

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

**Studium vlivu chelátoru železa laktoferinu na model
akutního infarktu myokardu
(diplomová práce)**

Vedoucí diplomové práce:
Vedoucí katedry:

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.
Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Květen, 2006

Eva Vykrutová

Děkuji panu doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení, cenné rady a pomoc při sestavování mé diplomové práce a panu Mgr. Přemyslu Mladěnkovi za spolupráci při experimentu. Pro tuto práci byly čerpány prostředky z grantu GA UK 94/2006/C/Faf. Děkuji paní laborantce Pavlíně Jabůrkové za trpělivost a pomoc při zpracovávání praktické části diplomové práce. Děkuji také všem ostatním členům katedry biologických a lékařských věd a Katedry farmakologie a toxikologie, kteří se podíleli přímo na experimentu nebo vytvářeli příjemnou pracovní atmosféru.

OBSAH	3
ZKRATKY	4
1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 LAKTOFERIN	9
2.1.1 Struktura.....	9
2.1.2 Vlastnosti.....	12
2.1.3 Fyziologie laktoferinu.....	14
2.1.4 Účinky Lf.....	18
2.2 ROLE LF U AKUTNÍHO INFARKTU MYOKARDU	27
2.2.1 Kardiomyocyt.....	27
2.2.2 Akutní hypoxie.....	28
2.2.3 Reperfúzní paradox.....	29
2.2.4 Vznik ROS.....	30
2.2.5 Železo.....	33
2.2.6 Cheletační terapie.....	35
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
3.1 METODICKÁ ČÁST	37
3.1.1 Zvířata.....	37
3.1.2 Chemikálie a přístroje.....	37
3.1.3 Pilotní studie.....	38
3.1.4 Model akutního infarktu myokardu.....	38
3.1.5 Podání Lf.....	41
3.2 HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ	43
3.2.1 Chemikálie, přístroje a nástroje při histologickém zpracování.....	43
3.2.2 Zpracování materiálu pro histologickou analýzu.....	44
4. VÝSLEDKY	52
4.1 PILOTNÍ STUDIE.....	53
4.2 VLIV LF NA MODEL AKUTNÍHO INFARKTU MYOKARDU.....	54
5. DISKUZE	65
6. ZÁVĚR	69
7. LITERATURA	71

ZKRATKY

ADP	adenosindifosfát
AK	aminokyselina
apoLf	apolaktoferin
ATP	adenosintrifosfát
CK	kreatin kinasa
CSF	colony stimulating factor
Fas	CD 95 gen
G-	Gramm negativní bakterie
GM – CSF	granulocyty a makrofágy kolonie stimulující faktor (granulocyte macrophage colony stimulating factor)
holoLf	hololaktoferin
HSPGs	heparin sulfátované proteoglykany (heparin sulphate proteoglykans)
i. p.	intraperitoneální aplikace
i.v.	intravenózní aplikace
ICAM – 1	nitrobuněčná adhesivní molekula 1 (intracellular adhesive molecule 1)
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL	interleukin
IM	infarkt myokardu
ISO	isoprenalin
kaspasa (Caspase)	cytosolová aspartát-specifická cysteinová proteasa) cytosolic aspartate-specific cystein proteases
LBP	lipopolysacharid vázající protein (lipopolysacharid binding protein)
LD 1	laktát dehydrogenasa
LFA – 1	leukocyte function associated-1
LPS	lipopolysacharid
LRP	low-density lipoprotein-receptor-related protein
MIC	minimální inhibiční koncentrace

mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NK buňky	natural killer buňky
Nramp 2	H ⁺ /divalentní kov symportér (natural resistance-associated macrophage protein 2)
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
p.o.	perorální podání
PMN	polymorfonukleární leukocyty
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
s.c.	subkutánní aplikace
TNF – α	tumor necrosis faktor α
TNFR1	receptor pro tumor necrosis faktor
TRAIL	ligand indukující TNF navozenou apoptosu (TNF related apoptosis inducing ligand)
UHT	ultra heat treatment
VEGF ₁₆₅	vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

1. ÚVOD

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je jednou z hlavních příčin úmrtí ve většině evropských států. Česká republika se řadí mezi státy s nejvyšší kardiovaskulární úmrtností. Akutní formou ICHS je infarkt myokardu. Při infarktu myokardu dochází k úplné okluzi koronární tepny (ischémii), která vede v průběhu 30 minut k nekróze myokardu. Obnovení krevního zásobení (reperfuze) je nezbytná pro zachování životnosti srdeční tkáně. Při reperfuzi ale také dochází k nadprodukci reaktivních kyslíkových radikálů, které jsou zodpovědné za ischemicko-reperfuzní poškození. Tento jev je označován jako tzv. reperfuzní paradox a dochází při něm k poškození všech typů biomolekul – lipidů, proteinů i DNA.

Vznik reaktivních kyslíkových radikálů je katalyzován volnými ionty železa, které jsou zvýšeně uvolňovány při ischemicko-reperfuzním poškození. Reperfuznímu poškození myokardu může být zabráněno nebo může být alespoň zmírněno látkami, které mají schopnost chelatovat železo. Tento protektivní účinek už byl prokázán např. u deferoxaminu.

Laktoferin je v lidském organismu přirozeně se vyskytující glykoprotein. V organismu vykazuje velké spektrum účinků a ovlivňuje množství procesů, jeho role ale ještě není zcela přesně definována. V současné době je studován především vzhledem k jeho imunomodulačnímu a antibakteriálnímu působení.

Laktoferin má silné železo-chelatační vlastnosti. Patří do stejné skupiny glykoproteinů jako transferin, který je transportní formou železa. Laktoferin má však 260x vyšší afinitu k železu než transferin. Chelatuje trojmocné železo a tak působí proti tvorbě kyslíkových radikálů. Předpokládáme, že laktoferin bude bránit vzniku volných radikálů u ischemicko-reperfuzního poškození ale i v tkáních s vysokým metabolickým obratem (plíce, ledvina, játra). Účinek laktoferinu u těchto patologických stavů in vivo ještě nebyl detailněji studován.

Cílem této diplomové práce je stanovit účinky laktoferinu na různých úrovních organismu zdravého zvířete a zvířete s vyvolaným infarktem myokardu. Studium těchto účinků může sloužit při dalších studiích protektivních účinků laktoferinu na vznik volných kyslíkových radikálů a poškození myokardu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 LAKTOFERIN

2.1.1 Struktura

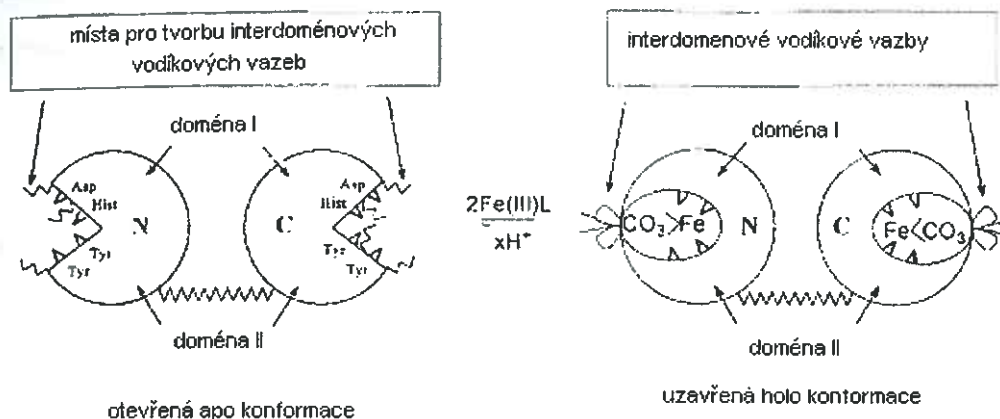
Struktura lidského **laktoferinu (Lf)** byla poprvé popsána v roce 1987. Lf je monomerní železo vázající glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 80 kDa. Spolu s transferinem a ovotransferinem patří do rodiny transferinů.

Lf se na úrovni sekvence aminokyselin i trojrozměrné konformaci ve vysoké míře shoduje se sérovým transferinem, přibližně ze 60%. Aminokyselinové sekvence Lf různých druhů zvířat jsou také velmi podobné avšak ne zcela identické (1).

Molekula glykoproteinu Lf obsahuje 2 místa potenciální glykosilace. Stupeň glykosilace se liší u různých molekul, mohou obsahovat hexosu, mannosu, hexosaminy nebo jiné sacharidy a mohou se také lišit ve stupni jejich fosforylace (2).

Protein je tvořen dvěma homologními globulárními podjednotkami - **N-podjednotka** a **C-podjednotka**. Každá z těchto podjednotek je dále tvořena dvěma doménami (N1, N2 a C1, C2). Obě podjednotky jsou spojeny peptidem složeným z 10 – 15 AK zbytků. Tyto AK zbytky v molekule Lf tvoří 3 otáčky α – helix, právě tento peptid tvoří významný rozdíl ve struktuře laktoferinu a transferinu a je také zodpovědný za jejich různé chování při uvolňování železa. V molekule transferinu je tento úsek tvořen flexibilní nepravidelnou strukturou. Zatímco rigidita helikální struktury spojovacího peptidu v molekule Lf zajišťuje silnější interakci mezi oběma podjednotkami, stabilizuje vazbu železa v N-podjednotce a posunuje začátek uvolnění železa až k nižším hodnotám pH. U Lf probíhá uvolňování železa v normálním stavu při pH kolem 3, zatímco transferin a izolovaná N-podjednotka Lf uvolňuje železo už při pH 5,5 (3,1).

Obr. č. 1 - Struktura laktoferinu (Bou Abdallah & El Hage Chahine, 1998).



Místo vazby železa

Důležitou roli v této molekule hraje zejména místo, kde se váže železo. Vazebné místo pro železo, jedno na každé podjednotce, se nachází mezi 2 doménami každé podjednotky. Tyto místa tedy umožňují vazbu dvou molekul železa, která je pevná, ale reversibilní. Toto místo na N-podjednotce zahrnuje dva tyrosinové zbytky, jednu kyselinu asparagovou a jeden histidin a dva kyslíky ze synergisticky vázaného anionu (CO₃²⁻). Na vazbě železa se synergisticky podílí také vazba CO₃²⁻, což je unikátní vlastností Lf.

Ligandy pro vazbu Fe³⁺ jsou shodné na obou podjednotkách Lf a shodují se také s ligandy sérového transferinu a ovotransferinu.

Bylo potvrzeno, že nejprve dochází k vazbě CO₃²⁻, která neutralizuje kladný náboj argininového zbytku v N-podjednotce a asociované helix a umožňuje propojení železa a čtyř ligandů (2 tyrosiny a 2 kyslíky z CO₃²⁻) ve vnitřním povrchu N2 domény.

Jestliže na protein není navázáno železo, obě podjednotky jsou většinou v otevřeném konformaci.

Zatímco při navázání železa dochází k jejich uzavření. Při konformačních změnách, kdy dochází k přibližování obou podjednotek, nedochází k tvorbě kovalentních vazeb ale převážně ke stabilizaci pomocí hydrofobních interakcí a tvorbě vodíkových můstků (1).

Uvolnění železa

V kyselém prostředí ($\text{pH} \leq 3,5$) tedy dochází ke ztrátě navázaného železa z molekuly holo a monofेरického C-místa laktoferinu mechanismem, který zahrnuje 4 kroky. V prvních dvou krocích dochází k modifikacím konformace celé molekuly (tato fáze se vyskytuje i u apolaktoferinu). Tyto dva procesy jsou nezávislé na množství železa a jsou následovány třetím krokem, ve kterém dochází k přijetí dvou protonů. Ve čtvrtém kroku se uvolňuje železo při pomalém přijímání 2 protonů (3).

HOLOLAKTOFERIN



ztráta karbonátu a částečné rozbalení struktury



protonace částečně rozbaleného proteinu



interakce se solemi



uvolnění železa



protonace apolaktoferinu



disociace anionů



APOLAKTOFERIN

2.1.2 Vlastnosti

Biochemické vlastnosti

V přirozeném stavu je Lf z 15 až 20% nasycen železem a má lososově růžovou barvu, jejíž intenzita je závislá na stupni nasycení železem. Lf, který obsahuje méně jak 5% železa je označován jako **apolaktoferin** (apoLf). Naopak Lf plně nasycený železem je **hololaktoferin** (holoLf). V mléce se Lf nachází v podobě apolaktoferinu.

Afinita Lf k železu je vysoká, asi 260krát vyšší než afinita sérového transferinu a na rozdíl od transferinu je schopen udržet železo i při nižším pH. Množství navázaného železa je závislé na přítomnosti bikarbonátového iontu (4).

Lf nemusí vždy vázat jen železo. Je schopen vázat i jiné kationy kovů jako např.: Cu^{2+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Zn^{2+} nebo kyselé molekuly jako je heparin, DNA a různé povrchové molekuly. Tato vazba pak mění i vlnovou délku absorpčního maxima (5,4).

Fyzikálně – chemické vlastnosti

Lf má velmi vysokou hodnotu isoelektrického bodu. Teoretická hodnota pI vypočtená pro Lf je 9,4 – 9,5. Avšak experimentálně zjištěné hodnoty se pohybují ve velkém rozmezí od 5,5 po 10, což může být vysvětleno variací v arginin-bohatých N-podjedotkách za různých podmínek separace.

Technologické vlastnosti

Tepelná stabilita

Tepelná stabilita Lf je velmi důležitou vlastností, která určuje možnosti jeho zpracování a tím i využitelnosti Lf jako léčiva. Chování jednotlivých forem Lf při tepelných změnách se znatelně liší. HoloLf byl více rezistentní vůči teplem indukovaným změnám než apoLf.

Pasteurizace při 72° C na 15 s neměla žádný vliv na antimikrobiální vlastnosti apolaktoferinu ani železem - saturovaného Lf. Avšak UHT (což je bleskové 2 – 3 s zahřátí na 137° C a následné rychlé zchlazení) zrušila schopnost holoLf vázat se na povrch bakterií stejně jako bakteriostatickou aktivitu apolaktoferinu.

Při procesu UHT byly obě formy proteinu zcela denaturovány. Jak se zdá, díky UHT dochází ke změnám ve strukturách i biologických vlastnostech přirozeného Lf, tedy apoLf i holoLf.

Mezi 72° C a 85° C dochází k denuraci Lf reakcí 1. řádu. Bylo potvrzeno, že standardní režimy pasterizace, které se používají každodenně v průmyslu, nemají žádný efekt na strukturu Lf. Proto se pasteurizace jeví jako nejlepší způsob při zpracování produktů, které obsahují tento protein (6).

Lf je, díky své schopnosti inhibovat Fentonovu reakci a tím i tvorbu volných radikálů, využitelný jako antioxidant v různých potravinových produktech a může se tak doplňkově podílet na prodloužení doby použitelnosti (7).

