

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

katedra biologických a lékařských věd

LAKTOFERIN – mechanismy biologického účinku

(diplomová práce)

Hradec Králové, 2006

Jitka Koutníková

Dovoluji si poděkovat panu Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení a udílení cenných rad v průběhu celé diplomové práce a panu Mgr. Přemyslu Mladěnkovi za spolupráci při experimentu. Dále bych chtěla poděkovat paní Pavlíně Jabůrkové za trpělivost a pomoc při zpracovávání praktické části diplomové práce. Pro tuto práci byly čerpány prostředky z grantu GA UK 94/2006/C/Faf. Také děkuji všem ostatním členům Katedry biologických a lékařských věd a Katedry farmakologie a toxikologie za poskytnuté rady a zkušenosti.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	5
1. ÚVOD.....	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. ZÁKLADNÍ INFORMACE O ROLI ŽELEZA V ORGANISMU	10
2.2. VOLNÉ RADIKÁLY	13
2.2.1. ANTIOXIDAČNÍ OCHRANNÝ SYSTÉM.....	13
2.2.2. PROLOMENÍ ANTIOXIDAČNÍ OCHRANY	14
2.3. KLÍČOVÁ ÚLOHA ŽELEZA V OXIDAČNÍM POŠKOZENÍ ORGANISMU	14
2.4. MITOCHONDRIE	15
2.5. METABOLISMUS ŽELEZA	16
2.5.1. TENKÉ STŘEVO – INTESTINUM TENUE.....	17
2.5.2. STŘEVNÍ TRANSPORT ŽELEZA.....	18
2.5.3. CÍRKULACE A BUNĚČNÝ VÝCHYT ŽELEZA.....	22
2.5.4. NESTABILNÍ ZÁSOBA ŽELEZA	26
2.5.5. MAKROFÁGOVÁ RECYKLACE ŽELEZA.....	27
2.5.6. ZÁNĚTLIVÁ REGULACE	27
2.5.7. ZTRÁTY ŽELEZA.....	28
2.6. HEMOCHROMATÓZA.....	28
2.7. TRANSFÚZNÍ SIDERÓZA	29
2.8. ŽELEZO A KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ.....	30
2.9. VOLNÉ RADIKÁLY A CHOROBY KARDIOVASKULÁRNÍHO SYSTÉMU.....	31
2.9.1. OXID DUSNATÝ A KARDIOVASKULÁRNÍ SYSTÉM.....	32
2.9.2. OXIDACE LIPOPROTEINOVÝCH KOMPONENT A ATEROSKLEROSA	33
2.9.3. ISCHEMICKO-REPERFÚZNÍ SYNDROM	33
2.9.4. VOLNÉ RADIKÁLY PRODUKOVANÉ PŘI DEFINOVANÝCH KARDIOVASKULÁRNÍCH CHOROBÁCH	35
2.10. CHELATAČNÍ TERAPIE	37
2.10.1. DEFEROXAMIN.....	37

2.11. LAKTOFERIN.....	37
2.11.1. STRUKTURA LAKTOFERINU	37
2.11.2. VLASTNOSTI LAKTOFERINU	38
2.11.3. VÝSKYT A ÚČINKY LAKTOFERINU	38
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	43
3.1. METODICKÁ ČÁST	44
3.1.1. ZVÍŘATA	44
3.1.2. CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJE	44
3.1.3. PILOTNÍ STUDIE	45
3.1.4. MODEL AKUTNÍHO INFARKTU MYOKARDU	45
3.1.5. PODÁNÍ LAKTOFERINU	48
3.2. HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ	49
3.2.1. CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A NÁSTROJE UŽITÉ PŘI HISTOLOGICKÉM ZPRACOVÁNÍ	49
3.2.2. ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU PRO HISTOLOGICKOU ANALÝZU ...	50
3.2.3. HISTOLOGICKÁ BARVENÍ PRO SVĚTELNOU MIKROSKOPII.....	53
4. VÝSLEDKY.....	59
4.1. PILOTNÍ STUDIE	60
4.2. VLIV LAKTOFERINU NA MODEL AKUTNÍHO INFARKTU MYOKARDU	61
4.3. VYHODNOCENÍ HISTOLOGICKÝCH PREPARÁTŮ.....	63
5. DISKUSE	71
6. ZÁVĚR.....	75
Seznam literatury	77
Přílohy	84

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AMK	aminokyselina
ATP	adenosintrifosfát
DCT1	divalentní kationtový transporter (divalent cation transporter)
Dcytb	duodenální cytochrom b
DMT1	divalentní kovový transporter (divalent metal transporter)
2Fe³⁺Tf	diferrický transferin
[Fe-S]	skupina obsahující železo a síru
Ft	feritin
HFE	gen mutovaný u hemochromatózy
ICHS	ischemická choroba srdeční
IM	infarkt myokardu
IRE	element reagující na železo (iron responsive element)
Ireg1	transportér regulovaný železem (iron regulated transporter)
IRP	protein regulovaný železem (iron regulatory protein)
ISO	isoprenalin
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LA	laktoferin
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
LIP	nestabilní zásoba železa (labile iron pool)
MtF	mitochondriální feritin
mRNA	informační (messenger) ribonukleová kyselina
MTP1	protein transportující kov (metal transporter protein)
Nramp	H ⁺ /divalentní kov symportér (natural resistance – associated macrophage protein)
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)
RONS	reaktivní formy dusíku a kyslíku
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
Tf	transferin
TfR	transferinový receptor
UTR	nepřepisovaná oblast mRNA

1. ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění, zvláště ischemická choroba srdeční a infarkt myokardu stojí na čelním místě v pořadí příčin celkové morbiditity a mortality v České republice. V pozadí naprosté většiny případů ischemické choroby srdeční a infarktu myokardu je koronární ateroskleróza. Mezi vedlejší rizikové faktory, jejichž ovlivnění snad sníží riziko kardiovaskulárních onemocnění, by měl být zařazen oxidační stres.

Oxidační stres nastává při porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku. Tento stav se dnes považuje za významný patogenetický faktor v aterogenezi některých akutních či chronických poruch funkce srdce a při stavech, které vytváří pro uvedené nemoci vhodné prostředí a podmínky, jako jsou dysfunkce endotelu a zvýšená agregabilita krevních destiček. K nadměrné tvorbě reaktivních forem kyslíku dochází i při reoxygenaci tkáně po ischemii. Nejtypičtější účast volných kyslíkových radikálů na mechanismu poškození buněk myokardu je možno zjistit při ischemicko-reperfúzním syndromu a vůbec při stavech, které jsou spjaté s hypoxií a s ischemií, jako i při patogenezi aterosklerózy.

Významným katalyzátorem vzniku reaktivních sloučenin kyslíku jsou ionty železa. Železo může také podporovat peroxidaci lipidů, což je rozhodující krok na cestě k aterosklerose. Železo je pro život nezbytné, plní nezastupitelnou roli v mnoha vitálních funkcích. V nadbytečném množství je ale pro organismus škodlivé. Proto musí být jeho množství a kinetika v organismu regulovány. Bylo prokázáno, že zvýšené množství železa souvisí se zvýšenými kardiovaskulárními příhodami. Přetížení železem může být upraveno chelatační terapií. Významným chelátorem železa je deferoxamin, dalším pak laktoferin.

Laktoferin je glykoprotein, který se přirozeně vyskytuje v lidském organismu. Vyskytuje se v mnoha tkáních, orgánech a tekutinách lidského těla. Vykazuje celý komplex účinků a zasahuje do mnoha procesů, ale jeho role zatím není přesně objasněna.

Laktoferin je silný chelátor železa. Chelatuje trojmocné železo a díky této vlastnosti brání tvorbě volných radikálů. Extracelulární železo za normálních podmínek cirkuluje v plazmě navázané na transferin, což je četný protein s mimořádně vysokou afinitou pro železo. Laktoferin patří do stejné skupiny proteinů jako transferin a má dokonce až 260krát vyšší afinitu k železu než transferin. Předpokládáme, že laktoferin bude zabraňovat tvorbě volných radikálů ve tkáních s vysokým metabolickým obratem (játra, ledviny, plíce) a také u ischemicko – reperfučního poškození.

Cílem naší práce bylo charakterizovat účinky laktoferinu v organismu zdravého zvířete a zvířete s indukovaným infarktem myokardu. Hlavním záměrem bylo ověřit možnost využití laktoferinu jako chelátoru železa a tím stanovení jeho protektivních účinků při vzniku volných kyslíkových radikálů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

Jelikož naše práce byla založena na schopnosti laktoferinu chelatovat železo, je vhodné se zprvu seznámit s rolí, metabolismem a regulačními cestami tohoto prvku v organismu:

2.1. ZÁKLADNÍ INFORMACE O ROLI ŽELEZA V ORGANISMU

Železo je nejběžnější přechodný prvek v organismu (1). Je to pro život nezbytný kovový prvek, který v organismu a v buňkách plní mnoho vitálních funkcí (2). 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) (1).

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 sleziny a jater, 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 specifický beta-globulin – transferin (0,1%) (3).

Pozitivní úloha železa v metabolismu je obecně známá. Železo však může působit i toxicky. Patří totiž mezi tzv. přechodné kovy. Tyto prvky, kam kromě železa řadíme i např. měď, mangan, chrom aj., mají předposlední slupku neúplně obsazenou elektrony a vyskytují se ve více mocenstvích. Mají charakter volných radikálů a významně se mohou podílet na jejich reakcích. Z nich nejdůležitější je tzv. Fentonova reakce. Organismus se snaží této reakci bránit (4).

Fentonovou reakcí vzniká velmi reaktivní hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$). Hydroxylové radikály jsou nejvíce reaktivní volné radikály a mají schopnost reagovat s velkým množstvím buněčných komponent, včetně reziduí aminokyselin, purinových a pyrimidinových bází DNA. Dále působí i na membránové lipidy, čímž iniciují řetězec reakcí volných radikálů známých jako lipidová peroxidace (5).

Tabulka č. 1: Hlavní buněčné cílové struktury pro volné radikály

Cíl	Poškození	Následky
nenasyčené mastné kyseliny v lipidech	ztráta dvojných vazeb, tvorba reaktivních metabolitů (peroxydy, aldehydy)	změněná fluidita lipidů, změny v propustnosti membrán, vliv na membránově vázané enzymy, tvorba chemoatraktivních látek pro makrofágy
proteiny	agregace a síťování, fragmentace a štěpení, modifikace thiolových skupin a benzenových jader aminokyselin, reakce s hemovým železem	změny v transportu iontů, vstup Ca^{2+} do cytosolu, změny v aktivitě enzymů
DNA	štěpení kruhu deoxyribózy, modifikace a poškození bází, zlomy řetězce, křížové vazby řetězců	mutace, translační chyby, inhibice proteosyntézy

(6)

Zvýšené množství železa souvisí se zvýšenými kardiovaskulárními příhodami (7). Kardiovaskulární onemocnění (KVO), zvláště ischemická

choroba srdeční (ICHS) a infarkt myokardu (IM) stojí na čelním místě v pořadí příčin celkové morbidity a mortality v České republice. V pozadí naprosté většiny případů ICHS a IM je koronární ateroskleróza. S výskytem aterosklerózy a jejích komplikací (či klinických projevů) souvisí řada rizikových faktorů. Podle současných názorů by měl být oxidační stres zařazen mezi vedlejší rizikové faktory, jejichž ovlivnění snad sníží riziko KVO (6).

