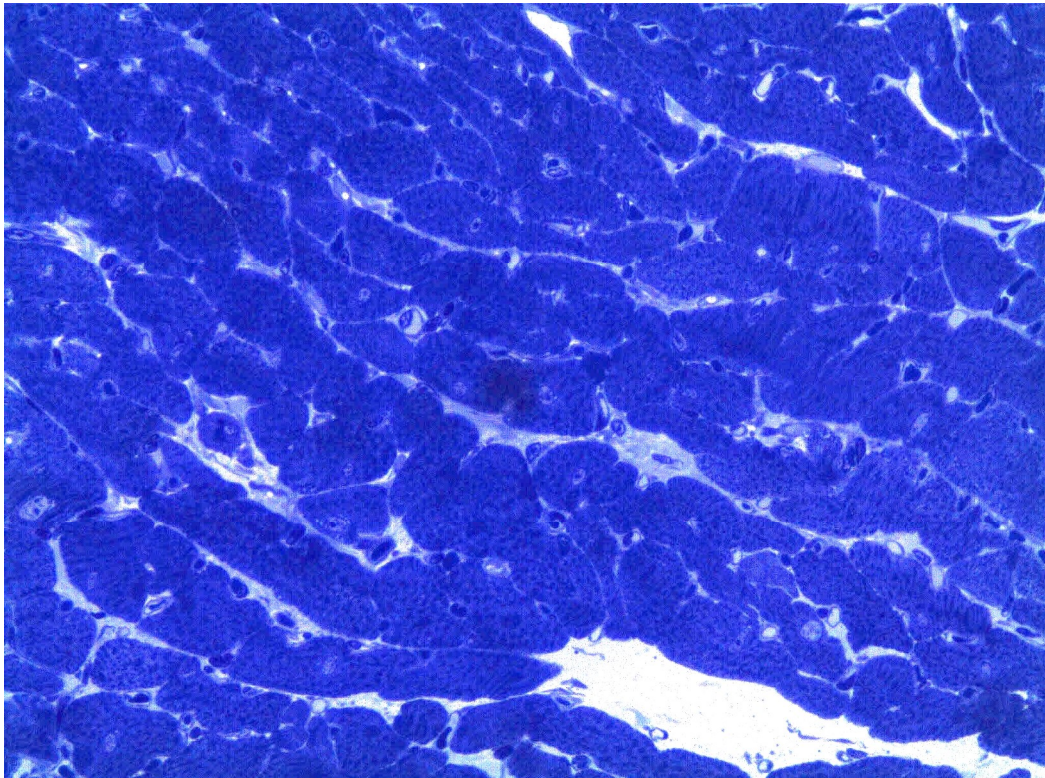
Obr. 21: Endokard a myokard (SB4,6+ISO), toluidinová modř, zv. 100x



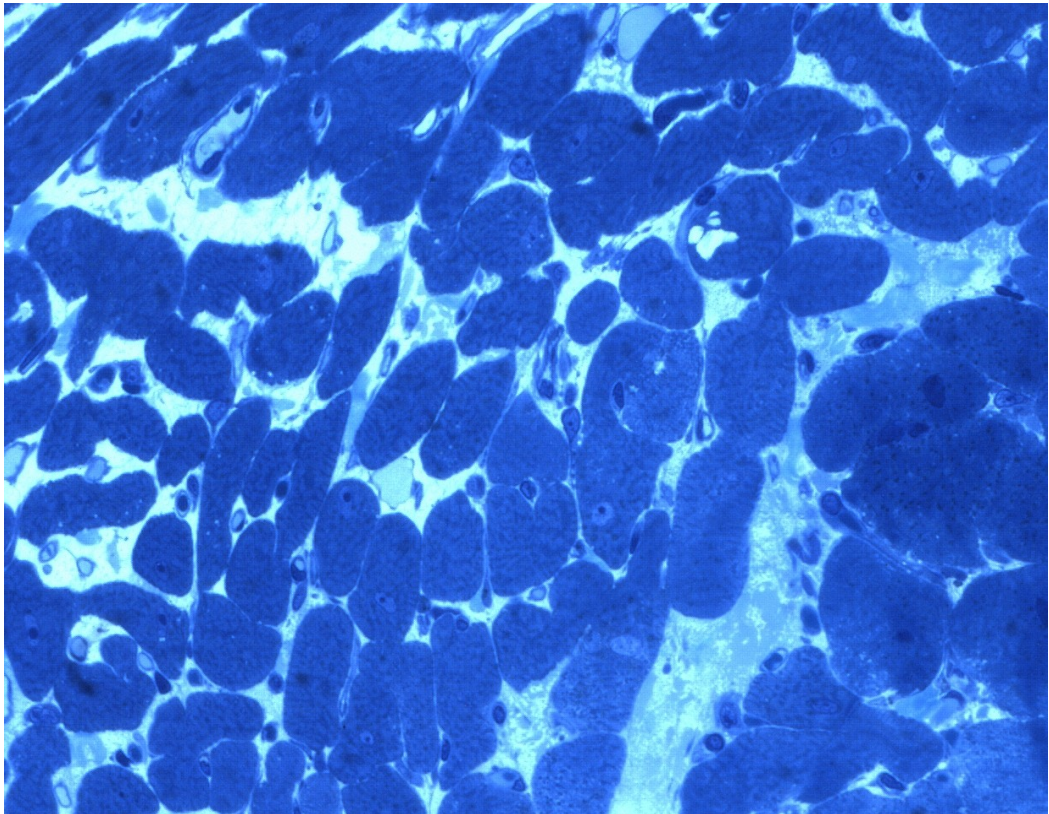
Obr. 22: Endokard a myokard (Ru46+ISO), toluidinová modř, zv. 200x