2.1.3 Fyziologie laktoferinu

Lf se fyziologicky vyskytuje v mnoha tkáních, orgánech i tekutinách lidského těla. Ačkoli je intenzivně studován, není jeho funkce v organismu zcela objasněna. Lf vykazuje celé spektrum aktivit a jeho funkce bude pravděpodobně komplexní.

Výskyt

Lf se predominantně vyskytuje v sekretech exokrinních žláz, např. v slzách, slinách, mléce, synoviální a seminální tekutině, které jsou lokalizovány ve vstupních branách do trávicího, respiračního a reprodukčního systému. To ukazuje na jeho protektivní roli v boji proti patogenům (6).

Lf byl ale také nalezen v ledvinách, žlučníku, pankreas, gastrointestinálním traktu a játrech. Za produkci Lf v těchto orgánech jsou pravděpodobně zodpovědné specializované buňky (8).

Regulace syntézy Lf je komplexní proces. Transkripce je regulována hormonálními i nehormonálními faktory. Do regulace jsou zapojeny steroidní hormony, růstové faktory, kinasové kaskády a transkripční faktory v různých úrovních. V kostní dřeni pravděpodobně dochází k syntéze Lf, ale tento proces je omezen pouze na stav zrání buněk a dospělé monocyty a neutrofilů (PMN) tuto schopnost už nemají (9,10). Při vyžívání buněk probíhá syntéza Lf ve fázi myelocytu, přičemž modulace exprese genů pro Lf probíhá při přechodu buňky ze stádia promyelocytu do stádia myelocytu. Translatovatelná mRNA pro Lf se objevuje přibližně ve stejném časovém okamžiku, kdy nastává vznik sekundárních granulí. Syntéza Lf je tedy koordinována a sladěna s prvky nutnými pro formování sekundárních granulí. Lf je také významný marker genové exprese omezený pouze na terminální fázi vyžívání granulocytů (11).

V PMN je protein skladován ve speciálních (sekundárních) granulích, kde zůstává do doby buněčné aktivace. Po kontaktu s cizím antigenem tyto buňky

degranulují a uvolňují velké množství antibakteriálních a antivirových peptidů, mezi které patří i Lf. Tento proces je hlavním zdrojem Lf v plasmě. Hladina Lf v plasmě je při fyziologickém stavu velmi nízká (1 µg/ml), ale při některých patologických stavech, např. při zánětu, prudce stoupá a dosahuje koncentrace až 200 µg/ml. Po degranulaci je Lf odstraněn z cirkulace různými mechanismy, převážně pomocí buněk monocyto-makrofagového systému. Tyto buňky mají receptory s vysokou afinitou k Lf a dopravují vázané železo do ferritinu, což je spojeno s destrukcí Lf (8).

Lf byl také nalezen ve vzorcích moče a stolice, ale jen ve velmi malých množstvích (13). Lf v moči novorozenců pochází z mateřského mléka, zatímco Lf ve stolici dospělých pochází ze sekrece žlučníku a pankreatu. Také buňky rektální mukosy produkují Lf. Produkce Lf pankreatem a rektální mukosou může být důležitým krokem v kontrole mikrobiální flory v duodenu (12).

Tabulka č. 1 - Množství Lf v jednotlivých biologických tekutinách (13)

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

Lf je relativně rezistentní vůči působení proteolytických enzymů a váže se na specifický receptor v membráně kartáčového lemu střeva. Geny pro tento receptor jsou exprimovány na vysoké úrovni v fetálním malém střevě a dospělém srdci. Receptory pro Lf se vyskytují na mnoha různých orgánech. Unikátní vlastnosti Lf zajišťují receptory na povrchu makrofágů, lymfocytů, hepatocytů nebo intestinálních buněk (14). Na rozdíl od transferinu, receptory pro Lf nejsou internalizovány do buněk. Transepiteliální transport se uskutečňuje buď cestou degradace, kdy je většina Lf rozložena a železo je

uvolňováno intracelulárně, nebo imunoreaktivní Lf přechází přes epitel se železem stále navázaným.

Lf proniká do buňky z okolního prostředí a je transportován do jádra buňky, kde se specificky váže k určitým strukturám DNA. Tím dochází ke spuštění transkripce reporterových genů (15).

p.o. podání

U novorozenců a čerstvě narozených mláďat je orálně podaný Lf receptorem zprostředkovanou endocytozou transportován do buněk střevního epitelu. Odtud je transportován do periferní cirkulace. U většiny savčích novorozenců jsou makromolekuly transportovány z intestinálního lumen do krve jen v omezeném časovém úseku. U prasat jsou proteiny colostrea transportovány do cirkulace jen během prvního dne života (12). S tím souvisí skutečnost, že schopnost mléčné žlázy produkovat Lf znatelně klesá během prvních 24 hodin laktace (6). Lidský Lf matčina původu byl také nalezen v moči kojenech předčasně narozených dětí. To ukazuje na signifikantní transepiteliální transport Lf ze střeva u těchto dětí (4, 35).

Lf je znatelně odolný vůči proteolytické degradaci, která by mohla nastat při jeho transportu gastrointestinálním traktem. Intragastriká degradace není signifikantně ovlivněna saturací Lf železem. Podstatné množství (více než 60%) apoLf i holoLf zůstává po pasáži žaludkem nezměněno. Vstřebávání Lf u dospělých není zcela objasněno, předpokládá se ale že probíhá v mnohem menší míře než je tomu u novorozených mláďat (16).

Předpokládá se, že Lf se snadněji absorbuje v přítomnosti žlučových kyselin nebo v konjugaci s nimi. Vylučován je do žluče a následně je reabsorbován do krevního řečiště. U novorozených mláďat byla potvrzena přítomnost enterohepatální cirkulace (4).

i.v. a i. p. podání

Po i.v. podání Lf u potkanů dochází k rychlému snižování jeho koncentrace v plasmě. Tento proces je silně závislý na dávce podaného Lf. Při dávkách 40 a 160 mg/kg je procentuální množství Lf zachovaného v plasmě signifikantně vyšší než při nižších dávkách. Farmakokinetické parametry ukazují na receptorem zprostředkovaný transportní mechanismus.

Při studiích distribuce Lf do různých orgánů, bylo zjištěno, že převážné množství (32%) Lf je po 60 min po i.v. podání distribuováno do jater. Určité množství (6%) zůstává zachováno v plasmě, kde se Lf váže na leukocyty, monocyty a lymfocyty. Minoritní množství se objevuje v dalších orgánech, např.: v plicích, ledvinách a slezině. Ve všech orgánech se Lf vyskytuje hlavně v buňkách epitelu a buňkách soustředěných kolem cév v těchto orgánech (16).

Po i.p. podání Lf u potkanů v dávce 40 mg/kg je maximální koncentrace Lf v plasmě dosažena za 2 – 4 hodiny po aplikaci. Za 24 hodin je jeho hladina už nedetekovatelná. Po podání druhé dávky roste koncentrace v plasmě daleko rychleji než při podání první dávky.

2.1.4 Účinky Lf

Lf je fyziologicky se vyskytující molekula, které má v organismu velké spektrum účinků a ovlivňuje množství procesů, i když jeho role ještě není zcela přesně definována. Strukturální a biochemická podobnost s transferinem ukazuje, že Lf může hrát určitou roli v metabolismu železa jako jeho transportní molekula. Přestože je Lf intenzivně zkoumán, stále chybí přesvědčivý důkaz o jeho zapojení do regulace homeostázy železa nebo vstřebávání železa z tenkého střeva při fyziologickém stavu.

Ve velké míře jeho účinky souvisí se schopností vázat železo a jiné molekuly, např. různé buněčné povrchové molekuly, DNA, heparin, aj. (6).

Účinky Lf :

- antibakteriální – bakteriostatický i baktericidní
- antivirový
- antifugální
- antiparazitický
- antitumorový
- ovlivnění zánětu
- imunomodulační
- ovlivnění hypersenzitivní reakce
- enzymatická aktivita
- regulace transkripce genů
- přirozený antioxidant
- ochrana před lipidovou peroxidací

Antimikrobiální účinky

1. bakteriostatické působení

Lf má extrémní schopnost vázat železo. Antimikrobiální schopnost laktoferinu byla dlouho přisuzována především vychytávání železa, což je jedna z esenciálních živin pro patogeny. Při nedostatku železa dochází k zastavení růstu bakterií.

2. baktericidní působení

Druhý mechanismus antibakteriálního účinku Lf je na železe nezávislý. Je zajištěn vazbou Lf a **lipopolysacharidu (LPS)** G- bakterií. Lf je schopen destabilizovat vnější membránu G- bakterií, což vede k uvolnění LPS. Odštěpení LPS z vnější membrány je umožněno přímou interakcí kationického Lf s anionickým LPS, přesněji s lipidem A, který je součástí LPS (17). Tím dochází ke změně permeability membrány, zvýšení citlivosti k jiným antibakteriálním působkům a následné smrti mikroorganismu. Deaktivaci LPS dochází k poklesu LPS-indukovaného uvolnění cytokinů z monocytů a blokování produkce superoxidu neutrofilů. Lf je tak schopen chránit tkáň před poškozením způsobeným rozvojem LPS-indukované endotoxemie. Při intraperitoneálním podání Lf před podání LPS došlo u myši k menší hypotermii a menšímu poškození tkáně než u jedinců bez Lf. Současně došlo ke změně v produkci cytokinů. Došlo ke znatelnému snížení produkce TNF- α , IL-6, IL-10 a NO (9).

Antivirové účinky

Lf působí především preventivně, ještě před tím, než virus napadne buňku. Preinkubace buněk s Lf se ukázala účinná. Působil jako prevence nákazy, zatímco u už napadených buněk neměl žádný inhibiční efekt. Mechanismem antivirové aktivity Lf je vazba na místa hostitelské buňky, která fungují jako receptor nebo co-receptor pro vir (např. vazba na HSPGs – heparin sulphate proteoglykans). Tím se zabrání už prvnímu kontaktu viru s hostitelskou buňkou (18).

Lf také zvyšuje antivirovou odpověď imunitního systému. Podávání laktoferinu buněčným kulturám in vitro, zvířatům nebo zdravým dobrovolníkům se zvýšil počet NK buněk, monocytů, makrofágů a granulocytů – tyto typy buněk hrají důležitou roli v ranných fázích virové infekce, proto se zvyšuje specifická odpověď organismu na virovou infekci (19).

Antifugální účinky

V kombinaci s flukonazolem redukuje na minimum MIC různých klinických druhů rodu *Candida*. Mechanismus působení Lf není zcela přesně objasněn (18).

Antiparazitické účinky

Role Lf je tady velmi nejasná, Lf působí různými mechanismy. Byla prokázána redukce aktivity při inkubaci sporozoitů *Toxoplasma gondii* a *Eimeria stiedai* s Lf. Usuzuje se buď na snížení integrity membrány parazita, nebo na interakci s hostitelskými tkáněmi (18).

Antitumorové účinky

Na zvířecích modelech byla dokázána schopnost Lf bránit rozvoji experimentálních tumorů. Lf působí různými mechanismy. Ale žádná z těchto aktivit asi nesouvisí se schopností Lf vázat železo (19).

Apoptosa je jedním z důležitých mechanismů, které brání vzniku a rozvoji kancerogeneze. Antitumorová aktivita Lf je také dána jeho schopností **zvýšit expresi Fas** na úrovni mRNA i proteinové úrovni a aktivaci kaspasy 3 a kaspasy 8 (20). Fas je membránový protein exprimovaný na povrchu NK buněk, aktivovaných T-lymfocytů. Přirozenými iniciátory nadbytečných, poškozených

nebo nádorových buněk jsou ligandy/receptory smrti (death-ligands/receptors), patřící do rodiny TNF. Mezi nejvýznamnější ligand/receptorové páry patří zejména:

- Fas-ligand/Fas (CD95),
- TRAIL-ligandy/receptory TRAIL-R1 až R4
- TNF α /TNFR1 a R2

Rodina TNF/NGF proteinů tj. tumorový nekrotizující faktor α (TNF α), ligand Fas/APO-1 (=ligand CD95), ligand TRAIL/APO-2 spouští apoptosu vazbou na příslušné specifické receptory (tzv. smrtící receptory), lokalizované na povrchu buňky (TNF-R1, CD-95 a TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5). Při spuštění apoptosy dochází k přestavbě (trimerizaci) receptorové molekuly, což dále vede k nahromadění tzv. adaptorových molekul na smrtící doméne smrtícího receptoru. V dalším průběhu apoptosové signální dráhy hrají důležitou úlohu mitochondrie (uvolnění cytochromu c) a aktivace tzv. kaspasové kaskády. Vlastní proces apoptosy nastává proteolýzou intracelulárních bílkovin pro buňku životně důležitých. Enzymy, které tuto proteolýzu katalyzují (nebo aktivují jiné efektorové molekuly), se nazývají kaspasy (Cytosolic Aspartate-Specific cystein Proteases = CASPASE). V další fázi pak dochází ke štěpení proteinů cytoskeletu a jádra (21).

Lf se podílí na **aktivaci NK buněk** a zvyšuje citlivost cílových buněk k lýze. Při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ zvyšuje cytolýzu, při 10násobné koncentraci pouze moduluje cytolýzu v závislosti na fenotypu cílových buněk. Lf se váže na 91% populace NK buněk a zvyšuje jejich cytotoxickou aktivitu, avšak při vyšších koncentracích Lf naopak dochází ke snížení této aktivity. Lf významně zvyšuje citlivost k lýze u buněk epitelu tlustého střeva a prsu (22).

VEGF₁₆₅ je hlavním angiogenním faktorem přispívajícím k rozvoji většiny tumorů. Lf jako jediný orálně podaný protein vykazuje signifikantní inhibici VEGF₁₆₅. Tato inhibice pravděpodobně probíhá jednou ze tří možných cest:

1. Lf se váže a inaktivuje angiogenní molekuly nebo se váže a aktivuje latentní antiangiogenní faktory v cirkulaci.

2. Lf se váže na heparin-podobné molekuly na povrchu endotelových buněk, které zachycují biologicky aktivní molekuly a zprostředkují tak vazbu Lf na specifické receptory. Tak může Lf na této cestě regulovat centrální funkce endotelových buněk.

3. Lf se přímo váže na specifické receptory v endotelových buňkách jako je např. LRP (low-density lipoprotein-receptor-related protein). Na LRP se také váže apoprotein E, který silně inhibuje proliferaci a motilitu endotelových buněk. Což ukazuje, že Lf by mohl působit stejným mechanismem (23).

Lf reguluje klíčové kroky při **buněčném cyklu**, čímž se také může podílet na supresi tumoru. U nádorových buněk prsu Lf inhibuje růst a přechod buňky z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu. Toto pozastavení G1 fáze je spojeno s dramatickým snížením úrovně Cdk2 proteinu, cyklinu E a aktivity Cdk4. Tento jev je doprovázen zvýšenou expresí Cdk inhibitoru p21 (CIP1) (24).