Volné radikály a reaktivní metabolity kyslíku jsou nezbytné pro správnou činnost mnoha fyziologických funkcí a systémů v organismu. Pokud se reaktivní metabolity tvoří ve zvýšené míře a přirozené ochranné systémy nedokážou jejich tvorbě zabránit, anebo nestačí už vytvořené radikály vychytat, volné radikály spouštějí množství řetězových reakcí, jejichž výsledkem je poškození biologicky důležitých molekul, narušení integrity buněk a tkání s negativním dopadem na celý organismus. Mezi patologické stavy organismu, které souvisí s oxidačním stresem, patří např. ischemicko-reperfúzní poškození srdce, mozku a jiných orgánů, metabolické poruchy jako diabetes mellitus, poruchy funkcí ledvin, ale i ateroskleróza, rakovina, revmatoidní artritida a některé genetické poruchy (8).

S ohledem na klíčový význam i potenciální toxicitu musí být množství železa a jeho kinetika (distribuce) v rámci organismu přiměřeně regulovány. V několika posledních letech bylo dosaženo pokroku ve studiu kinetiky železa na úrovni organismu i jednotlivých orgánů a buněk, byly popsány nové proteiny, které se těchto dějů zúčastňují, ale mnohé mechanismy zůstávají nevyjasněny (2).

Redoxní vlastnosti železa ho činí podstatným pro základní buněčné funkce, ale díky této vlastnosti je také důležitým katalyzátorem chemických reakcí volných radikálů, následuje oxidativní stres a buněčné poškození (9).

2.2. VOLNÉ RADIKÁLY

V organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species – ROS) a reaktivních forem dusíku (reactive nitrogen species – RNS) a tyto látky mají značný fyziologický i patogenetický význam. Jde o látky, které pohotově reagují s různými biologickými strukturami: mastnými kyselinami a lipidy, aminokyselinami a proteiny, mononukleotidy a polynukleotidy (nukleovými kyselinami) i s řadou nízkomolekulárních metabolitů a koenzymů. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace. Za určitých okolností však působí jako toxické látky a jako dezinformační agenti schopní organismus poškodit a dokonce ho i usmrtit. Vznik radikálu může být **iniciací** celého řetězce dalších reakcí. Pokud radikál reaguje s „normální“ molekulou, nutně ji změní na radikál a radikálová reakce se tím **propaguje** do okolí. Teprve reakcí dvou radikálů se nepárové elektrony spojí ve dvojici a vzniká „normální“ molekula. Radikálová reakce se tak ukončí – **terminace** (6).

2.2.1. ANTIOXIDAČNÍ OCHRANNÝ SYSTÉM

Organismus používá tři možných typů ochrany:

Nejběžnějším způsobem je **bránit se tvorbě** nadměrného množství reaktivních forem kyslíku a dusíku např. regulací aktivity enzymů, které je tvoří (indukovatelná syntáza NO[•]), nebo vychytáváním tranzitních prvků z reaktivních pozic (transferin, feritin).

Druhou možností je **záchyt a odstranění radikálů**, které se již vytvořily. V literatuře se tyto látky označují jako vychytávače či zametače (scavengers), lapače (trappers) a zhášedce (quenchers). Tyto pojmy nejsou založeny na chemickém principu, kterým ochranné látky působí, a tak je vymezení jejich obsahu problematické. Mnohem výstižnější je dělení antioxidantů na enzymy a na látky dávající s reaktivními formami kyslíku a dusíku stálejší a tudíž méně toxické produkty.

Na antioxidační ochraně se podílejí též obecné **reparační mechanismy poškozených biomolekul**. Fosfolipázy odstraňují poškozené mastné kyseliny z fosfolipidů, oxidačně modifikované proteiny se rozkládají proteolyticky a zvláštní reparační enzymy opravují poškozenou DNA (6).

2.2.2. PROLOMENÍ ANTIOXIDAČNÍ OCHRANY

Porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku se nazývá **oxidační stres**. Může být vyvolán nadměrnou produkcí RONS, nedostatečnou funkcí antioxidačního ochranného systému nebo kombinací obou těchto nedostatků. K nadměrné tvorbě ROS dochází při některých metabolických situacích, při reoxygenaci tkáně po ischemii, po příjmu oxidoredukčně aktivních forem. Také nadměrná syntéza radikálu oxidu dusnatého je škodlivá. Hladina radikálu oxidu dusnatého je udržována ve fyziologických mezích jeho rychlou difúzí do krve a reakcí s oxyhemoglobinem (6).

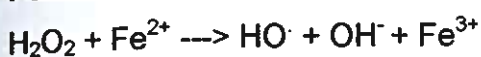
2.3. KLÍČOVÁ ÚLOHA ŽELEZA V OXIDAČNÍM POŠKOZENÍ ORGANISMU

Železo patří mezi **přechodné** (tranzitní) **prvky**, neboť předposlední elektronovou slupku nemá zcela zaplněnou elektrony. Pohotově reaguje s ROS (6). Fentonovou reakcí vzniká vysoce toxický hydroxylový radikál HO \cdot , který v živé hmotě reaguje s okolními biomolekulami. Jde o extrémně silné oxidační činidlo vytrhující elektron z nenasycených mastných kyselin, atakující a hydroxylující aminokyseliny a báze nukleových kyselin. Po Fentonově reakci pak další superoxid redukuje trojmocné železo zpět na dvojmocné, takže je regenerováno pro další katalýzu.

Tranzitní kovy (železo, měď) se významně účastní vzniku reaktivních forem kyslíku, jen pokud nejsou vázány v bezpečných deponitních formách,

jako je železo ve feritinu a v transferinu a měď v ceruloplazminu. Bezpečné uložení a tím „inaktivace“ tranzitních kovů jsou nezbytné k tomu, aby byl čas odstranit superoxid z tkáně superoxidodismutázou a peroxid vodíku katalázou. Oba enzymy jsou součástí antioxidačního ochranného systému organismu, který zahrnuje též enzym glutathionperoxidázu (odstraňující peroxidy) a řadu neenzymových „lapačů“ volných radikálů (scavengers), např. askorbát, tokoferol, urát, bilirubin, beta-karoten a jiné látky účastnící se zneškodnění ROS (např. redukovaný glutathion).

Fentonova reakce:



(6)

2.4. MITOCHONDRIE

Železo hraje důležitou roli v mnoha aspektech mitochondriálního metabolismu. Je dobře známo, že železo je do mitochondrie přepravováno pro syntézu hemu. Avšak teprve nedávno se stala velmi ceněna důležitost této organely pro mnoho dalších aspektů metabolismu železa. Mitochondrie je generátorem metabolismu železa a je důležitá nejen pro syntézu hemu, ale také hraje rozhodující roli při vzniku [Fe-S] skupin.

Bylo objeveno množství mitochondriálních proteinů zapojených do metabolismu železa. Mitochondrie obsahuje mnoho proteinů obsahujících [Fe-S] skupinu včetně enzymů dýchacího řetězce (komplex I a III), ferrochelátázy a enzymů cyklu kyseliny citronové jako je akonitáza a sukcinát dehydrogenáza (10).

Mitochondrie je místem buněčné respirace (aerobního metabolismu) téměř u všech eukaryot. Tyto cytoplazmatické organely, dostatečně velké mají proměnlivý tvar a velikost, ale nejčastěji jsou elipsoidní s rozměry 1x2 mikrometru. Typická eukaryotní buňka obsahuje okolo 2000 mitochondrií, které zaujímají přibližně 1/5 jejího celkového objemu.

Mitochondrie mají 2 membrány: hladkou vnější membránu a vysoce zprohýbanou vnitřní membránu, jejíž invaginace se jmenují **kristy**. Tak každá mitochondrie obsahuje 2 oddíly: **mezimembránový prostor** a vnitřní prostor zvaný **matrix**. Enzymy katalyzující reakce spojené s respirací jsou většinou integrovány do vnitřní mitochondriální membrány. Mitochondrie jsou podobné svým tvarem a velikostí bakteriím. Matrix obsahuje specifické DNA, RNA a ribozomy, které se účastní syntézy různých mitochondriálních komponent. Dokonce se reprodukují příčným dělením a jejich respirační procesy nápadně připomínají aerobní bakterie (11).

2.5. METABOLISMUS ŽELEZA

V organismu dospělého člověka je obsaženo cca 4000mg 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 železa. Toto železo však vykazuje vysoký obrat.

Větší část železa se recykluje mezi kostní dřeviny a makrofágovým systémem, zejména ve slezině, kde dochází k likvidaci starých erytrocytů. Resorpcí v duodenu jsou po ukončení růstu doplňovány jen běžné ztráty železa. I když denní resorpce železa tvoří cca 0,025 – 0,05% celkového množství železa v organismu a představuje jen malou část ze železa přijatého v potravě. Dlouhodobě snížené či zvýšené množství vstřebaného železa vede ke klinicky významným stavům – sideropenii nebo k přetížení železem. Proto je resorpce železa klíčovou funkcí, která vyžaduje řízení s ohledem na potřebu železa (2).

V minulých letech bylo identifikováno mnoho nových genů a proteinů, které jsou zapojeny do metabolismu železa. Byly nalezeny mutace, které jsou

zodpovědné za poruchu v transportu železa a vedou buď k přetížení železem nebo k deficienci železa.

Přestože je železo čtvrtým prvkem, jeho dostupnost je redukována, protože oxidovaná forma kovu (Fe^{3+}) je v neutrálním pH extrémně nerozpustná. Tak se komplexní mechanismus pro jeho získání, využití a uchování dokonce vyvinul i u nejprimitivnějších organismů (12).

Buněčné hladiny železa jsou velmi jemně regulovány tak, aby bylo zajištěno jeho adekvátní (potřebné) množství a tak minimalizováno toxické působení volného železa. Hlavní kontrola homeostázy tělních zásob železa je u vyšších organismů situována v epitelální vrstvě **duodena**, kde se vstřebává dietární železo, zatímco kontrola eliminace železa se u savců nevyvinula (13). Množství železa může být považováno za zpětnou kontrolu svého vlastního metabolismu (14). (viz Příloha č. 1)

2.5.1. TENKÉ STŘEVO – INTESTINUM TENUE

Tenké střevo navazuje na žaludek jako trubice o průměru kolem 3 až 4 cm, dlouhá 3 až 5 m. Probíhá zde hlavní a poslední etapa enzymatického štěpení potravy ve vstřebatelné komponenty a vstřebávání vzniknuvších komponent. Tenké střevo má 3 úseky: duodenum, jejunum a ileum.

Sliznice tenkého střeva je bledě růžová, krytá jednovrstevným cylindrickým epitelem, který má resorpční schopnosti. Mezi těmito buňkami jsou vtroušeny pohárkové buňky produkující povrchový ochranný hlen.