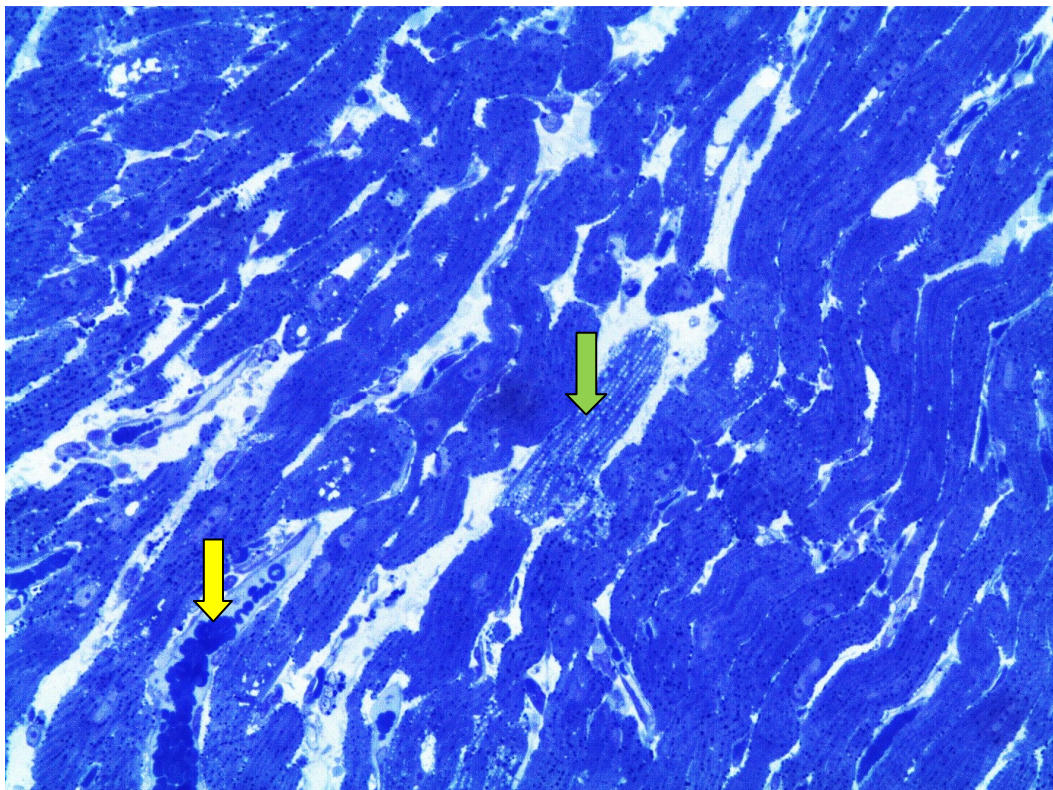
Obr. 23: Endokard a myokard (Ru11,5+ISO), toluidinová modř, zv. 200x



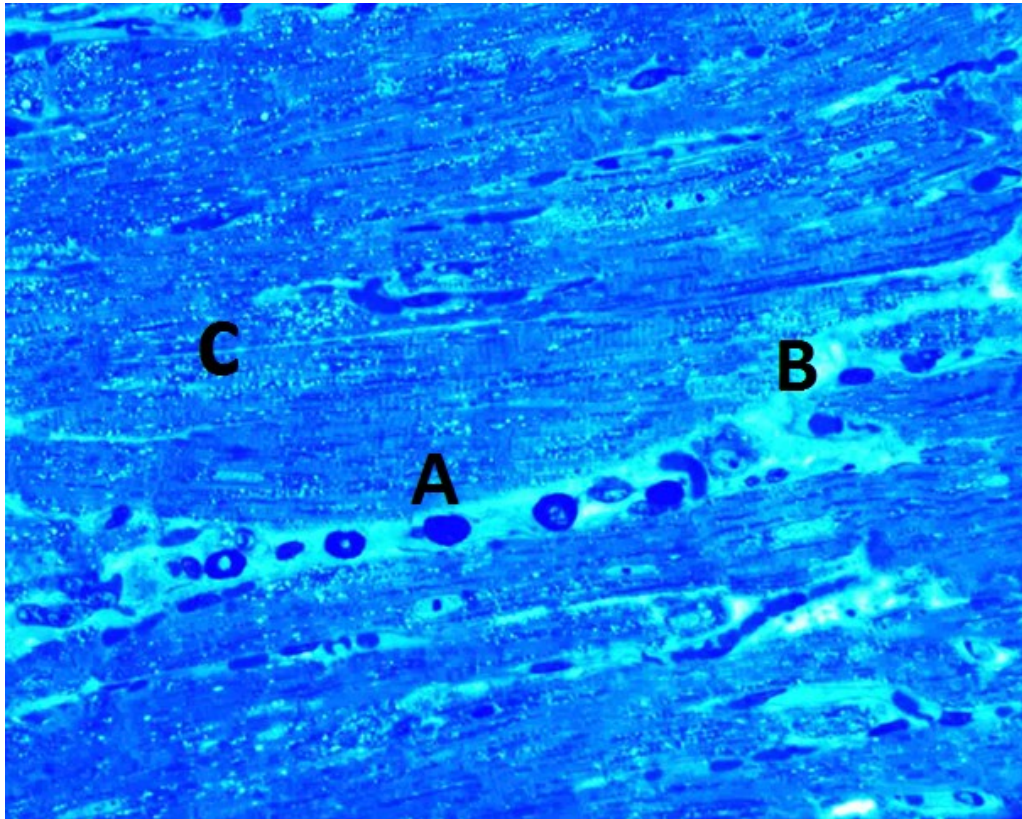
Obr. 24: Myokard (SB4,6), toluidinová modř, zv. 200x