Shrnutí antitumorových účinků:

- posiluje apoptosu aktivací Fas a kaspasy 3 a 8
- podílí se na aktivaci NK buněk
- inhibuje angioneogenezi zprostředkovanou VEGF₁₆₅ a IL-1 α
- moduluje expresi G1 proteinů
- rozvíjí makrofágovou cytotoxicitu
- při současném podání s karcinogenními heterocyklickými aminy inhibuje jejich toxický účinek supresí enzymů fáze I., cytochromu P 4501A2 (25)

Ovlivnění zánětu

Lf kompetuje s L-selektinem o vazbu k LPS a tím snižuje produkci kyslíkových radikálů. L-selektin je na séru nezávislý LPS receptor na buněčném povrchu neutrofilů zahrnutý v pohybu buňky, trombóze a zánětu, zprostředkovává jak vazbu LPS tak i transdukcí signálu v neutrofilu. LPS se váže na L-selektin, následně dochází k aktivaci leukocytu, oxidativnímu vzplanutí a tvorbě reaktivních volných radikálů. Při vysokých koncentracích LPS dochází k poškození tkáně následkem působení reaktivních kyslíkových radikálů. Při poškození tkáně (infekce, trauma, LPS) je aktivován monocyto-makrofágový systém, následuje produkce IL-1, IL-6, TNF- α , GM-CSF, NO dále pak aktivace cirkulujících neutrofilů a stimulace tvorby nových makrofágů a neutrofilů v kostní dřeni (19,36).

Degranulace aktivovaných neutrofilů způsobí uvolnění velkého množství sekundárních mediátorů včetně Lf. Protizánětlivé působení Lf není dáno jen chelatací LPS, ale také regulací, jakousi negativní zpětnou vazbou, zánětlivého procesu. Lf se váže na specifické receptory na monocytech, což vede k oslabení produkce cytokinů a dále redukci aktivace nových monocytů a neutrofilů.

Lf se váže na CD14, což je 55 kDa glykoprotein, který existuje:

- v rozpustné formě v plazmě v koncentraci 2 – 6 $\mu\text{g/ml}$
- protein ukotvený na povrchu monocytů nebo makrofágů

Lf interaguje i s komplexem LPS-CD14. Touto vazbou dochází i k inhibici exprese endoteliálních adhesivních molekul E-selektinu, ICAM-1. Tím dochází k inhibici infiltrace leukocytů, mikrovaskulární trombózy a poškození endotelu (26). Tato vazba také snižuje expresi prozánětlivého IL-8 už na úrovni mRNA. IL-8 aktivuje integriny (LFA-1), adhesivní molekuly neutrofilů, které umožňují silnější vazbu k endotelu a rozvoj zánětu. Dimér IL-8 je schopen se vázat na molekuly proteoglykanů např. heparinu a heparan sulfatované molekuly. Lf kompetuje s IL-8 o vazbu na tyto molekuly a tím inhibuje zánětlivé pochody (27).

Při malých koncentracích LPS, je transfer LPS na CD14 zprostředkován LBP (LPS-binding protein) a tak se zvyšuje citlivost buněk vůči LPS. Lf brání vzniku LBP-zprostředkované vazbě LPS k CD14 a tak snižuje jejich odpověď vůči LPS, snižuje tedy produkci cytokinů: IL-1, IL-6, TNF- α ze LPS – stimulovaných monocytů (26).

TNF α a IL-1 zvyšují expresi adhesivních molekul na leukocytech i endotelových buňkách. Zvyšuje se adherence buněk a je umožněna diapedeza imunitních buněk. TNF α zlepšuje fagocytózu a je přímým stimulem pro uvolnění působků ze sekundárních granulí. Tyto účinky jsou důležité při rozvoji zánětlivé reakce, vedou k poškození okolní tkáně. Lf jako zpětná vazba zabraňuje nadměrnému rozvoji zánětu, aktivaci leukocytů a poškození okolní tkáně (28).

Lf významně snižuje proliferaci a uvolňování IL-2. Aktivace B-buněk probíhá buď přímou vazbou IL-1, nebo přes IL-2 aktivované T-buňky. Lf tak svým působením také zasahuje do tvorby protilátek (29).

Současně Lf ovlivňuje zánětlivou reakci organismu a tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) i jiným mechanismem, který je dán jeho schopností vázat železo. Železo je základní složkou kontroly tvorby ROS. Katalyzuje 2 kroky procesu známého jako Haber-Weissova reakce. Tvorba hydroxylového radikálu přes železo dependentní Haber-Weissovou reakci vede k rozvoji fagocytové mikrobicidní aktivity a lipidové peroxidaci. ROS včetně hydroxylového radikálu může reagovat s všemi typy biologických molekul, což následně může vést k narušení funkce těchto molekul a tím k poškození organismu. V přítomnosti Fe²⁺ peroxid vodíku spontánně přechází v hydroxylový radikál. Fe³⁺ vzniklý v této reakci je vázán Lf a bezpečně transportován do buněk retikulo-endoteliálního systému, kde je skladováno v podobě ferritinu. Endogenní Lf se tedy podílí na regulaci vzniku ROS (19).

Imunomodulační účinky

Lf podporuje zrání T buněčných prekurzorů v imunokompetentní Th lymfocyty a diferenciaci a zrání B buněk ve zralé antigen prezentující buňky. Zvyšuje také expresi LFA-1 (leukocyte function associated-1) antigenu u lidských lymfocytů v periferní krvi (19).

Lf se podílí i na regulaci vyzrávání imunitních buněk. Lf zvyšuje produkci CSF (colony stimulating factor), zvyšuje počet nezralých forem neutrofilů v cirkulující krvi (30). Všechny hlavní podtypy lymfocytů exprimují receptor pro Lf: $\alpha\beta$ T buňky, $\lambda\delta$ T-buňky, CD8+, CD4+, B-buňky i NK buňky. Receptor pro Lf je většinou exprimován spolu s receptorem pro transferin, ale u 35% deciduálních lymfocytů a 15% aktivovaných krevních buněk je exprimován receptor pro Lf samostatně (31). Lf je nedílnou součástí cytokiny indukované kaskády během metabolické nerovnováhy při poškození tkáně. Cytokiny svým komplexním působením také ovlivňují maturaci imunitních buněk a tak je i Lf ovlivňujícím faktorem v tomto složitém procesu (19).

Po p.o. podávání Lf zdravým dobrovolníkům vzrostl počet nezralých neutrofilů v cirkulující krvi. Toto zvýšení bylo více než dvojnásobné při dávce 10 mg, ale statisticky významné bylo i zvýšení při dávkách 2 a 50 mg. Podávání Lf také způsobilo pokles spontánní produkce IL-6 a TNF- α , tento pokles byl signifikantní zejména den po poslední dávce a pokračoval i v následujících 14 dnech (32).

Lf může být potencionálně látkou, které zlepšuje efektivitu vakcinace. Kravský Lf má mnoho cukerných zbytků s vysokou afinitou k mannosovým receptorům. Tyto receptory se hojně vyskytují na antigen prezentujících buňkách v kůži a kožním epitelu, stejně jako v GIT epitelu (19).

Ovlivnění hypersenzitivní reakce

Lf silně inhibuje zpožděný typ hypersenzitivity. Z části může být tento jev spojen s selektivní inhibicí funkce Th1, poněvadž Lf snižuje expresi receptoru pro IL-2 na buňkách Th1 linie. Zatímco exprese IL-4 receptoru na Th2 buňkách není ovlivněna. Navíc Lf snižuje proliferativní odpověď Th1 buněk na prezentaci antigenu. Lf také snižuje proliferaci a uvolňování IL-2 (19).

Enzymatická aktivita

U některých isoformů Lf byla prokázána enzymatická aktivita.

- ribonukleázová aktivita
- proteasová aktivita – serin proteasová aktivita (9,10)

Regulace transkripce genů

Lf se váže na specifické DNA sekvence a tak reguluje transkripci reporterových genů obsažených v sekvencích promotorového regionu. Přesný mechanismus ale není popsán (9).

2.2 ROLE LF U AKUTNÍHO INFARKTU MYOKARDU

Infarkt myokardu (IM) je nejzávažnější formou ischemické choroby srdeční (ICHS). Dochází k okluzi koronární tepny. Trvá-li ischemie minimálně 30 minut, dochází k nekróze tkáně tzv. infarktu. Obnova prokrvení postižené tkáně (**reperfúze**) je naprosto nezbytná pro zachování životnosti srdeční tkáně. Avšak obnovení krevního toku koronární arterií vede k produkci toxických reaktivních forem kyslíku (volné kyslíkové radikály, ROS), převážně $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot$. Tento efekt je označován jako **reperfúzní paradox**. Tomuto procesu může být zabráněno nebo může být zmírněn přítomností antioxidantů (21). Jak se zdá, mohl by Lf, vzhledem ke svým vlastnostem, účinně působit proti tvorbě volných radikálů při ischemicko-reperfúzním poškození srdce.

2.2.1 Kardiomyocyt

Myokard se v mnohém podobá kosternímu svalstvu; patří též mezi příčně pruhované svalstvo. Jsou však zde dvě základní histologické odchylky: Zatím co v myocytech kosterních svalů jsou jádra umístěna na periferii buněk, těsně pod sarkolemou, v kardiomyocytu jsou uprostřed. Znamená to, že kardiomyocyty mají perinukleární prostor, v němž jsou uspořádána myofilamenta. Druhá odlišnost je v tom, že kardiomyocyty mají tzv. interkalární disky, což jsou specializované molekulové komplexy oddělující jednu buňku od druhé (víme, že buňky kosterního svalu nejsou od sebe takto odděleny, ale tvoří syncytium).

Kardiomyocyt má velké množství mitochondrií (téměř polovina buňky jsou mitochondrie). Je to proto, že srdeční sval musí pracovat nepřetržitě po celou dobu života, kontrakce myokardu vyžaduje výlučně aerobní metabolismus (regenerace ATP z ADP oxidační fosforylací) a je navozována srdečním svalem samým (autonomní srdeční systém), nikoliv vnějšími nervovými podněty, ačkoliv nervová soustava může mít na tento stah vliv.

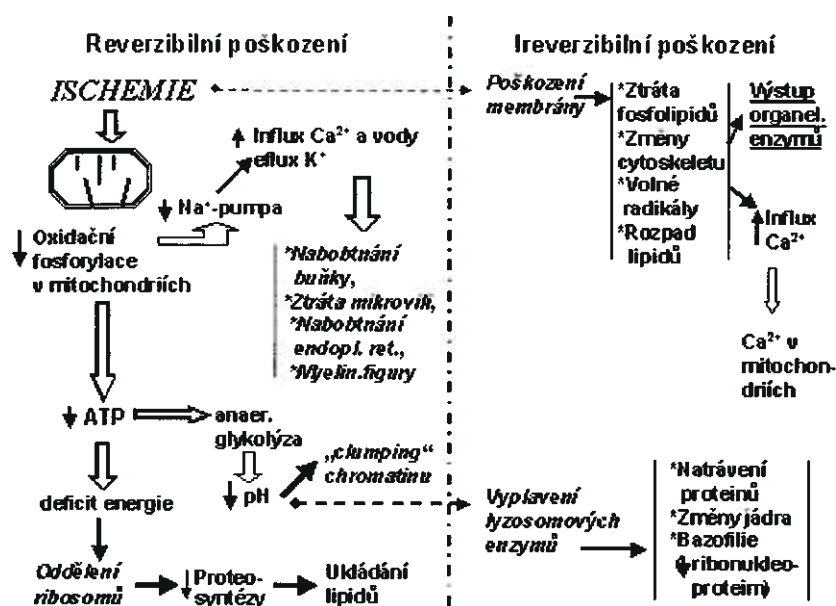
Jako zdroj energie slouží myokardu především mastné kyseliny (po jídle i na lačno), při hladovění též ketolátky. Myokard vyžaduje stálý přívod kyslíku (nemůže pracovat na „kyslíkový dluh“ tj. získávat určitou kratší dobu energii z anaerobní glykolýzy, jako je tomu u kosterního svalu).

2.2.2 Akutní hypoxie

Kardiomyocyt je velmi citlivý na nedostatek kyslíku. Hlavním důsledkem ischemie je velmi rychlá změna (během několika sekund) na anaerobní metabolismus, končící potenciálně toxickou kyselinou mléčnou; snižuje se rapidně zásoba energetických fosfátů (kreatinfosfát, ATP). Neschopnost kontraktility se objeví během 60 s. Změny v ultrastruktuře se objeví do několika minut (nabobtnání mitochondrií i celé buňky, deplece glykogenu). Tyto změny jsou z počátku reverzibilní, ale po 20 – 40 minutách trvajících ischemie dojde k irreverzibilní nekróze postupně všech kardiomyocytů.

Nekróza vede k vyplavení biochemických markerů (myoglobin, glykogenfosforylasa BB, vazebný protein mastných kyselin, troponin T, troponin I, kreatinkinasa-isoenzym MB, lehké i těžké řetězce myosinu, další enzymy - LD1, AST, CK). Nejprve jsou vyplaveny markery uložené volně v sarkoplasmě (myoglobin, část troponinu T), pak teprve vázané na buněčné struktury (větší část troponinu T a I, řetězce myosinu).

Obr.č. 2 - Schéma ischemického poškození buňky



2.2.3 Reperfúzní paradox

Během ischemie myokardu jsou reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species - ROS) přítomny jen v malém množství, při obnovení krevního toku koronárním řečištěm však dochází k mnohonásobnému zvýšení jejich počtu. Postischemické zvýšení ROS vzniká neúplnou redukcí kyslíku v mitochondriích a tvorbou superoxidového iontu při reakci xanthinoxidasy, bohatě přítomné ve vaskulárním endotelu a především pak volné kyslíkové radikály uvolněné z polymorfonukleárních leukocytů, které přicestovaly na místo poškození. Není-li reperfúze obnovena, pokračující ischemie poškozuje buňky pravděpodobně jiným mechanismem než tvorbou reaktivních forem kyslíku (21).

2.2.4 Vznik ROS

Kyslík (O_2) se v mitochondriích normálně kompletně redukuje na vodu (H_2O) tím, že přijímá 4 elektrony. Při nekompletní redukci mohou vzniknout velmi toxické deriváty: hydroxylový ion, superoxidový radikál a hydrogenperoxid. Dochází k tomu při řadě enzymových reakcí v různých buněčných složkách (mitochondrie, lyzosity, peroxisomy, plasmatická membrána).

Superoxidový radikál vzniká buď přímo při oxidaci v mitochondriích nebo při reakcích katalyzovaných xanthinoxidasou, cytochromem P-450 ev. jinými oxidasami:



Vzniklý superoxid může být inaktivován spontánně nebo mnohem rychleji účinkem superoxiddismutasy za vzniku H_2O_2 :



Hydrogenperoxid se tvoří buď dismutací $O_2^{\cdot -}$ nebo přímo oxidasami v peroxisomech, obsahujících katalasu, která jej ihned rozkládá.