Sliznice celého tenkého střeva je poseta drobnými, štíhlými, prstovitými výběžky, zvanými *villi intestinales*, **střevní klky**, jež mají v duodenu tvar spíš lístkovitý, v dalších úsecích střeva jsou kyjovité nebo kuželovité. Jsou vysoké 0,3 až 1 mm; na 1 mm² podle místa střeva připadá 10 až 40 klků. Významně

zvětšují plochu sliznice tenkého střeva. Povrch klků tvoří cylindrický epitel, na němž se podílí více druhů buněk.

Enterocyty tvoří většinu buněk na povrchu klků. Jsou štíhlé, cylindrické, na volném povrchu nesou četné, 1 až 2 mikrometry vysoké mikrokilky, jichž je kolem 3000 na povrchu jedné buňky a představují významné zvětšení resorpčního povrchu buňky. Hlavní funkcí enterocytů je vstřebávání látek z nitra tenkého střeva. Enterocyty jsou neustále obnovovány, opotřebené se odlučují na vrcholku klku, rozpadají se, a z nich se uvolňují enzymy.

Glandulae intestinales – žlázy tenkého střeva jsou vytvořeny ve všech oddílech tenkého střeva mezi klky ve formě krypt.

Duodenum je dlouhé 20 až 28 cm, má průměr 3,5 až 4,5 cm. Klky jsou mírně zploštělé, jsou zde z celého tenkého střeva nejhustší. **Glandulae duodenales** (Brunnerovy žlázy) jsou specifické pro duodenum. Jsou to rozvětvené tuboalveolární žlázy, které produkují hlen alkalické reakce (pH 8,1 až 9,3) (15).

Uvnitř **intestinálních krypt** jsou multipotentní prekurzorové buňky, některé z nich migrují na klky a diferencují se na enterocyty. **Enterocyty** jsou specializovány pro absorpci a transport železa. Prekurzorové buňky se liší od enterocytů v expresi proteinů zapojených do výchytu a transportu železa. **Prekurzorové buňky** působí pouze jako čidlo tělesných potřeb železa, po diferenciaci jsou enterocyty schopny železo transportovat. Požadované proteiny pro absorpci, uskladnění a export jsou exprimovány v endotelech (16).

2.5.2. STŘEVNÍ TRANSPORT ŽELEZA

Za normálních podmínek lidé přijmou přibližně 12 až 18 mg dietárního železa za den. Hlavně jako Fe^{3+} , ze kterých jsou 1 až 2 mg absorbovány (5).

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 nikotinamidadeninukleotidfosfátu na extracelulární akceptor jako je Fe^{3+} .

Nramp2 (známý jako DMT1 nebo DCT1) transportuje Fe^{2+} přes intestinální povrch. Nramp2 je H^+ /divalentní kov symportér, který transportuje kromě železa také další kovy. Defekt Nramp2 vede ke zhoršenému intestinálnímu a defektnímu endosomálnímu transportu železa (17). (viz Příloha č. 2)

Regulace intestinální absorpce železa

Absorpce intestinálního železa je regulována v několika cestách:

- 1) Může být modulována množstvím železa právě zkonsumovaného v potravě, mechanismus odkazuje na dietární regulátor. Za několik dní později vzniká dietární bolus železa, absorpční enterocyty jsou resistantní k získávání dalšího železa. Tento jev se nazývá „**mukosální blok**“. Tato blokovácí činnost vyplývá z akumulace intracelulárního železa.
- 2) Sekundární regulační mechanismus zaznamenává úroveň železa, ale spíše odpovídá na celkové zásoby železa v těle než na dietární železo. Tento mechanismus je označen jako „**zásobní regulátor**“. Je schopný měnit množství absorbovaného železa v limitovaném rozsahu. Přestože molekulární detaily regulace zásob nejsou známy, pravděpodobně působí na úrovni kryptových buněk a odpovídá na saturaci plazmového transferinu železem. Množství apikálního transportéru DMT1 je měněno podle tělesných zásob železa.
- 3) Třetí regulační mechanismus známý jako „**erythropoetický regulátor**“ neodpovídá na celkové úroveň železa, ale moduluje absorpci železa

podle potřeb erythropoezy. Erythropoetický regulátor má větší schopnost zvýšit absorpci železa než zásobní regulátor. Erythropoetický regulátor pravděpodobně zahrnuje signál, který je nesený plazmou z kostní dřene do střeva.

- 4) Absorpce železa se zvyšuje v odpovědi na **akutní hypoxii**. Není ale známo, zda je hypoxický signál veden přes 1 nebo více diskutovaných regulatorních cest nebo přes nezávislý mechanismus (18).

Jakmile železo vstoupí do mukózní buňky má pouze 2 možnosti: buď se střetne s feritinem a dojde k zablokování železa dovnitř proteinu nebo může být železo transportováno do basolaterální membrány. Za normálních okolností je mnoho železa uskladněno ve formě **feritinu** a uchováno v mukózních buňkách, což vede k nízkému mukóznímu transferu železa. V případě deficiencie železa mukózní buňky produkují stěží feritin a většina železa v buňce je transportována do basolaterální membrány. Zde je difúze Fe^{2+} přes basolaterální membránu facilitována působením **Ireg1** (5). Železo je přitom oxidováno **hephaestinem** na železo trojmocné a váže se na transferin. Hephaestin je ferroxidáza obsahující měď, je považován za transmembránový analog ceruloplasminu, který zajišťuje oxidaci železa při jeho výstupu z makrofágů (2).

Ferroportin 1/Ireg1/MTP1

Lokalizace Ferroportin 1/Ireg1/MTP1 v buňkách a ve tkáních odpovídá jeho funkci, kterou je export železa z buňky. V duodenu se Ferroportin1/Ireg1/MTP1 nachází ve zralých enterocytech, ale nenachází se v kryptách. Tento protein je nalézán v játrech, převážně v Kupferových buňkách, kde je železo získáváno z červených krvinek (16).

MTP1 je tedy vyjádřen ve tkáních zapojených do homeostázy železa v těle, včetně vývoje a dozrávání retikuloendoteliálního systému, duodena a dělohy v těhotenství. MTP1 je vyjádřen rovněž ve svalech a v buňkách

centrálního nervového systému embrya. Na subbuněčné úrovni je MTP1 lokalizován v basolaterální membráně buněk v epitelu duodena a v cytoplazmatických vesikulách buněk retikuloendoteliálního systému. Deficit železa vyvolává expresi genu MTP1 v duodenu, ale současně také snižuje jeho expresi v játrech. Tyto údaje ukazují na skutečnost, že MTP1 je membránový protein regulovaný železem, který je zapojen do buněčného metabolismu železa.

Vyjádření MTP1 v deciduu (ve sliznici dělohy v těhotenství) na straně matky nasvědčuje tomu, že MTP1 může exportovat železo z krevního oběhu matky do krevního oběhu plodu. Vyjádření MTP1 v dvanáctníku je omezeno na zralé absorpční buňky v epitelu klků. DMT1, přenašeč železa v apikálních buňkách, je rovněž lokalizován ve zralých absorpčních buňkách epitelu klků. Pozitivní regulace exprese MTP1 v duodenu (zvýšené vyjádření) při snižování obsahu železa probíhá souběžně s regulací DMT1.

Ukazuje se, že v jaterních hepatocytech se MTP1 vyjadřuje na povrchu buněk lemujících sinusoidy. Vyjádření MTP1 na sinusoidálním povrchu hepatocytů naznačuje, že MTP1 hraje roli v metabolismu železa v hepatocytech a rovněž naznačuje, že MTP1 by mohl exportovat železo z těchto buněk. Porucha regulace exprese MTP1 v hepatocytech může být možná důležitá při hemochromatóze.

V jiných buňkách těla a zvláště u embrya může mít MTP1 ochrannou funkci, která spočívá v omezování hladiny cytoplazmatického železa. Vývoj nervového systému může vyžadovat MTP1 pro účely pevné regulace hladin vnitrobuněčného nebo cytosolického železa, která tyto buňky chrání proti poškození oxidací, kterou železo zprostředkovává. MTP1 a DMT1 jsou vyjádřeny rovněž v buňkách ledvin, přičemž MTP1 je lokalizován v glomerulech a v proximálních tubulárních buňkách ledvin (19).

2.5.3. CIRKULACE A BUNĚČNÝ VÝCHYT ŽELEZA

Za normálních podmínek cirkuluje extracelulární železo v plazmě navázané na **transferin** (Tf), což je četný protein s mimořádně vysokou afinitou pro železo. V této formě je železo nereaktivní (20). Transport železa od enterocytů k ostatním buňkám se tedy děje prostřednictvím specifického proteinu – transferinu. Transferin je jednořetězcový sérový glykoprotein ($M_r=80000$) s dvěma vazebnými místy pro Fe^{3+} (1). Normální kapacita transferinu vázat železo je mezi 20-ti až 60-ti % (21).

Železo přenášené krevní cirkulací transferinem může být využito buňkami pouze tehdy, je-li zachyceno specifickým receptorem a jeho prostřednictvím přeneseno do buňky. Receptor pro Tf (**TfR**) je transmembránový glykoprotein tvořený dvěma polypeptidovými jednotkami, každá o molekulové hmotnosti 95000 (760 AMK), spojených disulfidovými můstky. Největší doména je extracelulární (671 AMK), cytoplazmatická doména (61 AMK) je N-terminální. Transmembránová část (28 AMK) je tvořena především hydrofóbními AMK (3).

Výchyt železa z Tf zahrnuje vazbu Tf na TfR, internalizaci Tf receptorově mediovanou endocytosou a při sníženém endosomálním pH dochází k uvolnění železa z proteinu (22). Diferrický transferin ($2Fe^{3+}Tf$) se váže na TfR na povrchu buněk a Tf-TfR komplex je internalizován v klatrinem pokrytých vesiklech. Vesikly ztrácí svůj povlak (film) a výsledkem je bezproblémová fúze vesiklů s endosomy. Uvnitř endosomu je pH přibližně 5,5 účinkem ATP dependentní protonové pumpy v endosomální membráně, která čerpá protony z cytosolu do endosomálního lumen. Železo je uvolňováno z Tf-TfR komplexu jako Fe^{3+} účinkem kyselého pH uvnitř endosomálního kompartmentu. Z endosomu je železo transportováno divalentním kationtovým nosičem **DMT1**, což je transmembránový transportér železa. O domnělé ferrireduktáze, která je zapojena do redukce Fe^{3+} před jeho transportem z endosomu pomocí DMT1, víme velmi málo. Apotransferin, stále navázaný na TfR, se pak vrací na buněčný povrch, kde je uvolněn do cirkulace. Dokončuje se vysoce účinný

cyklus, který vnáší železo do buňky v podstatě jako $2\text{Fe}^{3+}\text{Tf}$ a uvolňuje protein bez obsahu železa pro reutilizaci (5). (viz Příloha č. 3)

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 Ft. Za podmínek velké zátěže železa je Ft převeden do lysosomů, kde je transformován do hemosiderinu (5).