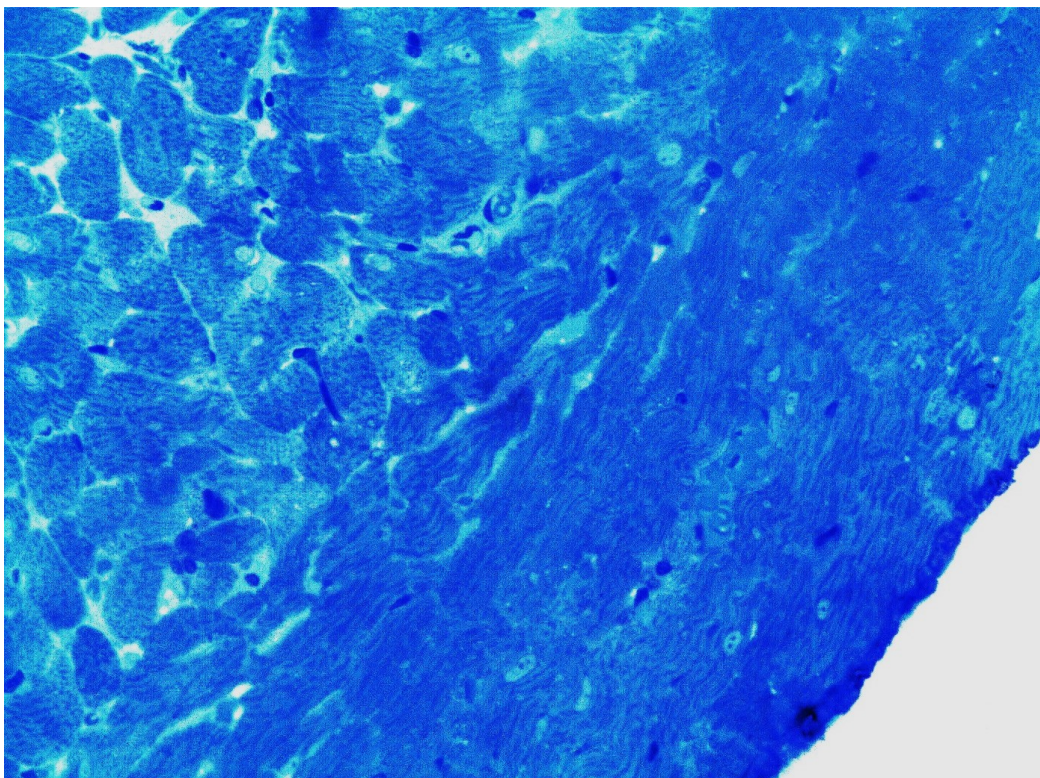
Obr. 25: Myokard (SB4,6+ISO), toluidinová modř, zv. 200x



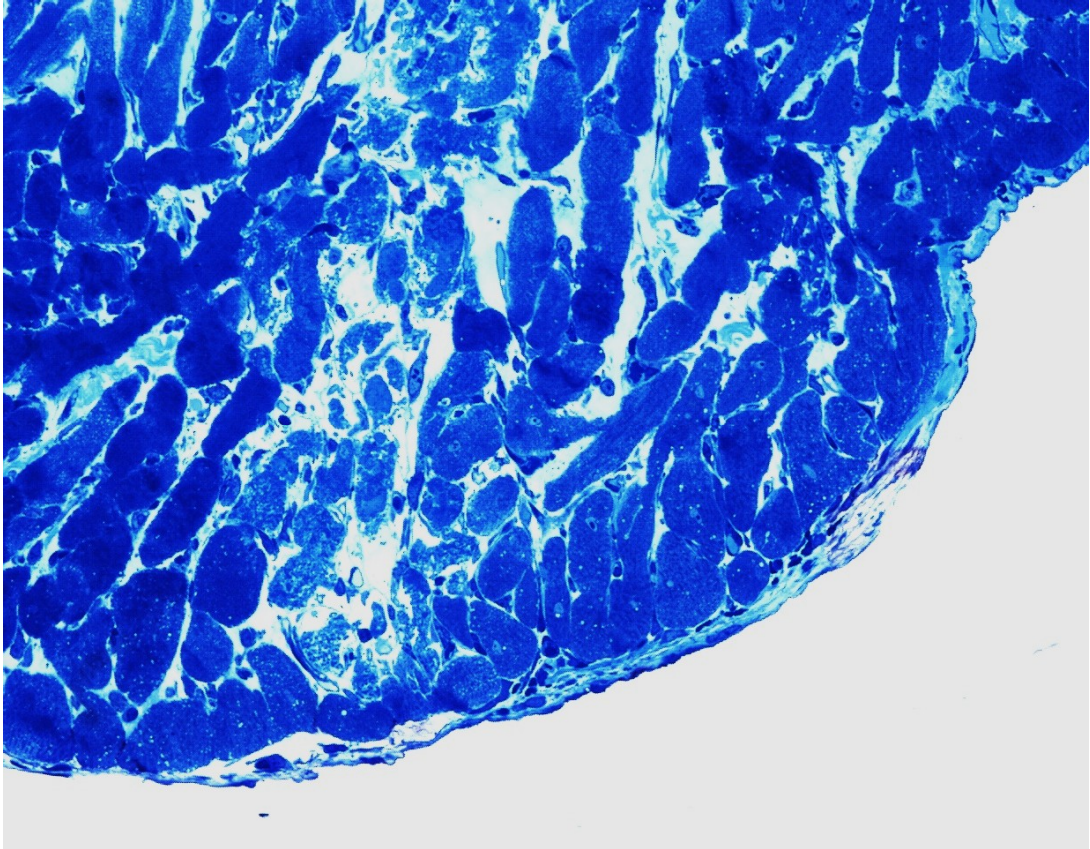
Obr. 26: Myokard (Ru11,5+ISO), toluidinová modř, zv. 200x; žlutá šipka - cévní trombus