Hydroxylové radikály vznikají hydrolyzou vody při ionizační radiaci:



nebo při interakci přechodných kovů (kupř. Fe, Cu) při *Fentonově reakci*:



nebo při *Haberově a Weissově reakci*:



Poškození navozené reaktivními formami kyslíku

ROS jsou extrémně reaktivní, dochází k poškození většiny buněčných struktur. Mezi nejvýznamnější cíle ataku volných radikálů patří proteiny, DNA a membránové lipidy.

Lipidová peroxidace

Peroxidace membránových lipidů narušuje uspořádání soudržné lipidové dvojvrstvy a strukturální organizace. Během ataku ROS dochází ke zkracování a zmenšování struktury kyselin. Velmi významnou roli v průběhu lipidní peroxidace hrají kovy. Ukázalo se, že účast kovů jako katalyzátorů je nezbytná při lipidní peroxidaci, která je indukována hydroxylovým radikálem. Iniclace lipidní peroxidace indukované hydroxylovým radikálem je v nepřítomnosti kovů nemožná. Přítomností některých kovů (železo, měď) může být urychlena a usnadněna fáze iniciace.

Poškození DNA

Reaktivní druhy kyslíku mohou způsobit změny ve struktuře DNA, narušení proteinové kostry, poškození deoxyribosa-fosfátové kostry stejně jako vznik specifických chemických modifikací purinových a pyrimidinových bazí.

Oxidační modifikace bazí se mohou projevit jako mutace, oxidace deoxyribosové části může indukovat uvolnění baze nebo řetězcové zlomy DNA. Hydroxylový radikál způsobuje jak modifikace bazí, tak řetězcové zlomy.

Z pěti hlavních komponent DNA jsou na poškození hydroxylovým radikálem nejvíce citlivé následující nukleotidy: thymin, cytosin, následuje adenin, guanin a deoxiribóza.

Poškození proteinů

Oxidace aminokyselin v proteinech vede k nevratným fyziologickým změnám v proteinech samotných. Tyto fyziologické změny jsou kategorizovány do tří skupin: fragmentace, agregace (denaturace), citlivost k proteolytickému štěpení (vlivem konformačních změn) (36). Citlivost proteinů vůči oxidaci je ovlivňována také přítomností iontů kovů schopných katalyzovat reakci Fentonova typu (33).

2.2.5 Železo

Železo je zvláště důležité při toxickém kyslíkovém poškození. Většina volného železa je v trojmocné formě a musí být redukována na dvojmocnou, aby mohla být účinná ve Fentonově reakci. Redukce může být podpořena superoxidem. A tedy zdroje železa a superoxidu jsou nutné pro maximální oxidační poškození buňky (37).

Železo je nejběžnější přechodný prvek v organismu (38). Je to pro život nezbytný kovový prvek, který v organismu a v buňkách plní mnoho vitálních funkcí (39). Buňky potřebují železo k syntéze DNA, RNA a proteinů, k transportu elektronů, respiraci, proliferaci, diferenciaci a k regulaci genové exprese. Železo je nutné k přechodu buněk z G1 do S fáze buněčného cyklu a ovlivňuje expresi molekul, které kontrolují průběh buněčného cyklu. Železo je součástí pro buňku životně důležitých enzymů např. oxidázy, katalázy, peroxidázy, ribonukleotidreduktázy, akonitázy, cytochromů a syntázy oxidu dusnatého. Jednou z hlavních funkcí železa je účast při transportu kyslíku (jako součást hemu) (38).

Největší množství železa je v krvi jako součást hemoglobinu (60-70%), kromě toho se vyskytuje ve všech buňkách ve formě buněčných heminů (jen asi 0,2%) a ve svalstvu jako myoglobin (8%). V retikuloendotelovém systému, zejména ve slezině a játrech, ale též ve střevní sliznici a v kostní dřeni je železo skladováno jako feritin a hemosiderin (asi 20%). Transport železa se uskutečňuje ve vazbě na transferin (0,1%) (40).

V organismu dospělého člověka je obsaženo cca 4000 mg železa, přibližně 2/3 jsou v hemoglobinu erytrocytů a jejich prekurzorů. Mimo hemoglobin je hemové železo součástí myoglobinu a řady enzymů. Asi 1/4 železa je uložena v zásobárnách (ve feritinu), zejména v játrech a v makrofágových buňkách. Při nadbytku se železo hromadí též ve formě hemosiderinu. V plazmě je jenom malé množství železo.

Environmentální a dietární železo je nejvíce přítomno jako Fe^{3+} , což je nerozpustná a obecně bio-nedosažitelná forma. Železo vstupuje u obratlovců do těla primárně přes duodenum, hlavně v proximální části střeva. V intestinálním lumen je Fe^{3+} redukováno na více rozpustné Fe^{2+} prostřednictvím ferrireduktázy, která přenáší elektrony z cytosolického NADPH na extracelulární akceptor jako je Fe^{3+} . (39)

Nramp2 (známý jako DMT1 nebo DCT1) transportuje Fe^{2+} přes intestinální povrch (41).

Za normálních podmínek cirkuluje extracelulární železo v plazmě navázané na transferin. V této formě je železo nereaktivní. Transport železa od enterocytů k ostatním buňkám se tedy děje prostřednictvím specifického proteinu – transferinu (42).

Jakmile železo vstoupí do buňky, vytváří hypoteticko-nízkomolekulární zásobu jinak známou jako zásoba chelatabilního železa. Železo může být využito v mnoha buněčných procesech, které zahrnují inkorporaci železa do mnoha důležitých proteinů obsahujících železo – hlavně do feritinu. Za podmínek velké zátěže železem je feritin převeden do lysosomů, kde je transformován do hemosiderinu (43).

Železo je v buňce uskladněno v podobě feritinu, který hraje klíčovou roli v metabolismu železa. Feritin má 24 proteinových podjednotek, které vytváří kostru s dutinou. Dutina je schopná uskladnit 4500 atomů Fe^{3+} jako anorganický komplex (44).

2.2.6 Chelatační terapie

Možnou cestou v prevenci poškození myokardu ROS se jeví chelatační terapie. Velice studovanou sloučeninou je také deferoxamin (Desferal, DFO)(45).

Deferoxamin je silný chelatátor železa, které je pak v komplexu převážně trojmocné Fe^{3+} a tedy oxidoredukčně málo aktivní. Chelatace železa deferoxaminem blokuje Fentonovu reakci, tím že snižuje přístup železa pro tvorbu ROS. Deferoxamin váže o něco slaběji i jiné přechodné kovy. Je publikována řada studií účinku deferoxaminu na kardiovaskulární poškození, závěry však nejsou jednoznačné. Vzhledem ke krátkému poločasu deferoxamin nelze užívat preventivně k protekci před oxidačním stresem vyvolaným chemickými látkami. Zabraňuje vzniku ferylové formy myoglobinu a feryl-myoglobinového radikálu (46). Současně může také snižovat aktivaci endoteliálních buněk v odpovědi na TNF- α a kolagenem aktivovanou agregaci trombocytů (47). Deferoxamin se užívá k léčbě stavů spojených s patologickou kumulací železa v organizmu. (46)

Lf má velkou schopnost vázat železo, jeho afinita k železu je 260x vyšší než u transferinu (4). Lf chelatuje trojmocné železo a tak působí proti tvorbě volných radikálů. Bylo prokázáno, že brání vzniku hydroxylového radikálu, který vzniká při Fentonově a Haber-Weissově reakci (34). Předpokládá se, že bude účinně působit nejen u ischemicko-reperfúzního poškození, ale i v tkáních s vysokým metabolickým obratem (plíce, ledviny, játra), kde se předpokládá větší tvorba volných radikálů.

LMET

12.12

ivexp
Wlata
tyh
kam
y ma
pau
or
F

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 METODICKÁ ČÁST

3.1.1 Zvířata

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

3.1.2 Chemikálie a přístroje

urethan (ethylurethan, Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

Aqua pro inj. Biotika, inj. sol.(Biotika a.s., Slovensko)

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

isoprenalin (Zentiva a.s, Česká republika)

laktoferin (SVUS, Hradec Králové)

chirurgické nástroje (peány, nůžky, skalpely, nitě apod.)

kanylky

Valu-Set, PE katetry

tlakový snímač BPR-02

Cardiosys® (Experimentria Ltd, Maďarsko)

software Cardiosys V 1.1.

mikropipety

3.1.3 Pilotní studie

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

Tab. č. 1 Aplikace laktoferinu

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

3.1.4 Model akutního infarktu myokardu

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

Isoprenalinový model

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

Funkční parametry

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

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

- **tlaky krve (BP):** střední (mBP), systolický (sBP), diastolický (dBP) (mmHg)
- **srdeční frekvence (HR; tepy.min⁻¹)**
- **srdeční index (CI; ml.min⁻¹.kg⁻¹)**
- **index tepového objemu (SVI; ml.kg⁻¹)**
- **sBP x HR** (tzv. dvojprodukt, "double product", parametr srdeční spotřeby kyslíku; mmHg.tepy.min⁻¹)
- **index celkové periferní rezistence** mBP/CI ($R_{s,totl}$; mmHg.ml⁻¹.min.kg)
- **index srdečního výkonu, CI x mBP (CPOI; mmHg.ml.min⁻¹.kg⁻¹)**

Veličiny byly měřeny 4x v 5 minutových intervalech (48).

Naměřené hodnoty u modelového případu jsou shrnuty v tab. č. 2.

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

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

3.1.5 Podání Lf

Tři dny jsme podávali 3 potkanům opakovaně laktoferin (Lf) v dávce 20 mg/kg každých 24 hodin. U dvou z těchto tří zvířat (LAI1, LAI2) jsme aplikovali isoprenalin (ISO) k navození IM a jeden z nich (LA1) sloužil jako kontrola bez isoprenalinu. Čtvrtému a pátému potkanovi (LAI3, LAI4) byl aplikován jednorázově Lf v dávce 50 mg/kg a po 5 minutách ISO (viz Tab. č. 3,4).

Tab. č. 3: Podání laktoferinu

	Opakované podání LA	Jednorázové podání LA	Podání isoprenalinu
LAI1	20 mg/kg (3x)	-----	25,5 mg
LAI2	20 mg/kg (3x)	-----	26 mg
LA1	20 mg/kg (3x)	-----	kontrolní
LAI3	-----	50 mg/kg	27,5 mg
LAI4	-----	50 mg/kg	26 mg

Tab. č.4: Schéma podávání laktoferinu

		1. den	2. den	3. den	4.den	5. den
LAI1		20mg/kg LA	20mg/kg LA	20mg/kg LA	ISO	+
	m	250	225	250	255	240
	LA	5	4,5	5	-	
	I (urethan)	-	-	-	25,5mg	(1,4ml)
LAI2		20mg/kg LA	20mg/kg LA	20mg/kg LA	ISO	+
	m	250	250	255	260	240
	LA	5	5	5,1	-	
	I (urethan)	-	-	-	26 mg	(1,4ml)
LA1		20mg/kg LA	20mg/kg LA	20mg/kg LA	+	
	m	250	250	260	240	
	LA	5	5	5,2		
	I (urethan)	-	-	-	(1,4ml)	
LAI3		50mg/kg LA + ISO	+			
	m	275	245			
	LA	13,75				
	I (urethan)	27,5mg	(1,5ml)			
LAI4		50mg/kg LA + ISO	+			
	m	260	245			
	LA	13				
	I (urethan)	26 mg	(1,5ml)			

m – hmotnost zvířete v g

LA – dávka laktoferinu v mg

i (urethan) – dávka isoprenalinu, v závorce dávka 20%w/V roztoku urethanu

m (s) – hmotnost srdce v gramech

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

3.2 HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ

Tkáň odebranou pro histologické vyšetření jsme nejprve fixovali a označili číslem, pod nímž je vzorek evidován. Následně jsme vzorek odvodnili, projasnili, prosytili parafínem a zalili vzorek do parafínu. Dále jsme připravili histologické řezy, které jsme dále upravovali. Po odparafinování preparátů jsme přistoupili k histologickému barvení. Obarvené preparáty jsme zamontovali do kanadského balzámu. Po zaschnutí byly vzorky připraveny pro analýzu světelnou mikroskopií.

3.2.1 Chemikálie, přístroje a nástroje při histologickém zpracování

aceton (LACH – NER s.r.o. NERATOVICE)
alcianová modř (SIGMA – ALDRICH)
kyselý fuchsin (Fisher Scientific)
eosin G (MERCK)
ethanol 96% (Lihovar Chrudim a.s.)
ethylenglykol (Lachema Brno)
formol konc. (PENTA – CHRUDIM)
glycerol (ALMA)
hematoxylin (Lachema Brno)
chlorid železitý (Lachema Brno)
jodičnan sodný (Lachema Brno)
kanadský balzám (Lachema Brno)
kyselina fosfomolybdenová (LACH – NER s.r.o. NERATOVICE)
kyselina chlorovodíková (Lachema Brno)
kyselina octová (LACH – NER s.r.o. NERATOVICE)
kyselina pikrová (Polskie Odczynniki Chemiczne)
kyselina octová ledová (LACH – NER s.r.o. NERATOVICE)
oranž G (Fisher Scientific)
parafín (PARAMIX – HOLICE)
Ponceau RR (Loba-Chemie, Wien, Austria)

síran hlinitý (PENTA – CHRUDIM)
světlá zeleň (Fluka AG, Switzerland)
xylen (Kulich Hradec Králové)
žlutá krevní sůl (kalium ferrokyanatum) (PENTA – CHRUDIM) $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$

pH metr (pH 538 WTW)
míchačka (MM1, Laboratorní přístroje Praha)
laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce apod.)
kyvety
podložní a krycí sklička
sáňkový mikrotom (Leitz-Wetzlar, Reichert)
rotační mikrotom (MPS-2)
světelný mikroskop (Hund Wetzlar V 300)
mikroskop Olympus AX-70 (Olympus Ltd., Japan)
digitální kamera Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA)
software LUCIA verze 4.71 (Laboratory Imaging Prague ČR)

3.2.2 Zpracování materiálu pro histologickou analýzu

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

K fixaci se používá Bouinova tekutina. Minimální doba fixace je 24 hodin – záleží na velikosti vzorku. Po skončení fixace je nutno vzorek dále zpracovávat.

Tato procedura sestává z odvodnění, projasnění, prosycení parafínem a následuje vlastní zalití vzorku do parafínu. Při projasnění jde o odstranění ethanolu z tkáně. Při prosycování nesmí teplota parafínu překročit 58°C.