Nejvíce železa je užito při syntéze hemoglobinu ve vyvíjejících se erythroidních buňkách. Po uvolnění železa z Tf uvnitř endosomů prochází železo přes endosomální membránu a vstupuje do intracelulárních nestabilních zásob železa. Nadbytek železa v nestálých zásobách, který přesahuje potřebné množství pro syntézu funkčního hemu a nehemových proteinů obsahujících železo, je uskladněno uvnitř proteinu vázajícího železo – feritinu (22).

Apotransferin a TfR1 jsou na buněčném povrchu recyklovány a každý může být znovu užíván pro další cykly navázání a výchytu železa. TfR1 je všudypřítomně exprimován, Tf-mediovaný výchyt železa probíhá ve většině buněk (23).

Homologní protein, **TfR2**, je omezený na hepatocyty, duodenální kryptové buňky a erythroidní buňky, má vysoce specializovanou roli. Mutace v lidském TfR2 genu vyplývá v hemochromatózu (patologické přetížení železem) ukazující na jeho důležitost v homeostáze železa. TfR2 váže Tf s přibližně 30x menší afinitou než TfR1 a na rozdíl od TfR1 není jeho exprese kontrolována IRE/IRP regulačním systémem (23).

Proteiny regulované železem (**IRPs**) představují senzory množství cytoplazmatického železa a kontroléry množství proteinů zahrnutých v homeostáze železa: Tf, TfR1, Ferroportin1/Ireg1/MTP1 a DMT1 (Nramp2,DCT1) (13). Posttranskripční regulace genové exprese se uskutečňuje interakcí mRNA s proteiny. Na 5' nebo 3' nepřepisovaných oblastech mRNA

(UTR) se vyskytují vlásenky se smyčkou nazývané elementy reagující na železo - IRE (Iron Responsive Element), které jsou rozpoznávány specifickými proteiny regulovanými železem - IRP (Iron Regulatory Protein, IRP1 a IRP2). IRE byly nalezeny na nepřekládaných oblastech mRNA pro Ft (5' UTR), TfR (3' UTR) a DMT1 (3' UTR). Nízká hladina železa v buňce umožňuje vazbu IRP na IRE, následný efekt závisí na tom, zda se IRE nachází na 3' nebo 5' UTR. V případě interakce IRP s 3' - IRE (TfR, DMT1) dochází ke zvýšení stability mRNA (zabránění štěpení mRNA endonukleázou) a produkci proteinu, výsledkem je zvýšený příjem železa. Vazba IRP na 5' - IRE (Ft) vede ke snížení tvorby proteinu. V případě nadbytku železa je situace opačná. IRP1 je přeměněn na cytosolovou akonitázu a IRP2 je odbourán, nemohou se tedy vázat na IRE. 5' - mRNA je štěpena, TfR a DMT1 jsou odbourávány. Při deficitu železa bylo v duodenu nalezeno zvýšené množství DMT1, Ireg1 a Dcytb mRNA. V případě DMT1 je vysvětlitelné na základě interakce IRP-IRE, v případě Ireg1 a Dcytb (nemají IRE) ne. Proto se předpokládají další mechanismy regulace, zejména efekt hepcidinu (1).

IRPs (IRP1 a IRP2) patří k akonitázové rodině. IRP1 může fungovat jako mRNA - vázající protein nebo jako enzym konvertující citrát na isocitrát (13). IRP1 je v aminosekvenci podobný k m-akonitáze, což je [4Fe-4S] enzym cyklu trikarboxylových kyselin, který konvertuje citrát na isocitrát. IRP2 je z 57% v sekvenci AMK identický k IRP1. Železo mediuje oxidaci IRP2, která předchází jeho degradaci (24). Ačkoli je IRP2 strukturálně a funkčně podobný k IRP1, IRP2 nevytváří [Fe-S] skupinu a nevykazuje akonitázovou aktivitu (13). Oba IRPs jsou fosfoproteiny a aktivátor fosfokinázy c rychle stimuluje fosforylaci IRP a zvyšuje IRE vázající aktivitu (24). IRPs působí jako klíčové regulátory homeostázy buněčného železa. Aktivitu IRPs mohou ovlivnit různé činitele a podmínky. Savčí buňky reagují na deficienci železa zvýšeným počtem TfR1 na povrchu buněk. Zároveň je zastavena tvorba Ft, aby se zvýšila dostupnost železa. Při nadbytku železa dochází k opačným dějům: množství TfR1 je sníženo a zvýšena syntéza Ft - nadbytek železa je formován do Ft (13).

Dcytb

Dcytb je hemoprotein pravděpodobně zodpovědný za redukci železa v kartáčovém lemu enterocytů (25).

Hepcidin

Nedávno byl objeven nový regulátor intestinální absorpce a homeostázy v buňkách. Jedná se o hepcidin (26). U člověka je hepcidin syntetizovaný jako prekurzor o délce 84 AMK (2). Hepcidin je peptid, vykazuje antibakteriální aktivitu a byl objeven v lidské moči. Je produkován v játrech jako výsledek přetížení železem. Váže se na Ferroportin1, následně je tento komplex internalizován a degradován, což vede ke snížení exportu železa. Hepcidin je důležitý v homeostáze železa, je sekretován v závislosti na intracelulární úrovni železa a kontroluje hladinu Ferroportinu1 na buněčném povrchu (26).

Feritin

Feritin (Ft) je protein uskladňující železo, hraje klíčovou roli v metabolismu železa. Všechny Ft mají 24 proteinových podskupin, které vytváří kostru s dutinou. Dutina je schopná uskladnit 4500 atomů Fe^{3+} jako anorganický komplex. Molekuly Ft izolované z obratlovců jsou vytvořeny ze dvou typů podjednotek (H a L), zatímco Ft z rostlin a bakterií obsahuje pouze řetězec H. Řetězce H (heavy - těžké) jsou důležité pro Fe^{2+} oxidaci a L (light - lehké) řetězce asistují při formaci jádra (27).

Při velkém množství železa působí Ft jako protein izolující železo, chrání tak buňky před jeho toxicitou. Zvýšená exprese těžké podjednotky (H) Ft sníží hladinu nestabilní zásoby železa a sníží H_2O_2 indukované poškození DNA. Při nízkém obsahu železa působí jako zdroj iontů železa, které jsou nutné pro syntézu proteinů obsahujících železo. Nicméně mechanismy, kterými se železo uvolňuje z Ft zůstávají nejasné (28).

Zvýšené množství sérového Ft obecně odráží zvýšené množství železa ve tkáních. Množství Ft se ale může nespecificky zvyšovat při zánětu (29).

Unikátní homopolymer Ft typu H je exprimován v mitochondriích (mitochondriální Ft – MtF). Nadměrná exprese MtF vede k akumulaci železa v mitochondriích, ke snížení cytosolického Ft a zvýšené expresi TfR1. MtF exprese je zvýšená u anemických stavů charakterizovaných akumulací železa v mitochondriích (sideroblastická anémie), z čehož vyplývá protektivní role MtF proti toxicitě mediované železem (23).

Degradace Ft může vést k růstu toxicity kvůli nekontrolovanému uvolnění železa. Degradace uvnitř membrány enkapsulované sekundárními lysosomy může předejít tomuto problému a být počátkem jiné formy uskladnění železa známé jako hemosiderin (27).

Hemosiderin

Hemosiderin obsahuje 37 % železa ze své molekulové hmotnosti, představuje vlastně málo rozpustné agregáty Ft (30). Nicméně jsou v jistých patologických stavech nalezeny masivní depozice hemosiderinu, které ale nevznikly přímo z rozpadu Ft (27).

2.5.4. NESTABILNÍ ZÁSoba ŽELEZA

Výchyt a uskladnění železa je prováděno různými proteiny, vzniká zásoba dostupných iontů železa, která je nazývána jako nestabilní zásoba železa (LIP – labile iron pool). LIP je definován jako nízkomolekulární zásoba slabě chelatovatelného železa, která pravděpodobně sestává z obou forem iontů železa (Fe^{2+} a Fe^{3+}) spojených s různými ligandy s vysokou afinitou k iontům železa. LIP reprezentují pouze minoritní frakci z celkového buněčného železa. Železo je v komplexu s různorodými nízkomolekulárními chelátory jako jsou citráty a jiné organické ionty, fosfáty, karboxyláty, nukleotidy a nukleosidy,

polypeptidy a fosfolipidy. Přesto jsou skutečné přírodní intracelulární ligandy, které se účastní vzniku LIP, nejasné (28).

2.5.5. MAKROFÁGOVÁ RECYKLACE ŽELEZA

Staré a poškozené erythrocyty jsou fagocytovány specializovanými makrofágy, které slouží k zajištění reutilizace železa z hemoglobinu. Pohlcené erythrocyty jsou lysovány, hemoglobin je degradován (pomocí hemoxygenázy), část železa je uskladněna a zbytek je exportován do cirkulace, aby byl následně navázán na Tf. Přes intestinální stěnu vstoupí do těla pouze 1 až 2 mg železa, přesto je 25 mg železa potřeba pro erythropoezu a ostatní potřeby.

Erythroidní buňky jsou tedy hlavním spotřebitelem železa a potřebné množství železa v erythronu (kostní dřeň, erythroidní prekurzory a cirkulující červené krvinky) normálně přesahuje množství uskladněného železa. Pokud erythroidní potřeby přesahují kapacitu uskladňovacích buněk k mobilizaci železa pro erythropoezu, intestinální absorpce je zvýšená „erythroidním regulátorem“.

Téměř všechny dostupné zásoby železa jsou tedy odvozeny z makrofágové recyklace (23).

2.5.6. ZÁNĚTLIVÁ REGULACE

Buněčná retence železa rychle nastává při zánětu a infekci, pravděpodobně proto, aby bylo železo ukryto před invazivními patogeny. Železo se akumuluje v makrofágových buňkách, které recyklují železo ze stárnoucích erythrocytů a je přerušena intestinální absorpce železa. Tato regulace je nazývána jako „zánětlivá regulace“ (23).

Železo je totiž základní živinou pro invazivní mikrobiální a neoplastické buňky a může tak zvýšit riziko chorob indukovaných těmito mikroby. Mikrobiální

patogeny musí pro přežití a replikaci v hostitelích získat hostitelské železo. Vysoce virulentní kmeny mají vyjimečně silné mechanismy pro získání hostitelského železa ze zdravých hostitelů. V lidech, jejichž tkáně a buňky obsahují nadměrné množství železa, patogeny mohou mnohem rychleji získat železo z molekul Tf.

Asociace a role infekčních patogenů u chronických zánětlivých nemocí a neoplázií má význam pro veřejné zdravotnictví, ošetření a prevenci. Metabolismus železa je u těchto nemocí rizikovým faktorem, právě tak jako při klasických infekčních onemocnění. Protože množství železa je v různých skupinách obyvatelstva pozoruhodně variabilní, prověřování množství železa u hostitelských populací by mohlo poskytnout cennou informaci v epidemiologických, diagnostických, profylaktických a léčebných studiích, které se týkají infekčních onemocnění (31).