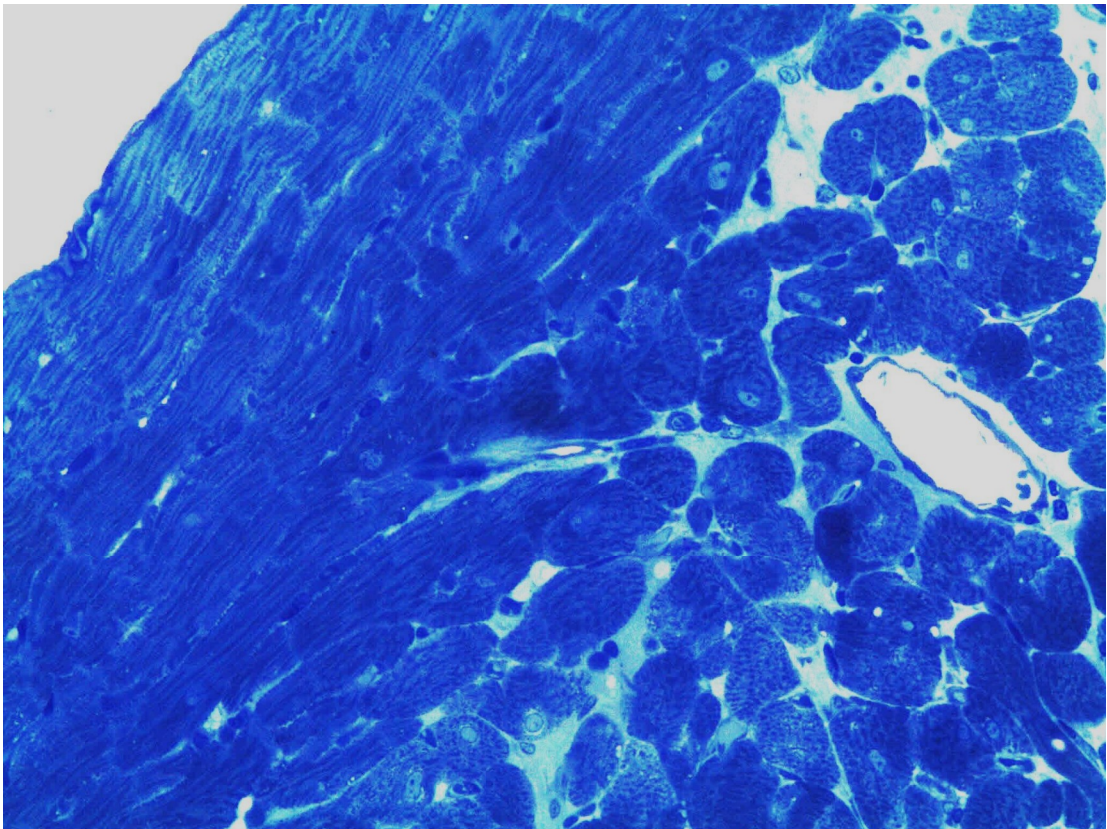
Obr. 27: Myokard (SB4,6+ISO), toluidinová modř, zv. 400x; A - mastocyt, B – makrofág,
C – nekrotický kardiomyocyt



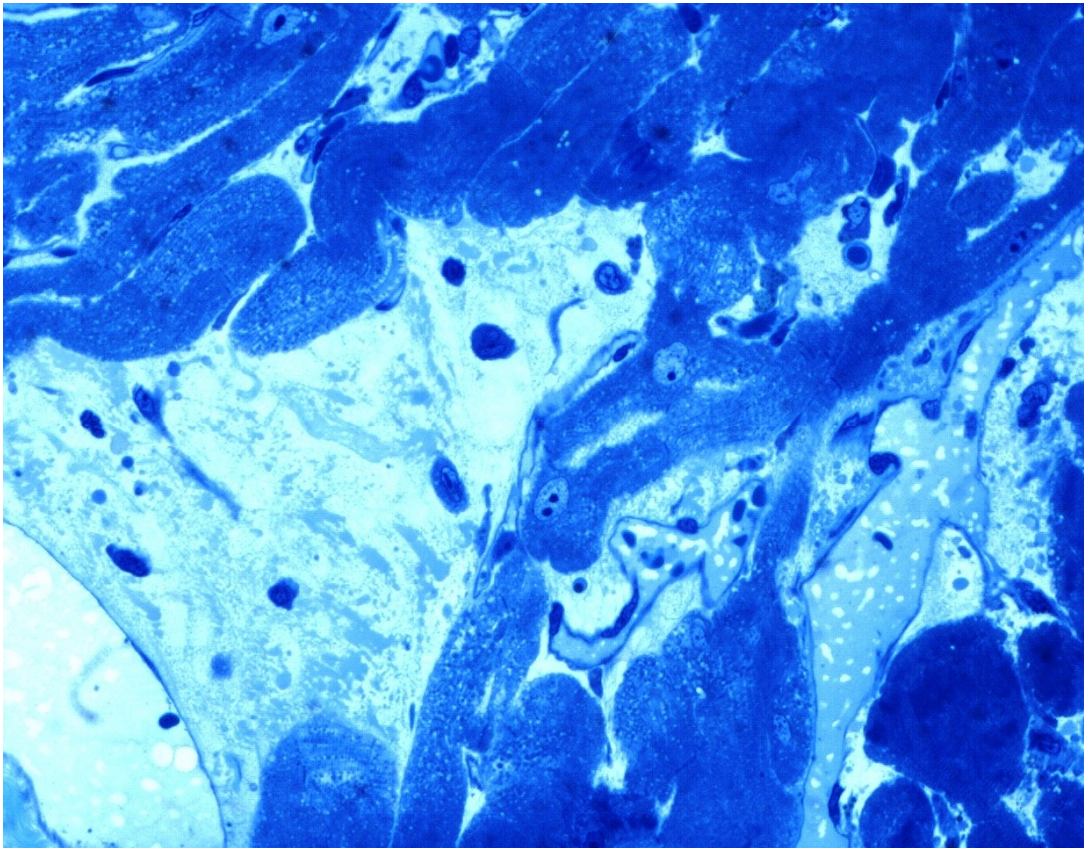
Obr. 28: Epikard a myokard (Ru11,5), toluidinová modř, zv. 200x



Obr. 29: Epikard a myokard (SB4,6+ISO), toluidinová modř, zv. 100x



Obr. 30: Epikard a myokard (Ru11,5+ISO), toluidinová modř, zv. 200x



Obr. 31: Endokard a myokard (Ru11,5+ISO), toluidinová modř, zv. 400x

7 DISKUZE

I přes současný pokrok v medicíně a farmacii patří kardiovaskulární choroby mezi jednu z nejčastějších příčin úmrtí ve vyspělých zemích. Z tohoto důvodu probíhá neustále výzkum, jenž se zaměřuje na prevenci těchto chorob, a případnou minimalizaci poškození lidského organismu.