Bouinova fixační tekutina

nasyčený roztok kyseliny pikrové 300 ml

neutrální formol 100 ml

před použitím se přidává 3 – 5 ml kyseliny octové ledové na každých 100 ml roztoku

Neutrální formol

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

Zpracování vzorku z fixace Bouinovou tekutinou

80 % ethanol 1 hod

aceton 3 x během 24 hodin

benzen 3 x po 10 min

parafín 2 x během 24 hodin

zalití do parafínu

K vlastnímu zalití tkáně do parafínu se používá zkvalitněný a přefiltrovaný parafín. Ten se získá tak, že k přetavenému parafínu přidáme 3 – 5 gramů včelího vosku na 100 gramů parafínu. Zalévání se provádí v kovových rozebíratelných komůrkách, do nichž se umístí zpracováváný materiál. Když je

parafín tuhý, bloček se ořízne tak, aby vrstva parafínu kolem vzorku byla široká 3 – 5 milimetrů a uloží se do označeného sáčku.

Před krájením se bloček přitmelí k dřevěnému špalíčku. Krájení se provádí na sáňkovém mikrotomu (Reichert). Nejprve se bloček musí nahrubo prokrájet k vlastní tkáni. Pak se nařídí hlavice mikrometrického šroubu na žádanou tloušťku řezů a krájí se tenké řezy o tloušťce 5 – 7 mikrometrů. Parafínové řezy se opatrně přenášejí do kapky destilované vody na podložním sklíčku. To je předem nutno potřít směsí bílku s glycerolem, aby se řez na sklíčko přilepil a později během barvení ze sklíčka neodplaval.

Směs glycerolu s bílkem

K vaječnému bílku přidáme stejné množství glycerolu, ušleháme a přefiltrujeme. K filtrátu přidáme malý kousek kafru za účelem konzervace.

Řez se na podložním sklíčku napne pomocí preparačních jehel a sklíčko se položí na elektrickou plotnu, která je zahřátá na 40°C. Když se řez narovná, sejme se z plotny a přebytečná destilovaná voda se nechá odkapat nebo se odsaje filtračním papírem. Podložní sklíčko se označí pomocí diamantu číslem zpracovávaného vzorku a uloží se do termostatu vyhřátého na 38°C až 40°C.

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

Zamontování do kanadského balzámu

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

3.2.3 HISTOLOGICKÁ BARVENÍ PRO SVĚTEL. MIKROSKOPII

1. HEMATOXYLIN A EOSIN

odparafinování: 3x xylén5 min
96 % ethanol.....5 min
70 % ethanol5 min
destilovaná voda5 min
otření sklíček

barvení: hematoxylin6 - 8 min
pramenitá voda10 min (modření)
otření sklíček
eosin2 min
destilovaná voda – opláchnutí

odvodnění: 2x 96 % ethanol – opláchnutí
ethanol – xylén (2:1)....3 min
ethanol – xylén (1:2)....3 min

projasnění: 3x xylén3 min
otření sklíček

zamontování do kanadského balzámu

Roztoky:

Hematoxylin Hill

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

Eosin

1 % roztok eosinu v destilované vodě

Výsledek barvení: Jádra buněk, kolagenní vazivo růžově, svalstvo červeně.

2. ZELENÝ TRICHROM (MASSONOVY TRICHROMY)

Roztoky:

Roztok kyselého alkoholu: kyselina octová10 ml
96% ethanol990 ml

Roztok kyselého fuchsinu – ponceau: roztok A1 díl
roztok B2 díly

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

kyselý fuchsin2 g
destilovaná voda200 ml
kyselina octová2 ml

Roztok B: postup jako u roztoku A

ponceau 2R2 g
destilovaná voda200 ml
kyselina octová2 ml

Roztok oranže G a kyseliny fosfomolybdenové:

destilovaná voda200 ml
kyselina fosfomolybdenová10 g
oranž G4 g

Roztok metylenové zeleně:

destilovaná voda100 ml
metylenová zeleň0,2 g
kyselina octová0,5 ml

Barvení:

hematoxylin.....4 min
destilovaná voda – opláchnutí
diferenciace v kyselém alkoholu za kontroly mikroskopem
pramenitá voda5 min
destilovaná voda – opláchnutí
kyselý fuchsin-ponceau...4 min
1% kyselina octová – opláchnutí

diferenciace roztokem oranže G a kyseliny fosfomolybdenové za kontroly
v mikroskopu (až kolagenní vazivo zůstane téměř bezbarvé)

1% kyselina octová – opláchnutí

metylenová zeleň2,5 min

1% kyselina octová – 3x opláchnutí

Odvodnění: 96% ethanol.....3 min

ethanol – xylen (2:1)3 min

ethanol – xylen (1:2)3 min

Projasnění: 3x xylen3 min

otření sklíček

Zamontování do kanadského balzámu

Výsledek barvení: kolagenní vlákna zbarvena zeleně

3. PEARLSOVA REAKCE NA TROJMOCNÉ ŽELEZO

odparafinování: 3x xylen5 min

96 % ethanol.....5 min

70 % ethanol5 min

destilovaná voda5 min

otření sklíček

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

destilovaná voda (vypírání).....5 min

jádrová červeň (dobarvení).....několik s

odvodnění: 2x 96 % ethanol – opláchnutí
ethanol – xylén (2:1)....3 min
ethanol – xylén (1:2)....3 min

projasnění: 3x xylén3 min
otření sklíček

zamontování do kanadského balzámu

Výsledek barvení:

Trojmocné železo je zbarveno modře, jádra buněk červeně

4. WEIGERTŮV ŽELEZITÝ HEMATOXYLIN – VAN GIESONŮV PIKROFUCHSIN

odparafinování: 3x xylén5 min
96 % ethanol.....5 min
70 % ethanol5 min
destilovaná voda5 min
otření sklíček

barvení:

Weigertův hematoxylin..... 15 – 20 min
pramenitá voda5 min
destilovaná voda.....opláchnutí
pikrofuchsin.....5 – 10 min
destilovaná voda.....opláchnutí (rychle)
ethanol 70%opláchnutí (rychle)
ethanol 80%.....opláchnutí (rychle)
ethanol 96%.....opláchnutí
ethanol 96%.....opláchnutí
ethanol – xylén 2:1.....opláchnutí
ethanol – xylén 1:2.....opláchnutí
3x xylén3 min

Roztoky:

Weigertův železitý hematoxylin

roztok A

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

hemtoxylin 1,0 m

roztok B

destilovaná voda95,0 ml

chlorid železitý.....0,6g

HCl.....0,75 ml

Roztok A : Roztok B = 1:1

Pikrofuchsin:

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

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

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

výsledek barvení:

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

4. VÝSLEDKY

Nejprve jsme provedli orientační pilotní studii, která ukázala základní parametry podávání laktoferinu, následně jsme na ni navázali studií vlivu laktoferinu na model akutního infarktu myokardu.

4.1 PILOTNÍ STUDIE

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

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

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

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

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

4.2 VLIV LF NA MODEL AKUTNÍHO INFARKTU MYOKARDU

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

Získané hodnoty a veličiny týkající se podání Lf a ISO konkrétním potkanům sloužily k indexaci a grafickému znázornění vztahu podání isoprenalinu, laktoferinu nebo laktoferinu a isoprenalinu na vitální funkce srdce .

- index vlhké hmotnosti komor (wet ventricle index)
- index srdečního výdeje (cardiac index)
- histologické zhodnocení

Index vlhké hmotnosti komor (wet ventricle index)

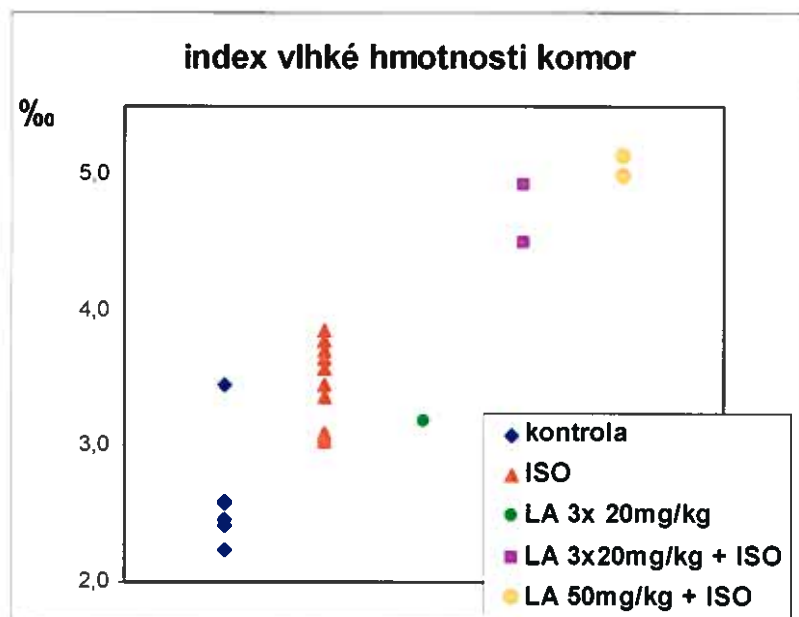
Index vlhké hmotnosti komor představuje poměr hmotnosti komor a hmotnosti zvířete [‰]. Index má u zdravého kontrolního zvířete nízké hodnoty - přibližně 2,5 ‰, nevyskytuje se zde žádný otok.

Hodnoty od 3,0 do 4,0 ‰ vykazuje vzorek s isoprenalinem. Zvýšení indexu je dáno navozením IM.

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

Markantně vyšší hodnoty 4,0 až 5,0 ‰ byly dosaženy u kombinací opakovaného podání Lf (3x20 mg/kg) a ISO (LAI1 a LAI2) a kolem 5,0 ‰ u případů s jednorázovým podáním Lf 50 mg/kg + ISO (LAI3 a LAI4) (viz Graf č. 1).

Graf č. 1: Index vlhké hmotnosti komor



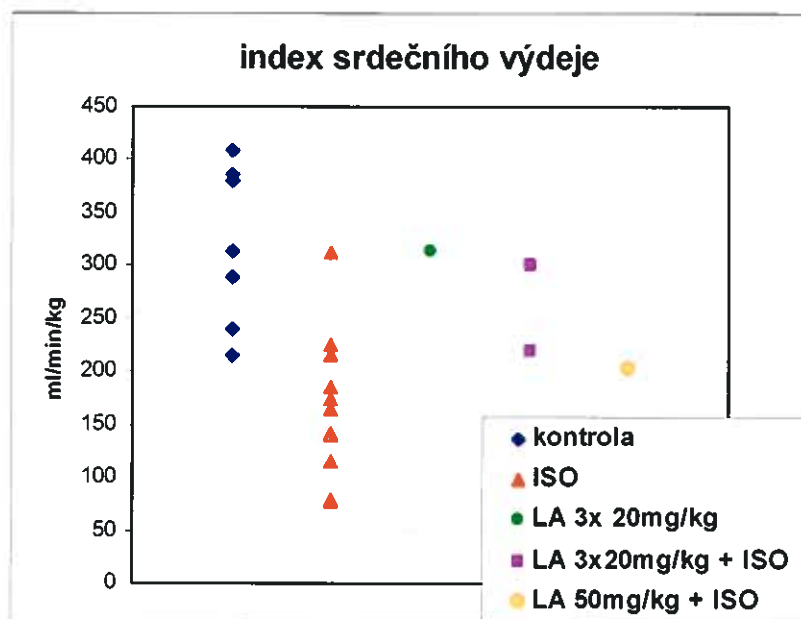
Index srdečního výdeje (cardiac index) [ml/min/kg]

Index srdečního výdeje je poměr srdečního výdeje [ml/min] a hmotnosti zvířete [kg]. Vyšší hodnoty tohoto indexu (až do 400 ml/min/kg) představují zdravá srdce (kontrola).

Po aplikaci isoprenalinu v nekrogenních dávkách (25 mg) dochází k ischemizaci myokardu, což se projeví poklesem srdečního výdeje - krajní hodnoty až pod 100 ml/min/kg. Hodnota u LA1 (opakované podání Lf 3x20 mg/kg) se blížila hodnotě 300 ml/min/kg, po podání Lf 3x20 mg/kg + ISO (LAI1 a LAI2) se hodnoty pohybovaly v rozmezí 200 až 300 ml/min/kg a při jednorázovém podání Lf 50 mg/kg + ISO (LAI3 a LAI4) kolem 200 ml/min/kg (viz Graf č. 2).

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

Graf č. 2: Index srdečního výdeje



Jak se ukázalo už v pilotní studii, podání laktoferinu vyvolává u experimentálních jedinců výrazný zásah do integrity jejich organismu. Tyto změny jsme mohli pozorovat i v makroskopickém měřítku (otok, hematurie).

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

Histologické zhodnocení

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

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

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

Při středním a větším zvětšení vidíme, že svalové buňky v oblasti čerstvého infarktu jsou dobře ohraničené, zachovávají svůj tvar, ale jejich cytoplasmy se stává abnormálně eozinofilní. Příčné pruhování je v některých kardiomyocytech

zachováno, v některých však již nebylo pozorovatelné. Na některých úsecích byla patrná i forma hrubšího granulárního rozpadu takto postižených buněk (obr. 2 a 3). Jádra v takovýchto oblastech se rozpadla karyolýzou nebo karyorexií. Na určitých úsecích hranice nekrotické a zachovalé tkáně byly pozorovatelné i průřezy dystroficky změněnými myocyty s výrazným hydropickým vakuolizováním cytoplazmy (obr.4). Velmi nápadným nálezem byla přítomnost leukocytálního infiltrátu v interstitiu a rovněž výrazná leukostáza v kapilárách myokardu (obr. 5). Zvláště na přehledných podélných řezech je dobře patrný gradient směru a hustoty leukocytálního infiltrátu od střední části myokardu ke jeho hrotu (obr. 6).