2.5.7. ZTRÁTY ŽELEZA

Za fyziologických okolností jsou ztráty železa z organismu poměrně malé – odlupováním epitelů ze střeva a močového traktu se ztrácí v průměru 1 mg denně, takže příjem a ztráty železa z organismu jsou vyrovnané. K větším ztrátám dochází fyziologicky u žen v průběhu menstruace – navíc 1 mg denně (resp. 0,8 až 1,8 mg). Rovnovážná bilance je zde udržována zvýšenou resorpcí ze střeva. Zvýšená potřeba železa je rovněž v průběhu těhotenství – až 3 mg denně (30).

2.6. HEMOCHROMATÓZA

Hemochromatóza je vrozená porucha metabolismu železa, je spojená se zvýšeným vstřebáváním železa ze střeva a jeho excesivním ukládáním v některých orgánech (játra, pankreas, srdce, thyreoidea, gonády, hypofýza, hypothalamus, kůže) s jejich následným poškozením.

V literatuře se zpravidla rozlišuje primární hemochromatóza (synonyma: idiopatická, hereditární, genetická) a sekundární hemochromatóza (komplikující např. thalasémii s inefektivní erythropoezou). Vedle toho jsou popsány poruchy spojené se zvýšeným ukládáním železa v játrech (africká hemochromatóza Bantu, porphyria cutanea tarda, juvenilní hemochromatóza, kongenitální transferinémie a další) a hemosiderosa (v důsledku opakovaných krevních transfúzí).

Hemochromatóza je autozomálně recesivně dědičné onemocnění. Je charakterizována abnormálně zvýšeným vstřebáváním železa sliznicí tenkého střeva (3 až 6 g denně). U alkoholiků se toto vstřebávání dále zvyšuje. Zvýšený přenos železa je spojen s vyšší saturací Tf a dále posílen vazbou železa na jiné nosiče než je Tf (např. cheláty s citrátem). V důsledku abnormálního vstřebávání tkáň obsahují enormní množství železa, jeho zásoby v celém těle mohou dosáhnout až 60 g.

U symptomatických osob se klinické příznaky objevují zpravidla mezi čtyřicátým a padesátým rokem. Muži jsou postiženi 10 krát častěji než menstrující ženy. Zpočátku v klinické symptomatologii bývá slabost, pobolívání břicha, impotence a artralgie. Rozvoj diabetu, kožní změny a srdeční postižení nebývají při časně diagnóze zpravidla přítomny. V popředí rozvinutého klinického obrazu je letargie. Při fyzikálním vyšetření dominuje hepatosplenomegalie, u pokročilého onemocnění pak dále ikterus, ascites, kožní změny a projevy srdečního postižení (32).

2.7. TRANSFÚZNÍ SIDERÓZA

Dlouhodobá transfúzní terapie je nová procedura, život zachraňující léčba u pacientů s neústupnou anémií vyplývající z thalasemie, selhání kostní dřeně nebo agresivní léčby rakoviny. Tato metoda je užívána u pacientů s pokračujícími komplikacemi z onemocnění srpkovitých buněk. Opakovaná transfúze vede k rapidnímu zvětšení množství železa, protože každá jednotka krve obsahuje 200 až 250 mg železa a může zapříčinit transfúzní siderózu,

protože neexistuje mechanismus pro exkreci železa. Protože je toto železo odvozené z červených krvinek, retikuloendoteliální makrofágy jsou přetížené železem dříve než parenchymové tkáňové buňky. I u transfúzní siderózy je železo nakonec uskladněno ve stejných místech jako v jiných případech, kdy došlo k přetížení železem (hepatocyty, myokard, endokrinní tkáně) (18).

2.8. ŽELEZO A KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ

Kardiovaskulární onemocnění je heterogenní skupina onemocnění, které postihují srdce a krevní řečiště. Onemocnění jsou charakteristická anginou pectoris, hypertenzí, srdečním selháním, akutním infarktem myokardu a arytmií (25).

Rozdíl ve výskytu kardiálních chorob u mužů a žen by mohl být vysvětlen v rozdílné hladině železa. U pacientů s poruchou uskladnění železa se objevuje poškození myokardu – železo je naakumulováno u mužů s věkem a u žen po menopauze. Existuje souvislost mezi uskladněním železa a kardiovaskulární úmrtností (33).

U pacientů s nadbytkem železa se může vyvinout život ohrožující kardiomyopatie (34). V případě nadbytku železa dochází k buněčnému poškození. V srdci to má za následek poškození aktivity Na-K-ATPázy, poškození aktivity mitochondriálního dýchacího řetězce a může se klinicky manifestovat jako srdeční selhání nebo dysrytmie. Pozdním ukazatelem myokardiálního přetížení železem je systolická dysfunkce a tato srdeční porucha často vede k náhlé siderotické kardiomyopatii (35).

Přetížení železem tedy indukuje kardiální toxicitu ovlivněním elektrické kondukce a svalové kontraktility. Inhibice elektrické kondukce může být příčinou vysoké incidence nevysvětlitelné náhlé smrti, pravděpodobně z důvodu arytmií pozorovaných u pacientů s vyšší zátěží železa. Kardiální onemocnění indukované železem se vyvíjí až po letech od zvýšení tkáňové koncentrace železa (29).

Přetížení železem zvýrazňuje uvolnění arachidonové kyseliny a její inkorporaci do fosfatidylcholinu, stejně tak jako indukci cyklooxygenázy 2 a produkci eicosanoidů. Efekty arachidonové kyseliny a jejích metabolitů na myokardiální rytmicitu vykazují příčinnou spojitost mezi přetížení železem a indukovanými elektromechanickými změnami. Prostaglandiny D2, E2, F2 a tromboxan A2 zvyšují riziko reversibilních tachyarytmií (34).

Teorie oxidačního stresu navíc napovídá, že železo jako mocné katalytické agens může podporovat tvorbu vysoce reaktivních forem kyslíku a peroxidaci lipidů, což je rozhodující krok na cestě k arteriosklerose. Mezi biochemickými znaky zásoby železa v těle je za nejlepší měřítko všeobecně považována hladina Ft v séru, kterou je možné v epidemiologických studiích snadno vyhodnocovat. Hladina Ft, což je protein akutní fáze, může narůstat rovněž při poškození srdečního svalu a při zánětu. Osm prospektivních skupinových studií ohlásilo závěry, že existuje vzájemný vztah mezi Ft v séru a rizikem onemocnění koronárních cév nebo arteriosklerosy. Pouze dvě studie našly významnou pozitivní závislost. Jako doplněk k hodnocení přebytku železa několik nedávných studií vyjádřilo specificky hypotézu „iron depletion“ – ta říká, že snížení zásob železa je spojeno s nižším rizikem onemocnění koronárních cév (36).

2.9. VOLNÉ RADIKÁLY A CHOROBY KARDIOVASKULÁRNÍHO SYSTÉMU

Nežádoucí působení nadprodukce volných reaktivních forem kyslíku na lidský organismus a jeho přímá účast v patogenezi mnohých chorobných stavů je dnes už všeobecně přijímaným faktem. Zvýšená produkce volných reaktivních forem kyslíku se charakterizuje často pojmem „oxidační stres“. Tento stav se dnes považuje za významný patogenetický faktor v aterogenezi některých akutních či chronických poruch funkce srdce a při stavech, které vytváří pro uvedené nemoci vhodné prostředí a podmínky, jako jsou dysfunkce endotelu a zvýšená agregabilita krevních destiček (37).

2.9.1. OXID DUSNATÝ A KARDIOVASKULÁRNÍ SYSTÉM

Oxid dusnatý (NO) je malá molekula, která hraje roli v různých fyziologických a patologických procesech včetně srážení krve, vazokonstrikce, inhibice agregace krevních destiček, relaxace hladkých svalů, regulace imunity, neurotransmise a metabolismu železa (38).

Preferenčními cíly NO jsou [Fe-S] skupiny a součástí cytotoxických účinků NO je inhibice m-akonitázy. Byla dokázána souvislost mezi homeostázou železa a NO, NO vykazuje mnoho efektů na IRP1 a IRP2. Důležitá je modulace IRP prostřednictvím NO v makrofágových buňkách, protože tyto buňky jsou významné v patofyziologických podmínkách jako je zánět a anémie z chronického onemocnění. Sloučeniny odvozené od NO mohou zapříčinit oxidaci a tím inaktivaci IRP. Ohledně efektů NO na IRP zůstává mnoho nejistot, částečně protože vnitřní stavba této molekuly vykazuje závislost na redoxním stavu prostředí, ve kterém je vytvořena. NO za fyziologických podmínek přes IRP1 aktivaci inhibuje IRP2. Tento děj, který je vysoce vyjádřen v makrofágových buňkách, může být patofyziologicky významný, protože cytokíny mediovaná regulace makrofágů je doprovázena zvýšením syntézy Ft a snížením obsahu mRNA TfR. Retence železa v makrofágových buňkách je charakteristická při zánětlivých podmínkách. IRP1 i IRP2 aktivita v lidských makrofágových buňkách je přechodně zvýšena krátce po léčbě cytokíny nebo donory NO, ale poté zřetelně potlačena a doprovázena zvýšeným obsahem Ft (9).

NO může inhibovat aktivitu různých molekul zapojených do energetického metabolismu včetně mitochondriální akonitázy, nikotinamidadenin dinukleotid: ubichinon oxidoreduktázy, sukcinát: ubichinon oxidoreduktázy z mitochondriálního řetězce transportu elektronů (38).

NO velmi aktivně reaguje se superoxidovým aniontem za tvorby prooxidačně působícího peroxynitritu (ONOO^-), a to tím, že se z něho přes rychle se rozpadající meziproduct peroxydusičnou kyselinu vytváří oxid dusičitý a cytotoxicky působící hydroxylový radikál. Působení peroxynitritu

na metabolické a funkční procesy kardiomyocytu je rozmanité: jde o molekulu, která způsobuje peroxidaci lipidů a modifikuje funkčnost proteinů. Působí ireversibilní inhibici respirace v mitochondriích. V pokusech na izolovaném srdci potkana se to projevuje například výraznými změnami výkonnosti levé srdeční komory. Novější práce poukazují na jednoznačnou účast NO a jeho prooxidačních metabolitů v patogenezi aterosklerosy a trombózy. V procesech aterosklerosy by měla hrát jednu z rozhodujících úloh právě rovnováha mezi NO a superoxidovým aniontem v cévní stěně (37).

2.9.2. OXIDACE LIPOPROTEINOVÝCH KOMPONENT A ATEROSKLEROSA

Stále narůstá počet poznatků, které dokazují úzký vztah mezi rizikem kardiovaskulárních chorob a procesy, které jsou spjaté se zvýšenou endogenní produkcí volných kyslíkových radikálů, vedl ke zformování hypotéz, které hledají spojitost mezi zvýšenou tvorbou reaktivních forem kyslíku a aterosklerosou. Protože se už delší čas ví, že v tomto procesu hrají zásadní úlohu lipoproteiny, hledá se souvislost s modifikací jejich molekul oxidačními procesy. Zásadní úloha v tomto procesu se připisuje molekulám nízkodenzitního lipoproteinu (LDL), k čemuž přispívá i fakt, že na hypercholesterolemii – všeobecně uznávaného rizikového faktoru aterosklerosy – se nejvíc podílí právě zvýšená plazmatická hladina LDL (37).