K bádání v oblasti kardioprotektivních účinků flavonoidů jsou často využívány potkaní modely, na nichž je vyvolávána ischemie buď chirurgicky, anebo podáním ISO. [33, 34 43, 44, 47] V tomto experimentu byl pozorován vliv vybraných flavonoidů, tedy quercetinu a rutinu, na ischemickou remodelaci srdeční tkáně vyvolanou právě ISO (100 mg/kg). Změny jsme pozorovali ve všech stavebních částech myokardu – endokardu, myokardu a epikardu.

Histologická analýza ISO skupin nepremedikovaných flavonoidy vykazala tyto výsledky v porovnání s kontrolními skupinami: středně významná kapilární hyperémie, středně významný intersticiální otok s dilatací, středně významný otok pojivových vláken, mírná nekróza kardiomyocytů, mírná fragmentace myofibril, málo významná fragmentace svalových vláken, a středně významný zánětlivý infiltrát. Histologický obraz čistě ISO skupin byl v obou pokusech podobný.

Kostinková ve své diplomové práci, jež probíhala na stejném pracovišti jako tato diplomová práce, srovnávala histologické změny myokardu po aplikaci ISO (jednorázově 100 mg/kg, 24 hodin) s kontrolami, jimž ISO podán nebyl. Z histologických změn byly pozorovány dilatace intersticiálních prostorů s leukocytárním infiltrátem, edémem intersticia a překrvení cév. Dále byla přítomna fragmentace buněk myokardu, mizení jader, a fragmentace myofibril. Všechny tyto popsané změny jsou obdobné těm, jež byly zaznamenány v této práci. [47]

Po premedikaci rutinem bylo u ISO navozené kardiotoxicity pozorováno v porovnání s kontrolními skupinami malé až mírné zlepšení histologického obrazu. Nebyla přítomna fragmentace svalových trabekul a fragmentace myofibril byla ve všech stavebních částech myokardu málo významná. Mírně významná byla zánětlivá infiltrace v endokardu, myokardu, i epikardu. Mírné zlepšení nastalo u místní kapilární

hyperémie, intersticiálního otoku s dilatací, i otoku pojivových vláken v oblasti myokardu. V endokardu a perikardu byl úbytek těchto tří ukazatelů kardiotoxického poškození jen málo patrný. Nekrotizace kardiomyocytů byla přítomna v myokardu jen minimálně, avšak v endokardu a perikardu byla již málo významná.

Prince a Priya ve svém experimentu s rutinem (80 mg/kg po 42 dnů) popsali jeho jednoznačně pozitivní vliv na histopatologickou přestavbu vyvolanou ISO (dvakrát 100 mg/kg, 48 hodin). Ve srovnání s kontrolní skupinou byla u skupiny, jíž byl podán rutin a ISO, přítomna svalová vlákna normální bez nekrózy. Nebyla pozorována separace svazků svalových vláken a přítomen byl jen mírný infiltrát zánětlivých buněk. Doba působení ISO je v tomto experimentu delší a intenzivnější než v této práci, což mohlo ovlivnit závažnost změn vyvolaných ISO. [43]

Ve studii Li et al. bylo pozorováno zmírnění histologických změn při premedikaci rutinem (25 mg/kg a 50 mg/kg po dobu 21 dnů). U skupin, jimž byl podán ISO (15 mg/kg, jednorázově na počátku experimentu) a rutin, nastalo ve srovnání s ISO skupinou výrazné zlepšení histologického obrazu. Byl popsán úbytek nekrózy subendokardu, dilatace kapilár, a leukocytárního infiltrátu. Změny byly podobné u obou koncentrací rutinu. V jejich experimentálním nastavení byl pozorován vliv rutinu na ISO navozenou kardiotoxicitu, jež trvala sice delší dobu, avšak byla použita menší dávka ISO. [44]

Ve srovnání s předcházejícími studiemi [43, 44] byla v našem experimentu zvolena kratší doba premedikace (7 dní), v níž byly podávány malé (11,5 mg/kg) a střední (46 mg/kg) dávky rutinu. Histologické analýze v těchto studiích nebylo věnováno tolik prostoru, avšak i v nich jsou potvrzeny ochranné účinky rutinu na ISO vyvolanou kardiotoxicitu.

Po premedikaci quercetinem (10 mg/kg p.o., 7 dní) vyvolal ISO ve všech částech myokardu podobné histologické změny jako ve skupině, jíž quercetin podán nebyl. V porovnání s kontrolní skupinou nález zahrnoval středně mírnou nekrózu kardiomyocytů, mírnou fragmentaci myofibril, významný intersticiální otok s dilatací, středně významnou kapilární hyperémii, středně významný leukocytární infiltrát, málo významnou fragmentaci svalových vláken, a středně významný otok pojivových vláken.

Na druhé straně skupina Zaafan et al. popsala zlepšení histologického obrazu po preventivním podání quercetinu (50 mg/kg p.o., 14 dní) před aplikací ISO (100 mg/kg s.c. jednorázové, působení 48 hodin). Ve srovnání s kontrolní ISO skupinou došlo u quercetinem premedikované skupiny k výraznému úbytku oblastí s nekrotickými buňkami, edémem intersticia a infiltrátem zánětlivých buněk. V jejich studii byli potkani vystaveni působení ISO, nežli tomu bylo v této práci. Premedikace quercetinem se lišila jak časem, tak velikostí dávky. [33]

Panda a Kar podávali potkanům quercetin v dávce 10 mg/kg p.o. po dobu 14 dnů. ISO byl aplikován v dávce 100 mg/kg s.c. a potkani byli jeho působení vystaveni po dobu 48 hodin. Zde bylo při premedikaci quercetinem ve srovnání s pouze ISO skupinou pozorováno zlepšení histologického obrazu. Snížily se jak stupeň nekrózy, tak zánětlivá infiltrace. V této studii byla hladina quercetinu zvolena podobná jako v našem experimentu, ale zde byly pozorovány ochranné účinky quercetinu na histologické změny navozené podáním ISO. [34]

V našem pokuse s quercetinem jsme se rozhodli doplnit histologické nálezy i o ty biochemické a hemodynamické. Aplikace ISO byla zde schopna ovlivnit, oproti kontrolní skupině, srdeční frekvenci (zrychlení), ejekční frakci (pokles o cca 20%), EKG (zvýšení spoje QRS-T), a cTnT (významný nárůst). Hladiny vitamínu C a MDA zůstaly beze změny. Vzrostla i vlhká hmotnost komor.