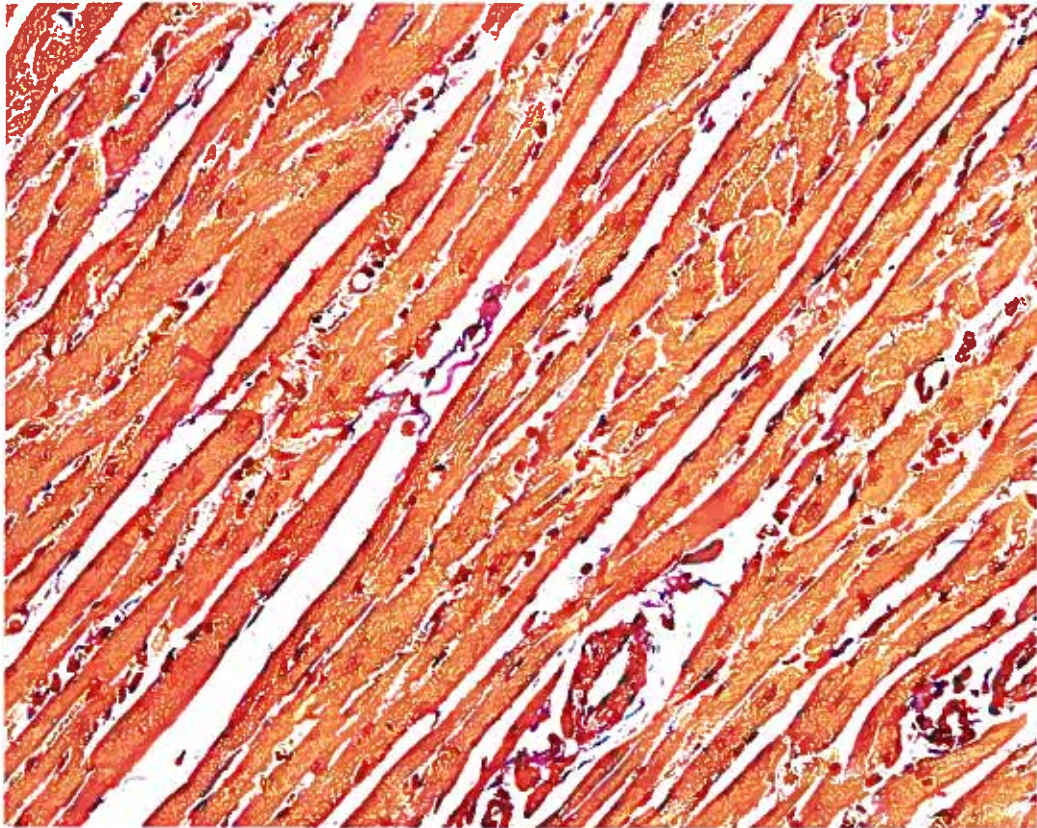
Při větším zvětšení bylo možné tento infiltrát lokalizovat jednak v subendokardiálních oblastech (tam měl dokonce ložiskový charakter), jednak v obdobném uspořádání, ale spíše v difusní formě i v subepikardiálních lokalizacích (obr. 7 a 8).

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

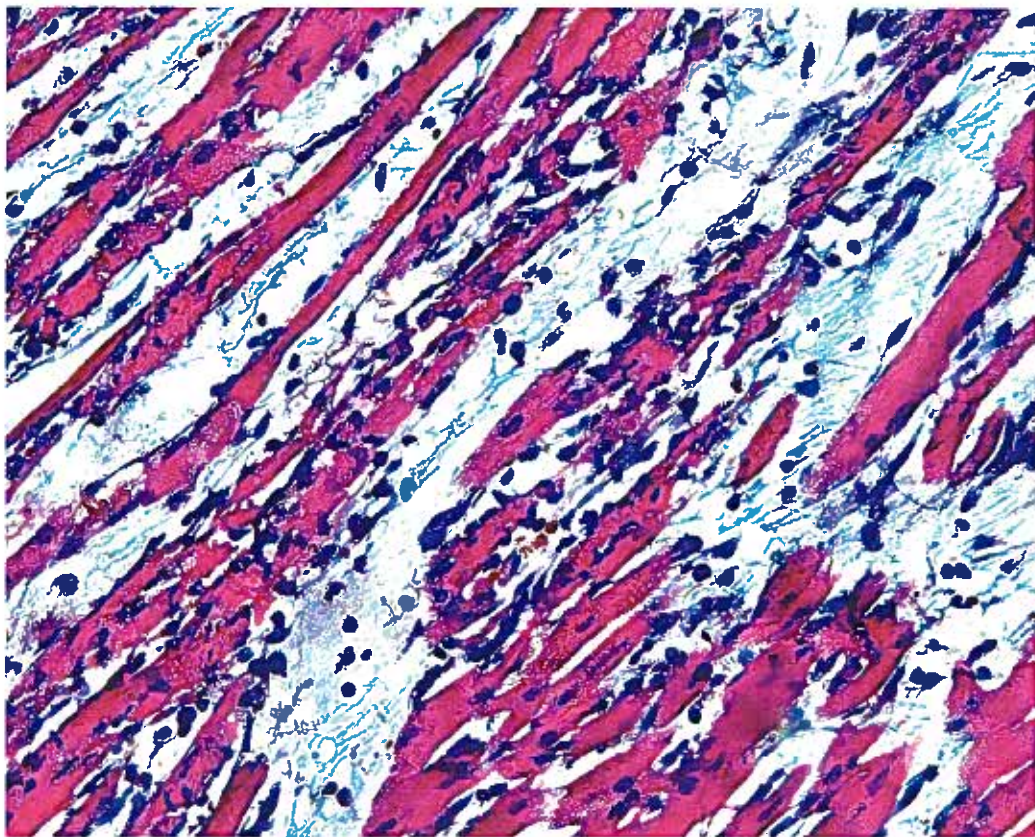
Leukostáza vytvořená v kapilárním řečišti zásobujícím myokard je tvořena převážně nahromaděnými neutrofilními leukocyty. Postupně tyto buňky prostupují intersticiem, které je edematózně prosáknuté a oddaluje od sebe kardiomyocyty intaktní i ty, které již podlely úplné nekróze s rozpadem jader, ztrátou příčného pruhození a zvýšenou eozinofilií cytoplazmy, způsobenou koagulací bílkovinných komponent (obr.9).

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

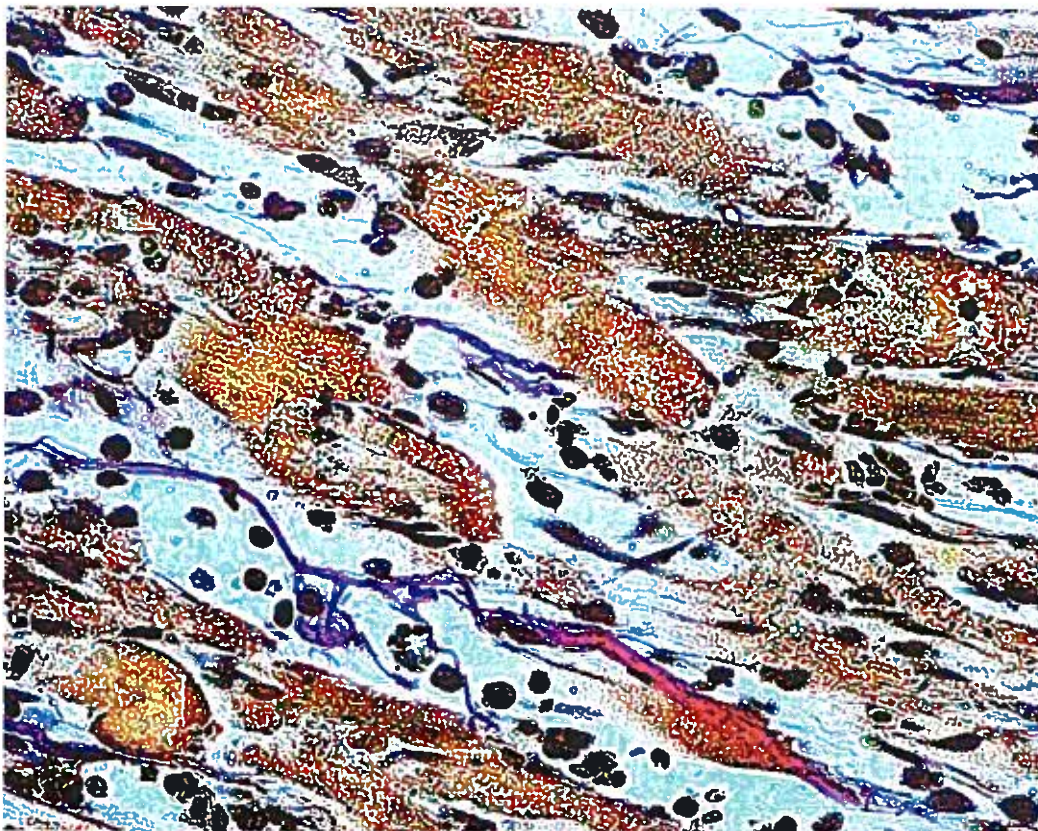
Nutno poznamenat, že tento typ ischemické nekrózy v čase odběru po 24 hod od expozice isoprenalinu neměl ještě zaznamenané charakteristické znaky pozdních změn akutního infarktu myokardu – tj. ložiska kompletního rozpadu buněk svalu i intersticia s demarkační linií leukocytárního valu, jaká jsou v takovýchto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



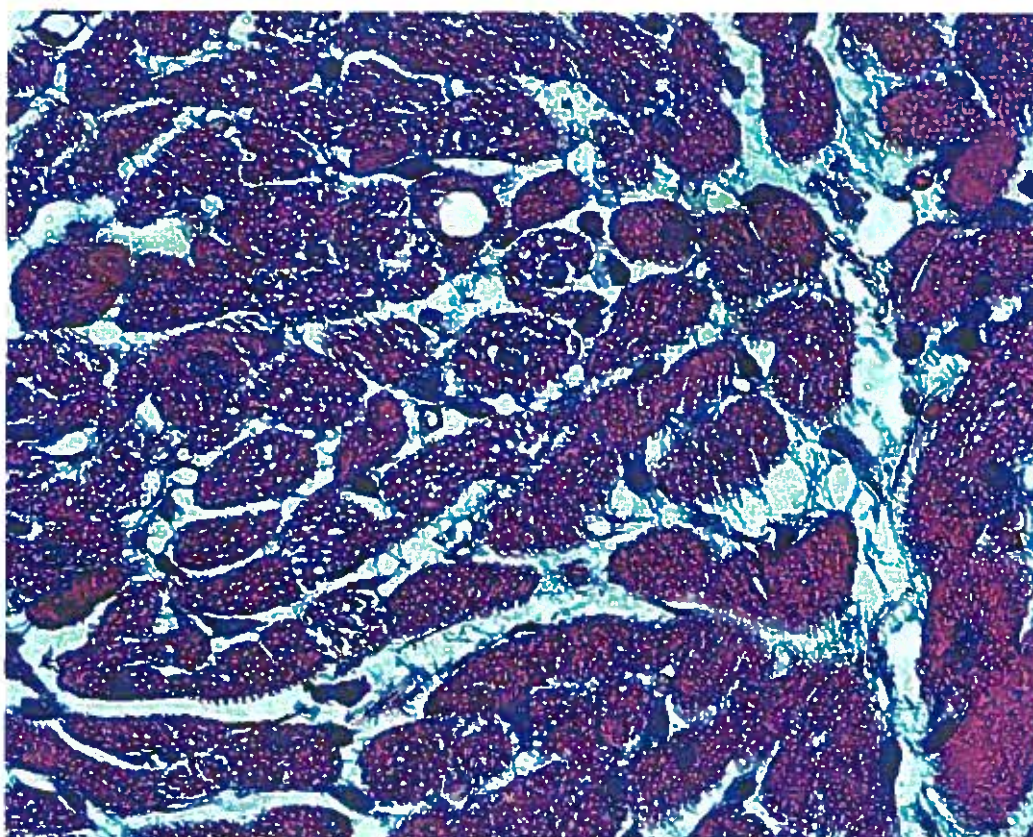
Obr.1 – LACT+ISO – KONTROLA - zdravý myokard – barvení W-G, zv. 100 x



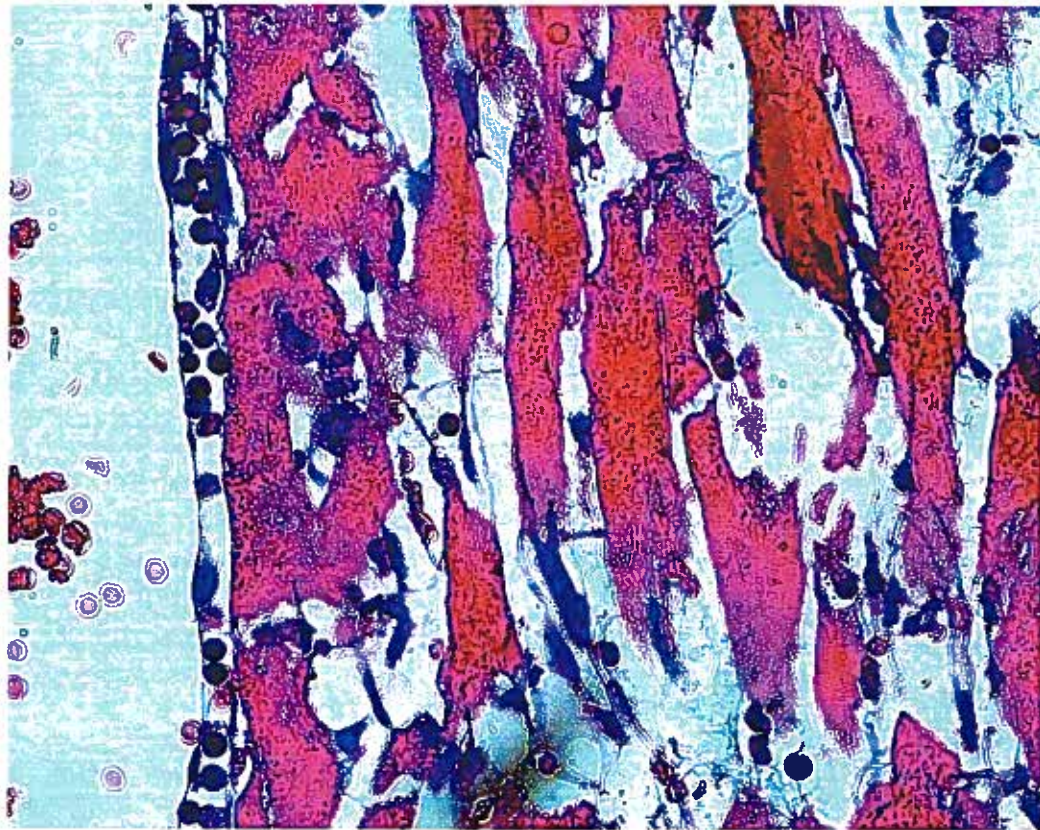
Obr.2 – LACT+ISO – myokard – barvení H-E, zv. 100x