2.9.3. ISCHEMICKO-REPERFÚZNÍ SYNDROM

Poznatky, získané v pokusech na izolovaných ischemizovaných a potom reperfundovaných srdcích zvířecích modelů, vyústily ve formulaci koncepce reperfučního poškození, které nastává po předcházející časově různě dlouhé ischemii. Mezi dominantní patologické faktory se zařadila i zvýšená tvorba volných kyslíkových radikálů, která nastává nejen v období oxidační reperfúze, ale i v čase samotné dlouhotrvající ischemie.

O úloze oxidačního stresu v tomto procesu hovoří několik faktů:

- v pokusech na izolovaném srdci přidáním systému generujícího volné kyslíkové radikály dochází ke snížení funkce myokardu
- snižování oxidačního poškození přidáním antioxidantů a nebo antioxidantních enzymů zlepšuje srdeční funkci

Při náhlém zvýšení tvorby volných radikálů kyslíku se uvažuje o akumulaci vápníkových iontů v procesu ischemicko-reperfúzního syndromu. Při dlouhotrvající ischemii se Ca^{2+} hromadí v mitochondriích, aktivují se pomalé Ca^{2+} kanály v sarkoplazmatickém retikulu. Vznikající pokles pH v cytosolu a náhle zvýšená koncentrace anorganického fosfátu vede však k desensibilizaci afinity cytosolového volného Ca^{2+} vůči vazebnému místu na kontraktilních proteinech (troponin C) a tím dochází ke snížení kontrakční síly struktur myokardu. Intracelulární akumulace vápníkových iontů, která začala v ischemizované tkáni, se paradoxně zvyšuje během reperfúze a spouští kaskádu procesů, které jsou indukované právě volnými ionty vápníku (aktivace mnohých enzymů, zvyšování agregability destiček, tvorba produktů degradace kyseliny arachidonové). Dilema, zda při ischemicko-reperfúzním syndromu hraje významnější úlohu náhlá nadprodukce volných radikálů kyslíku a nebo akumulace Ca^{2+} a následující porucha jeho navázání na kontraktilní proteiny, je stále nevyřešená.

Ukázalo se, že produkce volných kyslíkových radikálů se nemusí omezovat pouze na reperfúzní reoxygenační fázi, ale že ischemie myokardu aktivuje volné radikály v mitochondriálním dýchacím řetězci a při metabolických přeměnách kyseliny arachidonové. Tyto produkty se začínají tvořit a jejich koncentrace narůstá už při přerušení koronárního průtoku (37).

2.9.4. VOLNÉ RADIKÁLY PRODUKOVANÉ PŘI DEFINOVANÝCH KARDIOVASKULÁRNÍCH CHOROBÁCH

Pozornost na zvýšenou produkci volných kyslíkových radikálů se soustředila na klinické stavy, při kterých evidentně dochází k ischemicko-reperfučnímu syndromu. Takovými jsou především akutní infarkt myokardu s následující spontánní anebo terapeutickou reperfúzí postižené tkáně a další formy subakutní či chronické ischemické choroby (angina pectoris). Poukázalo se na tyto poznatky získané na různých zvířecích modelech. Volné kyslíkové radikály v těchto pokusech způsobovaly depresi srdeční funkce a jeho kontraktility a ovlivňovaly buněčnou integritu, přičemž podání antioxidantních enzymů – superoxiddismutázy a katalázy – mělo zřejmý benefiční efekt.

Akutní infarkt myokardu měl výrazný vliv na zvýšenou produkci lipoperoxidů, což se projevilo zvýšenými hodnotami malondialdehydu v plazmě v prvních dnech onemocnění. V tomto období se současně snižuje aktivita superoxiddismutázy.

S nadprodukcí volných radikálů kyslíku se spojuje i vznik arytmií indukovaných reperfúzí. Hypotéza o možném vztahu se opírá o tyto fakty:

- reperfúze ischemického myokardu potencuje incidenci arytmií, přičemž antioxidanty mají protektivní efekt
- v pokusech in vitro producenti volných kyslíkových radikálů vyvolávají arytmie anebo elektrofyziologické změny
- elektricky vyvolaná fibrilace vyvolává zvýšenou tvorbu ROS i za nepřítomnosti ischemie

Na možnost zvýšené tvorby ROS a jejich metabolitů u různých druhů kardiomyopatií upozornilo už více autorů. Zjistily se změny v aktivitách antioxidantních enzymů a zvýšení hladin produktů lipoperoxidace v krvi pacientů s chronickými formami selhávání srdce a různými druhy kardiomyopatií.

Pacienti s kongestivním srdečním selháním měli vyšší plazmatické hladiny markerů lipoperoxidace v porovnání s kontrolním souborem. Tyto poznatky se potvrdily i při sledování oxidačního stresu u pacientů, kteří měli klinicky diagnostikované různé formy kardiomyopatií, verifikované i morfologicky ve vzorkách získaných endomyokardiální biopsií (37).

Zdá se, že ROS hrají úlohu i v patogenezi srdeční hypertrofie (37). V pokusech na potkanech se ukázalo, že několik týdnů po indukci stabilní hypertrofie srdce dochází ke zvyšování aktivit enzymů antioxidačního systému buněk, naopak množství produktů lipoperoxidace klesá (39). Ukazuje se tedy, že stabilní srdeční hypertrofie je spjatá s vyšší antioxidační kapacitou srdce. Naopak, přechod ze stavu kompenzované srdeční hypertrofie do stavu srdečního selhání provází výrazný pokles endogenních antioxidačních rezerv. Dlouhodobé podávání vitamínu E pokusným zvířatům dokázalo zlepšit antioxidační status myokardu a snížit narůstání oxidačního stresu, který je doprovodným jevem při srdečním selhání (37).

Závěr

Při mnohých kardiovaskulárních chorobách se volné kyslíkové radikály svými cytotoxickými účinky výraznou měrou zúčastňují v patogenezi, jako i na změnách jejich klinického obrazu. Nejtypičtější účast volných kyslíkových radikálů na mechanismu poškození buněk myokardu je možno zjistit při ischemicko-reperfúzním syndromu a vůbec při stavech, které jsou spjaté s hypoxií a ischemií, jako i při patogenezi aterosklerosy. Oxidace lipoproteinů se považuje za jeden z určujících mechanismů při tvorbě aterosklerotických cévních změn. Nepochybuje se o významné účasti ROS při poruchách funkce endotelu cév. Dosud získané poznatky jednoznačně poukazují na nutnost zabezpečit u pacientů co nejoptimálnější antioxidační status a musí se dbát o neustálé doplňování jejich antioxidačních rezerv podáváním účinných antioxidantů např. antioxidačně působících vitamínů a dalších antioxidantů (37).

2.10. CHELATAČNÍ TERAPIE

Přetížení železem může být upraveno chelatační terapií. Možností, která je široko dostupná, je deferoxamin poskytnutý v kontinuální infúzi. Orální chelátory jsou ve vývoji, ale dosud žádný není tak efektivní nebo bezpečný jako deferoxamin (18).

2.10.1. DEFEROXAMIN

Deferoxamin je silný chelátor železa, které je pak v komplexu převážně trojmocné (Fe^{3+}) a tedy oxidoredukčně málo aktivní. 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. Deferoxamin se užívá k léčbě stavů spojených s patologickou kumulací železa v organismu (6).

Dalším významným chelátorem železa je **laktoferin**.

2.11. LAKTOFERIN

2.11.1. STRUKTURA LAKTOFERINU

Laktoferin (LA) je monomerický železo vázající glykoprotein s molekulovou hmotností přibližně 80 kDa. Na úrovni aminokyselinové sekvence i trojrozměrné konformace se LA shoduje přibližně ze 60% se sérovým Tf, společně patří do rodiny proteinů transferinů (40).

Protein je tvořen dvěma homologními globulárními podjednotkami, každá z těchto podjednotek je dále tvořena dvěma doménami (41). Vazebné místo pro železo se nachází na každé podjednotce mezi těmito doménami. Tato místa umožňují pevnou ale reversibilní vazbu dvou molekul železa. Na vazbě železa se synergisticky podílí také vazba CO_3^{2-} , což je unikátní vlastností LA. Ligandy pro vazbu Fe^{3+} jsou shodné na obou podjednotkách LA a shodují se také s ligandy sérového Tf (40).

2.11.2. VLASTNOSTI LAKTOFERINU

V přirozeném stavu je LA z 15 až 20% nasycen železem. LA, který obsahuje méně než 5% železa, byl nazván apolaktoferin. Hololaktoferin je naopak LA plně nasycený železem. V mléce se LA nachází v podobě apolaktoferinu (42).

LA vykazuje vysokou afinitu k železu, asi 260 krát vyšší než je afinita sérového Tf (42). U LA probíhá uvolňování železa v normálním stavu při pH kolem 3, zatímco Tf uvolňuje železo už při pH 5,5 (41).

LA neváže vždy jen železo, je schopen vázat i jiné kationty kovů jako např.: Cu^{2+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Zn^{2+} nebo molekuly jako je DNA, heparin a různé povrchové molekuly (43).

Důležitou schopností LA je inhibice Fentonovy reakce a tím i tvorby nebezpečných volných radikálů (44).

2.11.3. VÝSKYT A ÚČINKY LAKTOFERINU

LA se fyziologicky vyskytuje v mnoha tkáních, orgánech i tekutinách lidského těla. Funkce LA v organismu není přesně popsána, i když je LA intenzivně studován. Vykazuje celé spektrum aktivit a jeho funkce bude pravděpodobně komplexní (45).

Výskyt

LA se přednostně vyskytuje v sekretech exokrinních žláz, např. v slizách, slinách, mléce, synoviální a seminální tekutině, které jsou lokalizovány ve vstupech do respiračního, trávicího a reprodukčního systému. To ukazuje na jeho důležitou roli v boji proti patogenům (45).

Protein je skladován v dospělých monocytech a neutrofilech v sekundárních granulích, kde zůstává v nezměněné podobě do doby buněčné aktivace. Po kontaktu s cizím antigenem tyto buňky degranulují a uvolňují velké množství antibakteriálních a antivirových peptidů, mezi které patří i LA. Tento proces je hlavním zdrojem LA v plasmě. Hladina LA v plasmě je při fyziologickém stavu velmi nízká (1 µg/ml), ale při některých patologických stavech, jako je zánět, prudce stoupá a dosahuje koncentrace až 200 µg/ml. Po degranulaci je LA odstraněn z cirkulace různými mechanismy, převážně pomocí buněk monocyto-makrofágového systému. Tyto buňky mají receptory s vysokou afinitou k LA a dopravují vázané železo do Ft, což je spojeno s destrukcí LA (46).