Skupina, jež byla před aplikací ISO premedikována quercetinem, vykazala podobné změny. Ze získaných výsledků usuzujeme, že tato substance nebyla schopna v našem nastavení pokusu ovlivnit ani biochemické, ani hemodynamické markery kardiotoxického poškození. Podle údajů získaných z předchozích studií [33, 34, 35] bylo možné očekávat, že quercetin by mohl být schopen zmírnit uvedené hemodynamické i biochemické známky kardiotoxicity. Odlišné výsledky z našeho pokusu bychom pravděpodobně mohli přičíst na vrub kratší době premedikace quercetinem, případně i faktu, že změny navozené ISO byly zaznamenávány po kratší dobu - v průběhu 24 hodin.

Ve všech předcházejících analýzách byl tedy kardioprotektivní účinek flavonoidů více patrný, nežli v našich experimentech. To je pravděpodobně způsobeno delší dobou

premedikace těchto látek v porovnání s naší studií. Svou roli může sehrávat i kratší doba působení ISO (24 hodin) v našem pokusu.

ZÁVĚR

Histologická analýza potvrdila, že isoprenalin v dávce 100 mg/kg je schopen po 24 hodinách vyvolat patologický obraz myokardu připomínající AMI. Ve srovnání s kontrolními skupinami bylo v celém myokardu přítomno středně významné překrvení kapilár, středně významná dilatace intersticiálních prostorů včetně jejich edému, středně významný otok vláken pojiva, mírně významné nekrotické změny kardiomyocytů, mírná fragmentace myofibril, malá fragmentace svalových trabekul, a středně významný leukocytární infiltrát.

U skupin potkanů, jimž byl aplikován rutin (11,5 mg/kg a 46 mg/kg po 7 dní), nastalo ve srovnání s histologickým ISO obrazem málo významné zlepšení morfologických změn. Například málo patrné zlepšení bylo pozorováno u místní kapilární hyperémie, intersticiálního otoku s dilatací, i otoku pojivových vláken. Nekrotizace kardiomyocytů byla jen málo významná. Nenastala fragmentace svalových trabekul a fragmentace myofibril byla jen málo přítomná. Zánětlivá infiltrace byla mírně významná. Při našem nastavení pokusu nebyl pozorován rozdíl mezi nižší a vyšší dávkou podaného rutinu.

Na druhé straně u potkanů, jimž byl před aplikací ISO podáván quercetin (10 mg/kg po 7 dní), nenastaly žádné změny histologického obrazu (viz výše).

V pokusu s quercetinem byly rovněž změřeny vybrané hemodynamické parametry (EKG, krevní tlak, srdeční frekvence, ejekční frakce, diastolická izovolemická relaxace, end-diastolický tlak levé komory). Předchozí aplikace této substance neměla na zmíněné parametry žádný vliv, s výjimkou end-diastolického levé komory, na němž byl protektivní účinek patrný. Quercetin však celkově nebyl schopen ovlivnit hemodynamické změny vyvolané ISO.

Rovněž byly stanoveny biochemické markery laboratorních potkanů, jimž byl podáván quercetin. Po injekci ISO došlo oproti kontrolním skupinám k významnému zvýšení hladiny cTnT, avšak beze změn zůstaly hladiny vitamínu C, vitamínu E, a MDA. Také byl pozorován významný nárůst vlhké hmotnosti komor. Premedikace quercetinem neovlivnila žádný z těchto parametrů, a neprokázaly se tedy jeho kardioprotektivní vlastnosti.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Strukturní vzorec ISO	25
Obr. 2: Strukturní vzorec quercetinu	30
Obr. 3: Strukturní vzorec rutinu	33
Obr. 4: Přehledový snímek myokardu (kontrola), barvení H-E, zv. 100x	50
Obr. 5: Myokard (ISO), barvení H-E, zv. 100x	51
Obr. 6: Myokard (Q+ISO), barvení H-E, zv. 100x.....	51
Obr. 7: Endokard a myokard (ISO), barvení H-E, zv. 100x	52
Obr. 8: Endokard a myokard (Q+ISO), barvení H-E, zv. 100x	52
Obr. 9: Epikard a myokard (Q+ISO), barvení H-E, zv. 100x.....	53
Obr. 10: Epikard a myokard (Q+ISO), barvení H-E, zv. 100x.....	53
Obr. 11: Přehledové zobrazení myokardu (SB2,3), H-E barvení, zv. 40x	57
Obr. 12: Myokard (Ru11,5), H-E barvení, zv. 100x.....	57
Obr. 13: Myokard (Ru46), H-E barvení, zv. 400x.....	58
Obr. 14: Přehledový řez stěnou myokardu (Ru46+ISO), Goldnerův zelený trichrom, zv. 100x	58
Obr. 15: Endokard (Ru46+ISO), H-E barvení, zv. 200x.....	59
Obr. 16: Myokard a endokard (Ru11,5+ISO), Goldnerův zelený trichrom, zv. 200x	59
Obr. 17: Stěna myokardu (Ru11,5+ISO), Goldnerův zelený trichrom, zv. 100x	60
Obr. 18: Myokard (Ru46+ISO), Goldnerův zelený trichrom, zv. 200x.....	60
Obr. 19: Endokard (Ru11,5+ISO), Goldnerův zelený trichrom, zv. 200x.....	61
Obr. 20: Endokard a myokard (SB2,3), toluidinová modř, zv. 400x.....	61
Obr. 21: Endokard a myokard (SB4,6+ISO), toluidinová modř, zv. 100x.....	62
Obr. 22: Endokard a myokard (Ru46+ISO), toluidinová modř, zv. 200x	62
Obr. 23: Endokard a myokard (Ru11,5+ISO), toluidinová modř, zv. 200x	63