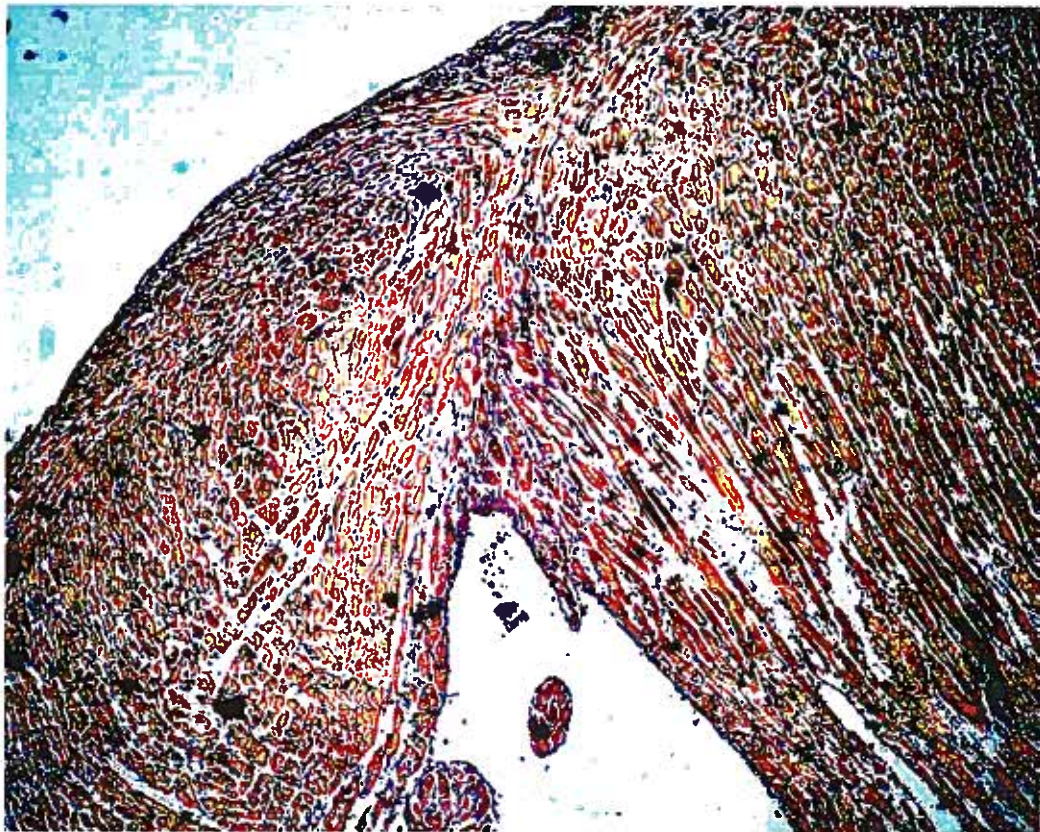
Obr.3 – LACT+ISO – myokard - barvení W-G, zv. 400 x



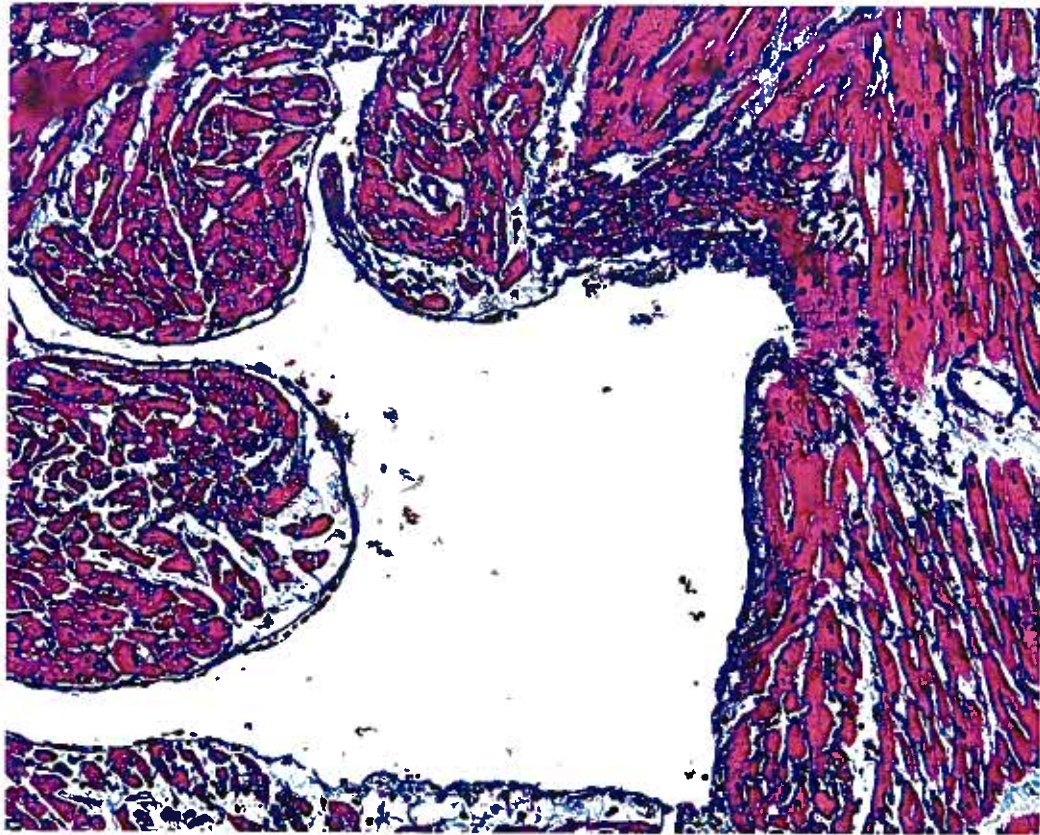
Obr.4 – LACT+ISO – myokard- barvení H-E, zv.40 x



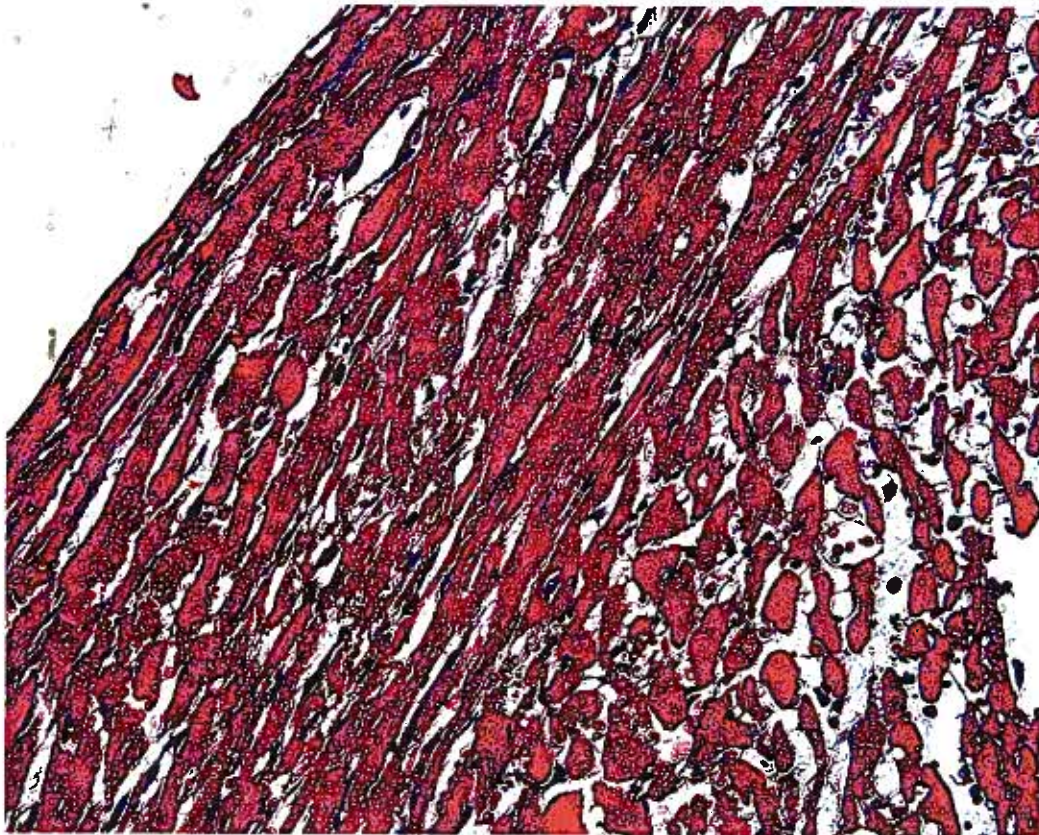
Obr.5– LACT+ISO – myokard – barvení H-E, zv. 400 x



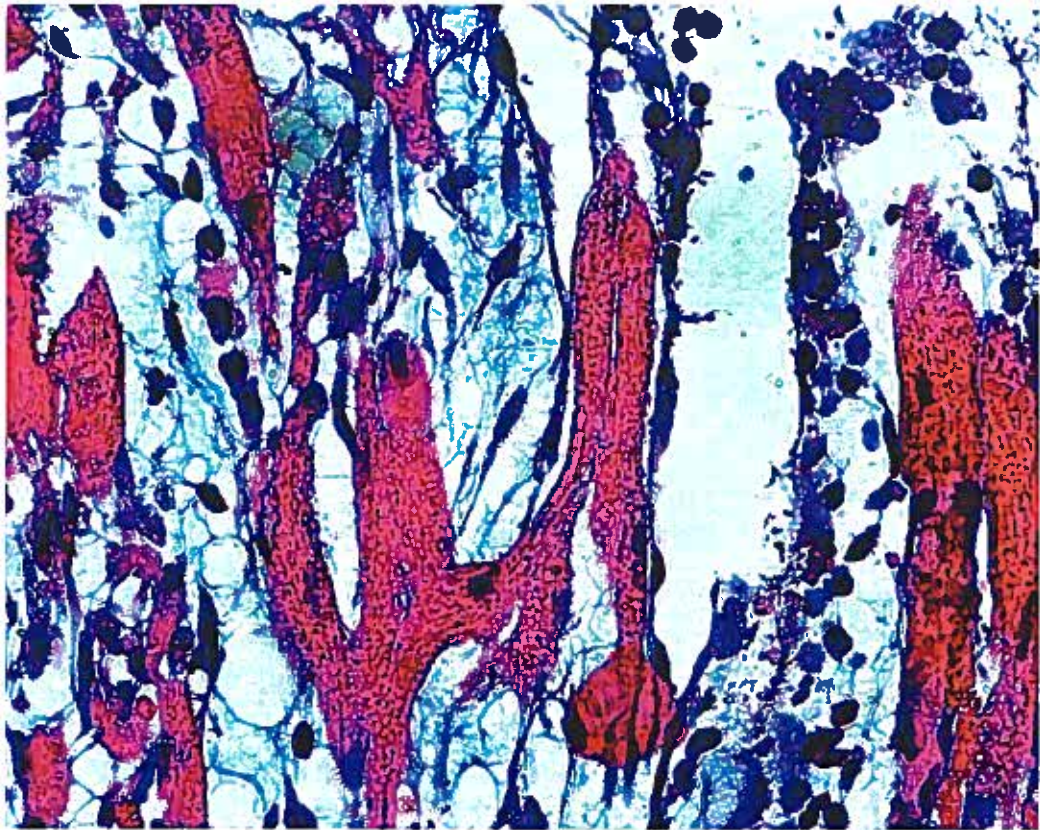
Obr.6 –LACT+ISO – myokard – barvení W-G, zv. 40 x



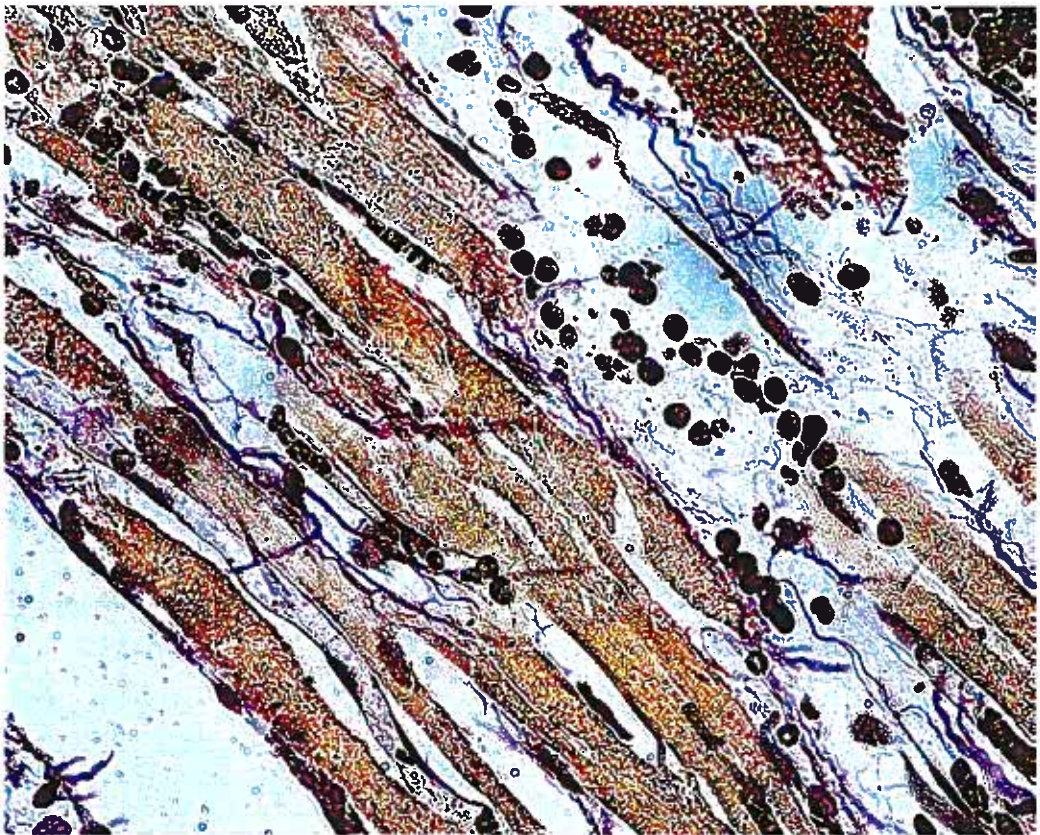
Obr.7 – LACT+ISO – myokard – barvení H-E, zv.100 x



Obr.8 – LACT+ISO – myokard – barvení H-E, zv. 100 x



Obr. 9 – LACT+ISO – myokard – barvení H-E, zv. 400 x



Obr.10 – LACT+ISO – myokard – barvení W-G, zv. 400 x

5. DISKUZE

V současné době probíhá intenzivní studium látek, které by mohly mít protektivní účinky při ischemicko-reperfuzním poškození myokardu.

Jednou z možných cest je použití železo-chelatačních látek. Tyto látky chelatují volné ionty železa, které katalyzují vznik velmi nebezpečných reaktivních kyslíkových radikálů. Protektivní účinek už byl prokázán např. u deferoxaminu.

Deferoxamin je silný chelátátor železa, které je pak v komplexu převážně trojmocné Fe^{3+} a tedy oxidoredukčně málo aktivní. Chelatace železa blokuje Fentonovu reakci, tím že snižuje přístup železa pro tvorbu ROS. Je publikována řada studií účinku deferoxaminu na kardiovaskulární poškození, závěry však nejsou jednoznačné. Vzhledem ke krátkému poločasu deferoxamin nelze užívat preventivně k protekci před oxidačním stresem vyvolaným chemickými látkami. Deferoxamin se užívá k léčbě stavů spojených s patologickou kumulací železa v organizmu (46).

V naší studii jsme se zaměřili na v lidském těle se přirozeně vyskytující látku laktoferin (Lf). Tento glykoprotein, který má 260x vyšší afinitu k železu než transferin, se vyskytuje v mnoha tkáních, orgánech i tekutinách lidského těla. V organismu vykazuje velké spektrum účinků a ovlivňuje množství procesů, jeho role ale ještě není zcela přesně definována. V současné době je studován především vzhledem k jeho imunomodulačnímu a antibakteriálnímu působení. Účinek Lf u patologických stavů vyvolaných volnými kyslíkovými radikály in vivo ještě nebyl detailněji studován.