Receptory pro LA se vyskytují na mnoha různých orgánech např. na povrchu hepatocytů nebo intestinálních buněk, ale i na povrchu makrofágů a lymfocytů (47). Na rozdíl od Tf, receptory pro LA nejsou internalizovány do buněk. Transepiteliální transport se uskutečňuje buď cestou degradace, kdy je většina LA rozložena a železo je uvolňováno intracelulárně, nebo imunoreaktivní LA přechází přes epitel se železem stále navázaným (48).

Účinky laktoferinu

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

Jeho účinky většinou souvisí se schopností vázat železo a jiné molekuly, např. různé buněčné povrchové molekuly, DNA, heparin, aj (45).

Účinky LA :

1. antibakteriální – bakteriostatický i baktericidní
2. antivirový
3. antifungální
4. antiparazitický
5. antitumorový
6. ovlivnění zánětu
7. imunomodulační
8. ovlivnění hypersenzitivní reakce
9. enzymatická aktivita
10. regulace transkripce genů
11. přirozený antioxidant
12. ochrana před lipidovou peroxidací

Antimikrobiální účinky

LA má extrémní schopnost vázat železo. Antimikrobiální schopnost LA byla dlouho přisuzována především vychytávání železa, což je jedna z esenciálních živin pro patogeny. Při nedostatku železa dochází k zastavení růstu bakterií (49).

Další mechanismus antibakteriálního účinku LA je nezávislý na železe. Je zajištěn vazbou LA na lipopolysacharid G- bakterií. LA je schopen destabilizovat vnější membránu G- bakterií, což vede k uvolnění lipopolysacharidu (49). Tím dochází ke změně permeability membrány, zvýšení citlivosti k jiným antibakteriálním působkům a následné smrti mikroorganismu (50).

Antivirové účinky

LA působí hlavně preventivně, než virus napadne buňku. U napadených buněk už nemá žádný inhibiční efekt. Blokuje v hostitelské buňce místa, která fungují jako receptor pro vir (51).

Antitumorové působení

LA působí různými mechanismy (např. se podílí na aktivaci NK buněk, rozvíjí makrofágovou cytotoxicitu). Na zvířecích modelech byla dokázána schopnost LA bránit rozvoji experimentálních tumorů, většinou ale jeho pozitivní působení nesouvisí s vazbou železa (52).

Ovlivnění zánětu

LA kompetuje s L-selektinem o vazbu k lipopolysacharidu a tím snižuje produkci kyslíkových radikálů. L-selektin je lipopolysacharidový receptor na buněčném povrchu neutrofilů. Lipopolysacharid se váže na L-selektin, následně dochází k aktivaci leukocytů, oxidativnímu vzplanutí a tvorbě volných reaktivních radikálů.

Současně LA ovlivňuje zánětlivou reakci organismu a tvorbu ROS i jiným mechanismem, který je dán jeho schopností vázat železo. Železo je základní složkou kontroly tvorby ROS. Tvorba hydroxylového radikálu vede k rozvoji fagocytární mikrobicidní aktivity a k lipidové peroxidaci. ROS včetně hydroxylového radikálu může reagovat se všemi typy biologických molekul, což následně může vést k narušení funkce těchto molekul a tím k poškození organismu. V přítomnosti Fe^{2+} peroxid vodíku spontánně přechází v hydroxylový radikál. Fe^{3+} vzniklý v této reakci je vázán LA a bezpečně transportován do makrofágů retikulo - endoteliálního systému, kde je skladováno v podobě Ft. Endogenní LA se tedy podílí na regulaci vzniku ROS (52).

LA **chelatuje** trojmocné železo a tak působí proti tvorbě volných radikálů. Bylo prokázáno, že brání vzniku hydroxylového radikálu, který vzniká při Fentonově reakci a je zodpovědný za poškození všech typů molekul – proteinů, lipidů i DNA (53).

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, Česká republika)

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

kanylky

Valu-Set, PE katetry

tlakový snímač BPR-02

plně komputerovaný přístroj pro měření srdečního výdeje a odvozených parametrů 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 (LA) do postranní ocasní žíly pomocí kanylky a Valu-Setu. Jednotlivé dávky intravenózně podaného LA byly 21,2 mg/kg, 100,0 mg/kg a 47,19 mg/kg (viz Tabulka č. 2). Pro usnadnění aplikace LA byly žíly dilatovány nahříváním ocasu horkou vodou. Sledovali jsme edematózní změny a hematurii u samice s nejvyšší dávkou (100,0 mg/kg), a proto byla tato samice sledována v pravidelných časových intervalech.

Tabulka č. 2: 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 infarktu myokardu 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 (Rs,totl; mmHg.ml⁻¹.min.kg)**
- **index srdečního výkonu, CI x mBP (CPOI; mmHg.ml.min⁻¹.kg⁻¹)**

(54)

Naměřené hodnoty u modelového případu jsou shrnuty v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: 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 LAKTOFERINU

Tři dny jsme aplikovali 3 potkanům opakovaně laktoferin (LA) 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 ISO. Čtvrtému a pátému potkanovi (LAI3, LAI4) byl aplikován jednorázově LA v dávce 50 mg/kg a po 5 minutách ISO (viz Tabulka č. 4).

Tabulka č. 4: Schéma podání 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 LA 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. Poté 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 UŽITÉ 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)
kyselý fuchsin (ACROS ORGANICS)
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)

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, protoplasmu buněk a tkání fixačními prostředky. Cílem je zabránit samovolnému rozkladu tkáně neboli autolýze. Ta je podmíněna působením enzymů a vede rychle k hrubým změnám protoplasmu 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 přenáší 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 prohlížíme preparát v optickém mikroskopu, jednotlivé složky tkáně se takřka neliší lomivostí světla. Při barvení využíváme toho, že různé součásti buněk a tkání vážou různá barviva, takže je v mikroskopu zřetelně rozlišíme. Základním barvením preparátu je hematoxylin & 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 SVĚTELNOU MIKROSKOPII

1. Hematoxylin a eosin

Odparafinování: 3x xylen5 min
96 % ethanol.....5 min
70 % ethanol5 min
destilovaná voda5 min
otření sklíček

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

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

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

Projasnění: 3x xylén3 min
otření sklíček

Zamontování do kanadského balzámu

Výsledek barvení:

Jádra buněk a chrupavka modře, kolagenní vazivo růžově, svalstvo červeně.

2. Zelený trichrom (Massonovy trichromy)

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

Roztoky:

Roztok kyselého alkoholu: kyselina octová10 ml
96% ethanol990 ml

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

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

kyselý fuchsin2 g
destilovaná voda200 ml
kyselina octová2 ml

Roztok B: postup jako u roztoku A

ponceau 2R2 g
destilovaná voda200 ml
kyselina octová2 ml

Roztok oranže G a kyseliny fosfomolybdenové:

destilovaná voda200 ml
kyselina fosfomolybdenová 10 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. Pearlova 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 – xylen (2:1)....3 min
ethanol – xylen (1:2)....3 min

Projasnění: 3x xylen3 min
otření sklíček

Zamontování do kanadského balzámu

Výsledek barvení:

Trojmocné železo je zbarveno modře, jádra buněk červeně.

4. Weigertův železitý hematoxylin – van Giesonův pikrofuchsin

Odparafinování: 3x xylen5 min
96 % ethanol.....5 min
70 % ethanol5 min
destilovaná voda5 min

otření sklíček

Barvení:

Weigertův hematoxylin.....	15 – 20 min
pramenitá voda	5 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 – xylen 2:1.....	opláchnutí
ethanol – xylen 1:2.....	opláchnutí
3x xylen	3 min

Roztoky:

Weigertův železitý hematoxylin

roztok A

ethanol 96%.....	100,0 ml
hematoxylin	1,0 m

roztok B

destilovaná voda	95,0 ml
chlorid železitý.....	0,6 g
kyselina chlorovodíková.....	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

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

Projasnění: 3x xylen 3 min
otření sklíček

Zamontování do kanadského balzámu

Výsledek barvení:

Jádra se barví čemohnědě, kolagenní vazivo červeně, svalstvo žlutě.

(55)

4. VÝSLEDKY

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

4.1. PILOTNÍ STUDIE

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

Tabulka č. 2: 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

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

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

4.2. VLIV LAKTOFERINU NA MODEL AKUTNÍHO INFARKTU MYOKARDU

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

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

Index vlhké hmotnosti komor (wet ventricle index)

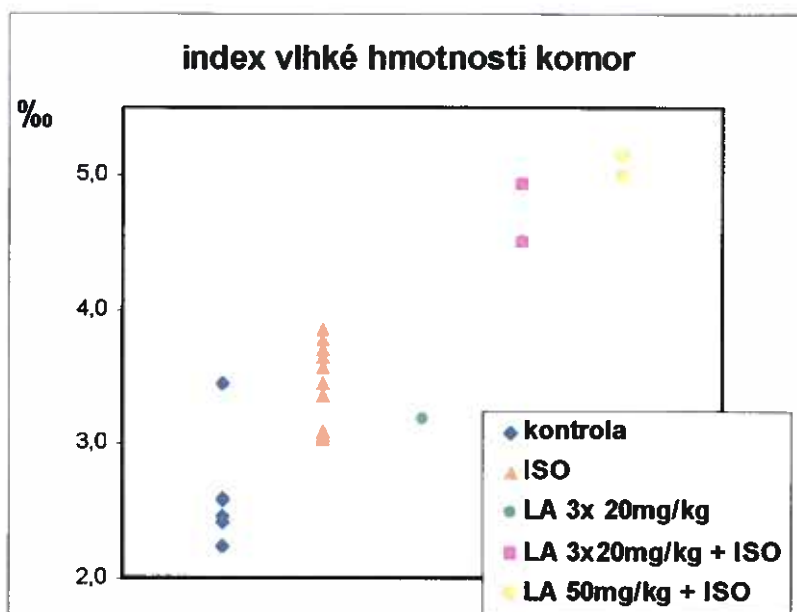
Index vlhké hmotnosti komor představuje poměr hmotnosti komor a hmotnosti zvířete [‰]. Index má u zdravého kontrolního zvířete nízké hodnoty - přibližně 2,5 ‰, nevyskytuje se zde žádný otok.

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

U kontrolního vzorku (LA1, viz Tabulka č. 4: Schéma podání laktoferinu) s opakovaným podáním LA (3x20 mg/kg), LA sám o sobě zvyšuje hodnoty podobně jako podání ISO – to vyplývá z jeho biologických účinků plynoucích z i.v. podání, které stimuluje imunitní reakci (viz edematózní projevy v pilotní studii).