Obr. 24: Myokard (SB4,6), toluidinová modř, zv. 200x	63
Obr. 25: Myokard (SB4,6+ISO), toluidinová modř, zv. 200x.....	64
Obr. 26: Myokard (Ru11,5+ISO), toluidinová modř, zv. 200x.....	64
Obr. 27: Myokard (SB4,6+ISO), toluidinová modř, zv. 400x.....	65
Obr. 28: Epikard a myokard (Ru11,5), toluidinová modř, zv. 200x.....	65
Obr. 29: Epikard a myokard (SB4,6+ISO), toluidinová modř, zv. 100x.....	66
Obr. 30: Epikard a myokard (Ru11,5+ISO), toluidinová modř, zv. 200x	66
Obr. 31: Endokard a myokard (Ru11,5+ISO), toluidinová modř, zv. 400x	67

SEZNAM GRAFŮ A TABULEK

Graf 1: Hladina cTnT v krevním séru	55
Graf 2: Vlhká hmotnost komor	55
Tab. 1: Odvodňování vzorku fixovaného ve studeném 10% formalinu	38
Tab. 2: Postup odparafinování.....	33
Tab. 3: Složení roztoku Hematoxylin Hill	40
Tab. 4: Barvení H-E	40
Tab. 5: Příprava roztoku Goldner I	42
Tab. 6: Příprava roztoku Goldner III	42
Tab. 7: Semikvantitativní hodnocení histopatologických změn endokardu, myokardu a epikardu Q	49
Tab. 8: Semikvantitativní hodnocení histopatologických změn endokardu, myokardu a epikardu Ru	56

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Štejfa, Miloš a spolupracovníci. *Kardiologie*. 3., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, a. s. 2007. 721 stran. ISBN 978-80-247-1385-4. Kapitola 19.3: Myokardiální složka – ischemie, nekróza, reperfuze, s. 476-478.
- [2] Šteiner, Ivo. *Kardiopatologie pro patology i kardiology*. První vydání. Praha: Galén 2010. 125 stran. ISBN 978-80-7262-672-4. Kapitola 3.2.2: Infarkt myokardu, s. 28-30.
- [3] Ansley, David M. - Wang, Baohua. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *The Journal of Pathology*, 2013, 229(2), s. 232-241.
- [4] Kehl, Devin W. - Iqbal, Navaid - Fard, Arrash - Kipper, Ben A. - Parra Landa, Alejandro de la - Maisel, Alan S. Biomarkers in acute myocardial injury. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2012, 159 (4), s. 252-264.
- [5] Janota, Tomáš. Biochemické markery nekrózy myokardu v současné klinické praxi. *Intervenční a akutní kardiologie*, 2013, 12(1), s. 28-33.
- [6] Dušek, Jaroslav - Chek, James L. - Štásek, Josef - Bis, Josef - Vašatová, Martina - Vojáček, Jan. Markery myokardiální ischemie: slepá ulička nebo budoucnost laboratorní diagnostiky v kardiologii? *Intervenční a akutní kardiologie*, 2010, 9 (4), s. 190-194.
- [7] Aldous, Sally J. Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 2013, 164, s. 282-294.
- [8] Exner, R. - Wessner, B. - Manhart, N. - Roth, E. Therapeutic potential of glutathione. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 2000, 112(14), s. 610-616.
- [9] Roth, Erich - Oehler, Rudolf - Manhart, Nicole - Exner, Ruth - Wessner, Barbara - Strasser, Eva - Spittler, Andreas. Regulative potential of glutamine - relation to glutathione metabolism. *Nutrition*, 2002-03-01, 18(3), s. 217-221.
- [10] Collins, J. M. - McDevitt, D. G. - Shanks, R. G. - Swanton, J. G. The cardio-toxicity of isoprenaline during hypoxia. *British Journal of Pharmacology*, 1969, 36(1), s. 35-45.

- [11] Mladěnka, Přemysl - Hrdina, Radomír - Bobrovová, Zuzana - Semecký, Vladimír - Vávrová, Jaroslava - Holečková, Magdaléna - Palička, Vladimír - Mazurová, Yvona - Nachtigal, Petr. Cardiac biomarkers in a model of acute catecholamine cardiotoxicity. *Human & Experimental Toxicology*, 2009, 28(10), s. 631–40.
- [12] *National Library of Medicine. Isoproterenol. CID 3779* [online]. [citováno 20. 1. 2015]. Dostupné z: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/isoproterenol#section=Experimental-Properties>
- [13] Vítovec, J. - Špinar, J. a kolektiv. Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění. Vydání 2., přepracované a doplněné. Praha: Grada, 2004. 248 stran. ISBN 80-247-0866-3. Kapitola 9.3.2: Isoprenalin., s. 119.
- [14] Nichtova, Zuzana - Novotova, Marta - Kralova, Eva - Stankovicova, Tatiana. Morphological and functional characteristics of models of experimental myocardial injury induced by isoproterenol. *General Physiology and Biophysics*, 2012, 31(2), s. 141–51.
- [15] Grimm, D. - Elsner, D. - Schunkert, H. - Pfeifer, M. - Griese, D. - Bruckschlegel, G. - Muders, F. - Riegger, G. A. - Kromer, E. P. Development of heart failure following isoproterenol administration in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Cardiovascular Research*, 1998, 37(1), s. 91–100.
- [16] Pick, R. - Jalil, J. E. - Janicki, J. S. - Weber, K. T. The fibrillar nature and structure of isoproterenol-induced myocardial fibrosis in the rat. *The American Journal of Pathology*, 1989, 134(2), s. 365–71.
- [17] Mladěnka, Přemysl - Zatloukalová, Libuše - Šimůnek, Tomáš - Bobrovová, Zuzana - Semecký, Vladimír - Nachtigal, Petr - Hasková, Pavlína. Direct administration of rutin does not protect against catecholamine cardiotoxicity. *Toxicology*, 2009, 255(1–2), s. 25–32.
- [18] Priscilla, D. Hansi - Prince, P. Stanely Mainzen. Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infarction in Wistar rats. *Chemico-Biological Interactions*, 2009, 179(2–3), s. 118–24.