Jako vhodný model studia nejzávažnější formy ICHS infarktu myokardu jsme použili isoprenalinový model. Poprvé byl sledován účinek Lf a histologické změny po jeho podání v souvislosti s ischemicko-reperfuzním poškozením myokardu.

Hodnotili jsme patologické změny po podání isoprenalinu pomocí analýzy funkčních parametrů a histopatologického vyšetření. Při ischemicko-reperfuzním poškození myokardu hraje velmi důležitou roli železo. Byla plánována lokalizace depozita železa ve strukturách poškozeného myokardu.

Avšak i přes opakované použití specifických metod i jejich modifikací se toto nepodařilo. Sledování změn v transportu a depozici železa by bylo vhodné ke zjištění úlohy Lf při tomto poškození.

Nejprve jsme provedli orientační pilotní studii, která ukázala základní parametry podávání Lf. Při této studii se ukázalo, že Lf vyvolává výrazný zásah do integrity organismu experimentálních jedinců. Pozorovali jsme makroskopické změny (otok, hematurie) po i.v. podání nejvyšší dávky Lf (100 mg/kg) .

Následně jsme provedli studii, při které jsme podávali Lf 3 po sobě následující dny nebo v jednorázové i.v. dávce, bohužel nedošlo k předpokládanému zřetelně protektivnímu účinku laktoferinu při ischemickém poškození myokardu. Očekávaný výsledek sice nebyl prokázán, ale vzhledem k malému počtu experimentálních jedinců, jej nemůžeme zcela jednoznačně vyloučit. Na jednom experimentálním jedinci s opakovaným podáním laktoferinu, se ukázala možnost pozitivního působení při ischemii navozené následným podáním isoprenalinu. Parametry poškození zde nebyly tak výrazné jako u jiných jedinců.

Při histopatologickém vyšetření jsme se zaměřili na Lf navozené změny na myokardu. Při studiích distribuce Lf do různých orgánů, bylo zjištěno, že převážné množství (32%) Lf je po 60 min po i.v. podání distribuováno do jater. Určité množství (6%) zůstává zachováno v plasmě, kde se Lf váže na leukocyty, monocyty a lymfocyty. Minoritní množství se objevuje v dalších orgánech, např.: v plicích, ledvinách a slezině (16). Při dalším výzkumu by proto bylo vhodné se soustředit také na zhodnocení účinků Lf na jiné orgány než je myokard.

V naší studii jsme podávali Lf pouze i.v. cestou aplikace v krátkém dávkovacím intervalu. U jedné skupiny zvířat po 3 dny u druhé skupiny jednorázově. Již dříve bylo zjištěno, že dlouhodobé p.o. podávání Lf hraje důležitou roli v ovlivnění imunity a může preventivně působit při vzniku tumoru a metastáz (19). Proto by bylo vhodné studium vlivu Lf při podávání p.o. cestou aplikace. Pro odhalení protektivních účinků v souvislosti s předpokládaným vlivem na

imunitní systém, by bylo vhodné sledování účinků při dlouhodobém podávání Lf v různých dávkovacích schématech.

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

6. ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce jsme zpracovali současné vědecké poznatky o struktuře, vlastnostech, účincích laktoferinu a změnách myokardu, které nastávají během ischemicko-reperfuzního poškození.

Byla provedena pilotní studie, která ukázala základní parametry podávání laktoferinu, následně na ni navázala studie vlivu laktoferinu na model akutního infarktu myokardu. Pro studium infarktu myokardu jsme vybrali isoprenalinový model. V celkové anestezii jsme provedli měření srdečního výdeje a odvozených parametrů s využitím Stewartovy-Hamiltonovy termodiluční metody. Měření probíhalo za použití plně komputelizovaného přístroje pro měření srdečního výdeje a odvozených parametrů Cardiosys®, software Cardiosys V 1.1.

Histopatologické vyšetření zahrnovalo odběr vybraných tkání, zpracování konvenční histologickou technikou pro světelnou mikroskopii (Bouinova fixační tekutina a zalití do parafinových bloků) a vlastní barvení pro vyhodnocení nálezů světelnou mikroskopií (hematoxylin-eosin, zelený trichrom, Perlsova reakce a Weigert-Van Gieson). Obarvené preparáty jsme pozorovali pod světelným mikroskopem. Následně jsme provedli jejich fotodokumentaci a nálezy prezentovali v obrazové dokumentaci.

Pro studium vlivu chelátoru železa laktoferinu na model akutního IM byly použity prostředky na z grantu GA UK 98/2005/C/FaF. Tato práce by mohla být využita při dalším studiu protektivního účinku laktoferinu při poškození myokardu. Zejména by bylo vhodné stanovit jeho účinky při dlouhodobém p.o. podávání v různých dávkovacích schématech.

7. LITERATURA

1. BAKER H. M., BAKER E.N. : *Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release*. *BioMetals* 2004; 17:209-216
2. KANYSHKOVA T.G., BABINA S.E., SEMENOV D.V., ISAEVA N., VLASSOV A. V., NEUSTROEV K.N., BUNEVA V.N., NEVINSKY G.: *Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin*. *Eur. J. Biochem.* 2003; 270:3353-3361
3. ABDALLAH F.B., EL HAGE CHAHINE J.M. : *Transferrins: iron release from lactoferrin*. *J Mol Biol.* 2000 Oct 20,303(2):255-266
4. SANCHES L., LUJAN L., ORIA R., CASTILLO H., PEREZ D., ENA C. M.,CALVO M.: *Synthesis of lactoferrin and transport of transferrin in the lactating mammary gland of sheep*. *J Dairy Sci* 1992; 75:1257-1262
5. NAGASAKO Y., SAITO H.,TAMURA Z., SHIMAMURA S., TOMITA M.: *Iron binding properties of bovin lactoferrin in iron rich solution*. *J Dairy* 1993; 76:1876-1881
6. STEIJNS J.M., VAN HOOIJDONK A.C.M.: *Occurence structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin*. *Br J Nutr.* 2000 Nov,84 Suppl 1:S11-7
7. RAGHUVeer TS, MCGUIRE EM, MARTIN SM, WAGNER BA, REBOUCHE CJ, BUETTNER GR, WIDNESS JA. *Lactoferrin in the preterm infants' diet attenuates iron-induced oxidation products*. *Pediatr Res.* 2002 Dec;52(6):964-72.
8. ABRINK M., LARSSON E., GOBL A., HELLMAN L. : *Expression of lactoferrin in the kidney : Implications for innate immunity and iron metabolism*.*Kidney Int.* 2000 May; 57(5):2004-10
9. BROCK J.H.: *The pysiology of lactoferrin*.*Biochem Cell Biol.* 2002,80(1):1-6

10. FURMANSKI P., LI Z., FORTUNA M.B., SWAMY V.B., RAMACHANDRA M. : *Multiple molecular forms of human lactoferrin*. J Exp Med 1989, Jan; 170:415-429
11. RADO T.A., BOLLEKENS J., ST. LAURENT G., PARKER L., BENZ E.J.: *Lactoferrin biosynthesis during granulocytopenia*. Blood. 1984 Nov; 64(5):1103-9
12. HARADA E., ITOH Y., SITIZYO K., TAKEUCHI T., ARAKI Y., KITAGAWA H. : *Characteristic transport of lactoferrin from the intestinal lumen into the bile via the blood in piglets*. Comparative Bioch. Phys 1994; 124:321-327
13. STEIJNS J.M., HOOIJDONK A.C.M.: *Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin*. 2000; Br. J. Nutr. 84 (suppl): s11-s17
14. SUZUKI Y., LÖNNERDAL B.: *Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor*. Biochem. 2001; 40:15771-9
15. HE H., FURMANSKI P.: *Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA*. 1995; Nature 37, 3:721-4
16. TROOTS F. J., STEIJNS J., SARIS W.H.M., Brummer R.J.M. : *Gastric digestion of bovine lactoferrin in vivo in adults*. J. Nutr. 2001; 131:2101-2104
17. APPELMELK B.J., AN Y., GEERTS M., Thijs B.G., de Boer H.A., McLaren D.M., de Graaff J., Nuijens J.H.: *Lactoferrin is a lipid A - binding protein*. Inf and Immun 1994, Jun;(62)6:2628-32

18. FARNAUD S., EVANS R.W. : *Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties*. Mol Immunol. 2003 Nov, 40(7):395-405
19. KRUZEL M.L., ZIMECKI M. : Lactoferrin and immunologic disonance: clinical implication. Immun Therap Exper. 2002; 50, 399-410
20. FUJITA K-I., MATSUDA E., SEKINE K., IIGO M., TSUDA H.: *Lactoferrin enhances Fas expression and apoptosis in the colon mucosa of azoxymethame-treated rats*. Carcinog. 2004; (25) 10: 1961-6
21. MASOPUST J.: *Patobiochemie buňky*. 2003, Karolinum, Praha
22. DAMIENS E., MAZURIER J., EL YAZIDI I., MASSON M., DUTHILLE I., SPIK G., BOILLY-MARRIER Y.: *Effects of human lactoferrin on NK cell cytotoxicity against haematopoietic and epithelial tumor cells*. BioChim. Biophys. Acta. 1998 Apr;1402 (3):227-87 (Abstrakt)
23. NORRBY K., MATTSY – BALTZER I., INNOCENTI M., TUNEBERG S.: *Orraly administered bovine lactoferrin systematically inhibits VEGF165 – mediated angiogenesis in the rats*. Int J Cancer 2001; 91:236-240
24. DAMIENS E, YAZIDI EL. I, MAZURIER J, DUTHILLE I, SPIK G, BOILLY-MARER Y.: *Lactoferrin inhibits G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of human breast carcinoma cells*. J Cell Biochem. 1999 Sep 1;74(3):486-98.
25. TSUDA H., OHSHIMA Y., NOMOTO H., FUJITA K., MATSUDA E., IIGO M., TAKASUKA N., MOORE M.A.: *Cancer prevention by natural compounds – review*. Drug Met Pharm 2004; 19(4):245-263
26. BAVEYE, S., E. ELASS, D. G. FERNIG, C. BLANQUART, J. MAZURIER, AND D. LEGRAND. 2000. *Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits the expression of endothelial adhesion*

molecules, *E*-selectin, and ICAM-1, induced by the CD14-lipopolysaccharide complex. *Infect. Immun.* 68:6519-6525

27. ELASS E., MASSON M., MAZURIER J., LEGRAND D.: *Lactoferrin inhibits the lipopolysaccharides-induced expression and proteoglycan-binding ability of IL-8 in human endothelial cells.* *Infect Immun* 2002 Apr; 70(4):1860-6 (Abstrakt)
28. CROUCH S.P.M., SLATER K.J., FLETCHER J.: *Regulation of cytokine release from mononuclear cells by iron-binding protein lactoferrin.* *Blood.* 1992 Jul; 80(1):235-40
29. ZIMECKI M., MAZURIER J., SPIK G., KAPP J.A.: *Lactoferrin inhibits proliferative responses and cytokine production of TH1 but not TH2 cell lines.* *Arch Immunol Ther Exp (Warsz.)* 1996; 44(1):51-6 (Abstrakt)
30. SAWATZKI G, RICH IN.: *Lactoferrin stimulates colony stimulating factor production in vitro and in vivo.* *Blood Cells.* 1989;15(2):371-85
31. MINCHEVA-NILSSON L, HAMMARSTROM S, HAMMARSTROM ML: *Activated human gamma delta T lymphocytes express functional lactoferrin receptors.* *Scand J Immunol.* 1997 Dec;46(6):609-18.
32. ZIMECKI M., SPIEGEL K., WLASZCYK A., KUBLER A., KRUZEL M.L.: *Lactoferrin increase the output of neutrophil precursors and attenuates the spontaneous production of TNF-alpha and interleukin 6 by peripheral blood cells.* *Arch Immunol Ther Exp (Warsz.)* 1999; 47(2):113-8
33. BALDWIN D.A., JENNY E.R., AISEN P.: *The effect of human serum transferrin and milk lactoferrin on hydroxyl radikal formation from superoxide and hydrogen peroxide.* 1984 Jul; *J Biol Chem* (259):21, 13391-4

34. KUWATA H., YIP T., YAMAUCHI K., TERAGUCHI S., HAYASAWA H., TOMITA M., HUTCHENS T.W. : *The survival of ingested lactoferrin in the gastrointestinal tract of adult mice*. *Biochem. J.* 1998; 334:321-323
35. NAVEZE S., ELASS E., MAZUIER J., LEGRAND D.: *Lactoferrin inhibits the binding of lipolysacharides to L-selectin and subsekvent production of reactive oxygen species by neutrofilis*. *Febs Let* 2000;469(1):5-8
36. GRINNA, L.S.: *Age related changes in the lipids of the microsomal and the mitochondrial membranes of rat liver and kidney*. *Mech. Ageing Dev.* 6: 197-205 1977
37. ZIMA, T., : *Laboratorní diagnostika*, Galén, Praha, 2002, 38-40
38. PÁCAL, L., KAŇKOVÁ, K.: *Novější poznatky o metabolismu člověka a jeho poruchách*, *Časopis lékařů českých*, Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 1/2004, Praha, 2004, 9-14
39. VOKURKA, M., NEČAS, E.: *Hepcidin – peptid regulující množství a distribuci železa v organizmu ve zdraví a nemoci*, Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 8/2003, Praha, 2003, 465-469
40. MASOPUST, J.: *Klinická biochemie*, Karolinum, Praha, 1998, 627-632
41. KAPLAN, J.: *Mechanisms of Cellular Iron Acquisition : Another Iron in the Fire*, *Cell*, volume 111, 2002, 803-806
42. CONNOR, J. R., BEARD, J. L.: *Dietary iron supplements – Use or not to use?*, *Nutrition, Today*, 1997. (http://www.findarticles.com/p/articles/mi_m0841/is_n3_v32/ai_19588769/pg_3)
43. CRICHTON, R. R., WILMET, S., LEGSSYER, R., WARD, R. J.: *Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells*, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, 9-18

44. HARRISON, P. M., AROSIO, P.: *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*, Biochim Biophys Acta, 1996, 1275(3):161-203 (Abstract)
45. ANDREWS, N. C.: *Disorders of Iron Metabolism*, The New England Journal of Medicine, Medical Progress, 1999, 1986-1995
46. ŠTÍPEK, S., et AL.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*, Grada Publishing, spol. s. r. o., Praha, 2000, 21-23, 27, 54-55, 65-70, 76, 117, 286
47. DUFFY, S. J., BIEGELSEN, E. S., HOLBROOK, M., RUSSELL, J. D., GOKCE, N., KEANEY, J. F., VITA, J. A.: *Iron chelation improves endothelial function in patients with coronary artery disease*. Circulation, 2001, 103:2799-2804
48. VACEK Z.: *Histologie a histologická technika*. 1998, Avicenum, str. 286 - 359