- [19] Vorderwinkler, K. P. - Mair, J. - Puschendorf, B. - Hempel, A. - Schlüter, K. D. - Piper, H. M. Cardiac troponin I increases in parallel to cardiac troponin T, creatine kinase and lactate dehydrogenase in effluents from isolated perfused rat hearts after hypoxia-reoxygenation-induced myocardial injury. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 1996, 251(1), s. 113–17.
- [20] Rajadurai, M. – Stanely Mainzen Prince, P. Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: biochemical and histopathological evidences. *Toxicology*, 2006, 228(2–3), s. 259–68.
- [21] Heim, Kelly E. - Tagliaferro, Anthony R. - Bobilya, Dennis J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, 13, s. 572-584.
- [22] Havsteen, Bent H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 2002, 96, s. 67-202.
- [23] Kelly, Gregory S. Quercetin. Monograph. *Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic*, 2011, 16(2), s. 172–94.
- [24] Sikora D. Biologicky aktivní látky v rostlinách kotvičníku zemního [Biological active substance in puncturevine plants] [bakalářská práce dostupná z internetu]. Zlín (Česká republika): Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická; 2007 [citováno 17-01-2015]. Strana 32. Dostupné z: http://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/3958/sikora_2007_bp.pdf?sequence=1
- [25] Prince, Ponnian Stanely Mainzen - Sathya, Balakrishnan. Pretreatment with quercetin ameliorates lipids, lipoproteins and marker enzymes of lipid metabolism in isoproterenol treated cardiotoxic male Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 635(1–3), s. 142–48.
- [26] Brookes, Paul S. - Digerness, Stanley B. - Parks, Dale A. - Darley-Usmar, Victor. Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 32(11), s. 1220–1228.

- [27] Conquer, J. A. - Maiani, G. - Azzini, E. - Raguzzini, A. - Holub, B. J. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *The Journal of Nutrition*, 1998, 128(3), s. 593–97.
- [28] Sestili, P. - Guidarelli, A. - Dachà, M. - Cantoni, O. Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide: free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Radical Biology & Medicine*, 1998, 25(2), s. 196–200.
- [29] Mosawy, Sapha - Jackson, Denise E. - Woodman, Owen L. - Linden, Matthew D. The flavonols quercetin and 3',4'-dihydroxyflavonol reduce platelet function and delay thrombus formation in a model of type 1 diabetes. *Diabetes & Vascular Disease Research: Official Journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*, 2014, 11(3), s. 174–81.
- [30] Igarashi, K. - Ohmuma, M. Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1995, 59(4), s. 595–601.
- [31] Keli, S. O. - Hertog, M. G. - Feskens, E. J. - Kromhout, D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Archives of Internal Medicine*, 1996, 156(6), s. 637–42.
- [32] Punithavathi, V. R. - Prince, P. Stanely Mainzen. Pretreatment with a combination of quercetin and alpha-tocopherol ameliorates adenosine triphosphatases and lysosomal enzymes in myocardial infarcted rats. *Life Sciences*, 2010, 86(5–6), s. 178–84.
- [33] Zaafan, M. A. - Zaki H. F. - El-Brairy A. I. - Kenawy S. A. Protective effects of atorvastatin and quercetin on isoprenaline-induced myocardial infarction in rats. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 2013, 51, s. 35-41.
- [34] Panda, S. - Kar, A. Combined effects of vincristine and quercetin in reducing isoproterenol-induced cardiac necrosis in rats. *Cardiovascular Toxicology*, 2014, 24.

- [35] Punithavathi, V. R. - Prince S. M. The cardioprotective effects of a combination of quercetin and α -tocopherol on isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2011, 25(1), s. 28-40.
- [36] Štočková L. - Matějková E. - Janovská D. - Sýkorová S. Porovnání výsledků tří analytických metod pro stanovení obsahu rutinu v pohance tatarské. *Chemické listy*, 2009, 103, s. 827-831.
- [37] Chua, Lee Suan. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 150(3), s. 805–817.
- [38] Takahama, Umeo - Hirota, Sachiko. Deglucosidation of quercetin glucosides to the aglycone and formation of antifungal agents by peroxidase-dependent oxidation of quercetin on browning of onion scales. *Plant and Cell Physiology*, 2000, 41(9), s. 1021–1029.
- [39] Shen, Shing-Chuan - Lee, Woan-Ruoh - Lin, Hui-Yi - Huang, Ho-Chun - Ko, Ching-Huai - Yang, Ling-Ling - Chen, Yen-Chou. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E2 production. *European Journal of Pharmacology*, 2002, 446(1–3), s. 187–94.
- [40] Mahmoud, Ayman Moawad. Influence of rutin on biochemical alterations in hyperammonemia in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2012, 64(7–8), s. 783–89.
- [41] Khan, Mohd. Moshahid - Ahmad, Ajmal - Ishrat, Tauheed - Khuwaja, Gulrana - Srivastawa, Pallavi - Khan, M. Badruzzaman - Raza, Syed Shadab et al. Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. *Brain Research*, 2009, 1292, s. 123–35.
- [42] Yang, Yi - Zhang, Fan. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2008, 15(4), s. 308–313.
- [43] Prince, P. S. M. – Priya, S. Preventive effects of rutin on lysosomal enzymes in isoproterenol induced cardio toxic rats: Biochemical, histological and in vitro evidences. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 649(1-3), s. 229-235.

- [44] Li, M. – Jiang, Y. – Jing, W. – Sun, B. – Miao, C. – Ren, L. Quercetin provides greater cardioprotective effects than its glycoside derivative rutin on isoproterenol-induced cardiac fibrosis in the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2013, 91(11), s. 951-959.
- [45] Karthick, M. – Prince, P. S. M. Preventive effect of rutin, a bioflavonoid, on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2006, 58(5), s. 701-707.
- [46] Říha, M. – Vopršálová, M. – Pilařová, V. – Semecký, V. – Holečková, M. – Vávrová, J. – Palicka, V. – Filipický, T. – Hrdina, R. – Nováková, L. – Mladěnka, P. Oral administration of quercetin is unable to protect against isoproterenol cardiotoxicity. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2014, 387(9), s. 823-835.
- [47] Kostinková V. Patofyziologické hodnoty myokardu potkana po akutní expozici isoprenalinu [Patophysiological values of rat myocardium after acute exposition of isoprenaline] [diplomová práce]. Hradec Králové (Česká republika): Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové; 2011 [citováno 22-04-2015]. Strana 37.