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

Graf č. 1: Index vlhké hmotnosti komor



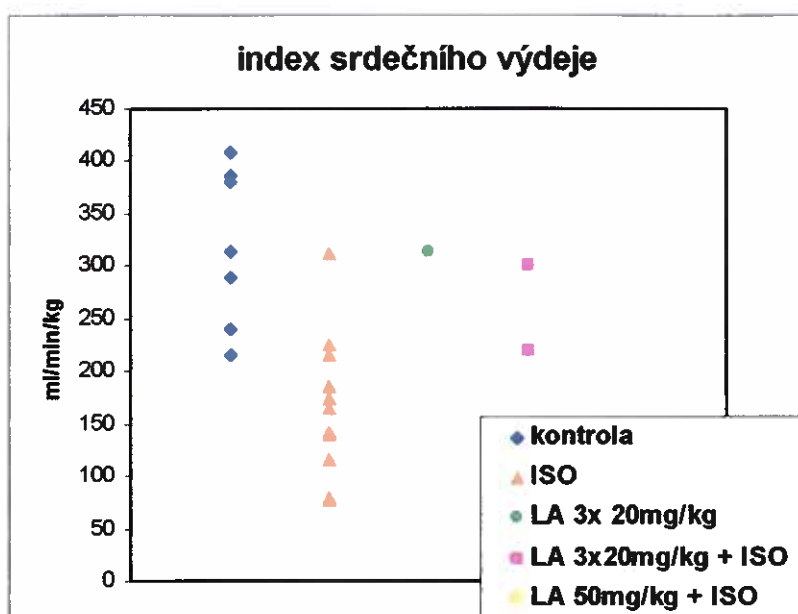
Index srdečního výdeje (cardiac index) [ml/min/kg]

Index srdečního výdeje se rovná poměru 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 LA 3x20 mg/kg) se blížila hodnotě 300 ml/min/kg, po podání LA 3x20 mg/kg + ISO (LAI1 a LAI2) se hodnoty pohybovaly v rozmezí 200 až 300 ml/min/kg a při jednorázovém podání LA 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



4.3. VYHODNOCENÍ HISTOLOGICKÝCH PREPARÁTŮ

Na histologické ověření změn, které po experimentálním podání laktoferinu a následně isoprenalinu vyvolaly ve struktuře myokardu obraz podobný nálezu při akutní infarzaci, 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 difference.

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

Při středním a větším zvětšení vidíme, že svalové buňky v oblasti čerstvého infarktu jsou dobře ohraničené, zachovávají svůj tvar, ale jejich cytoplasma 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 (**obrázek č. 2 a 3**). Jádra v takovýchto oblastech se rozpadla karyolýzou nebo karyorexí. Na určitých úsecích hranice nekrotické a zachovalé tkáně byly pozorovatelné i průřezy dystroficky změněnými myocyty s výrazným hydropickým vakuolizováním cytoplasmy (**obrázek č. 4**). Velmi nápadným nálezem byla přítomnost leukocytárního infiltrátu v intersticiu a rovněž výrazná leukostáza v kapilárách myokardu (**obrázek č. 5**). Zvláště na přehledných podélných řezech je dobře patrný gradient směru a hustoty leukocytárního infiltrátu od střední části myokardu k jeho hrotu (**obrázek č. 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 (**obrázek č. 7 a 8**).

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

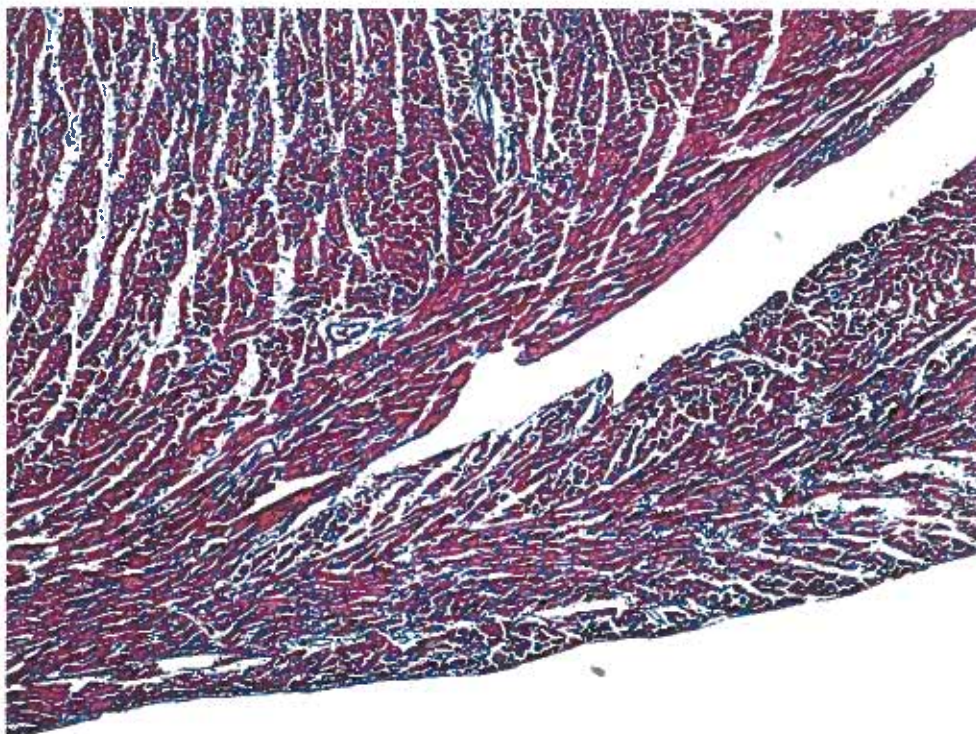
Leukostáza vytvořená v kapilárním řečišti zásobujícím myokard je tvořena převážně nahromaděnými neutrofilními leukocyty. Postupně tyto buňky prostupují intersticiem, které je edematózně prosáknuté a oddaluje od sebe kardiomyocyty intaktní i ty, které již podlely úplné nekróze s rozpadem jader, ztrátou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

Zvláště instruktivní byl takovýto obraz pozorován při velkém zvětšení na preparátech barvených kombinací pomocí jádrového barvení železitým hematoxylinem podle Weigerta a van Giesonova barvení pikrofuchsinem. Tam se nekrotický rozpad myocytů a jejich degranulovaný obsah dobře barevně

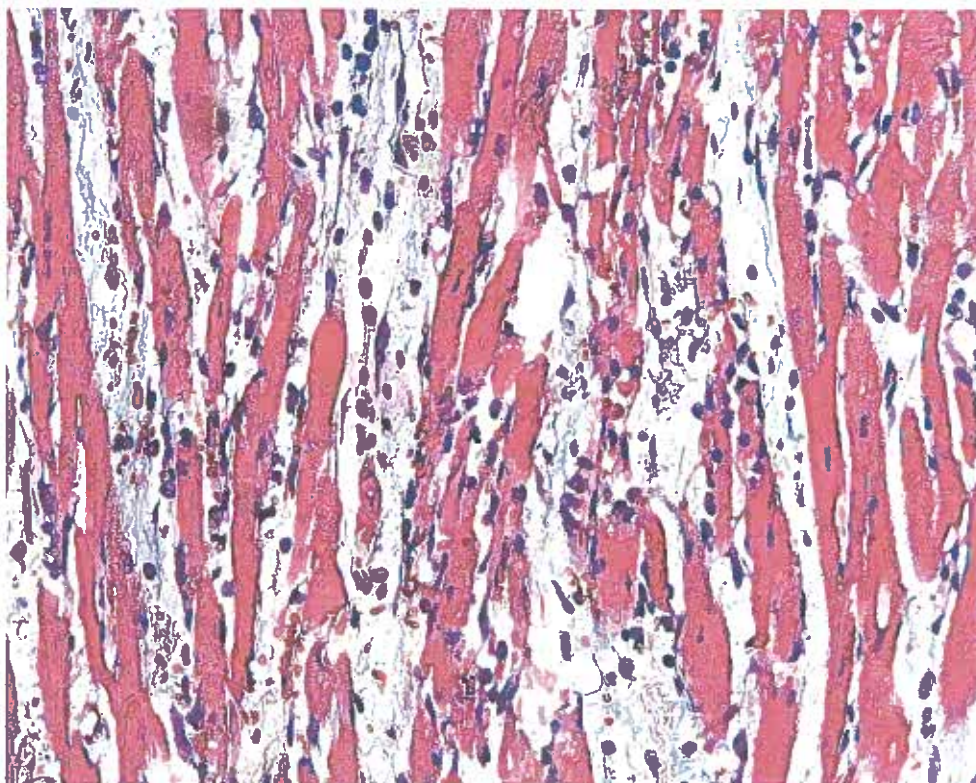
odlišil od červenofialového zbarvení vláknitých komponent vazivové tkáně intersticia a tmavých vřetenovitých jader fibroblastů. Současně byla pozorována ve stejné lokalitě přítomnost elementů polymorfonukleárního infiltrátu (**obrázek č. 10**).

Nutno poznamenat, že tento typ ischemické nekrózy v čase odběru po 24 hodinách 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.

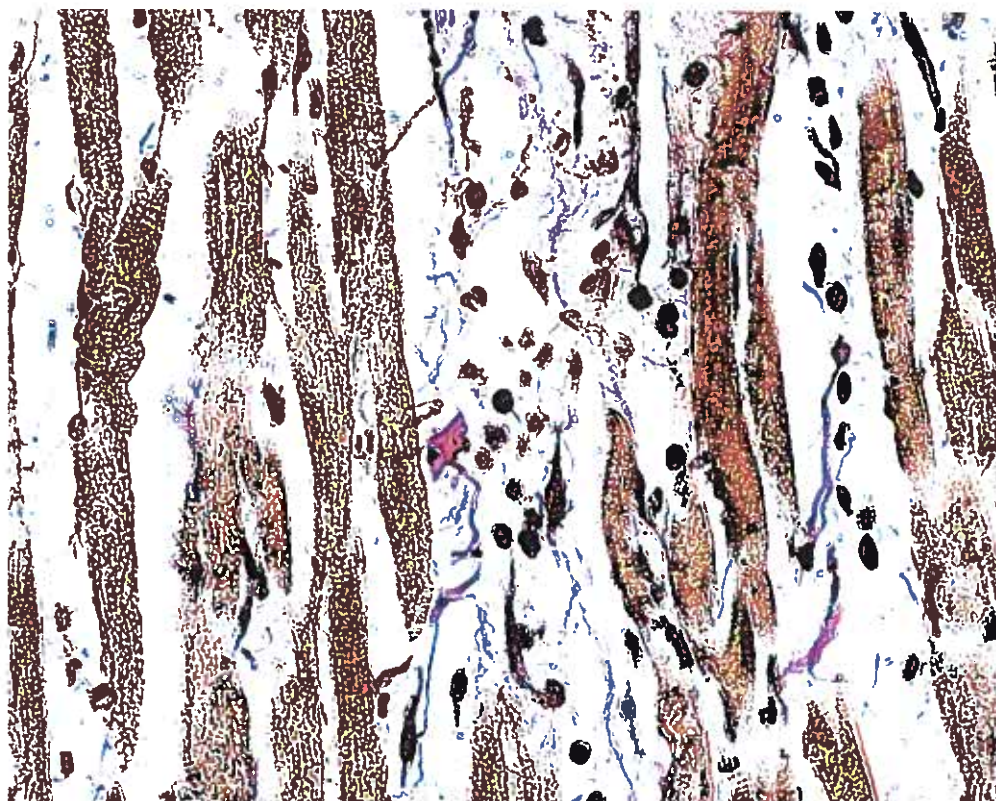
Obrázek č. 1: KONTROLA – zdravý myokard – barvení: hematoxylin - eosin, zvětšení: 40x



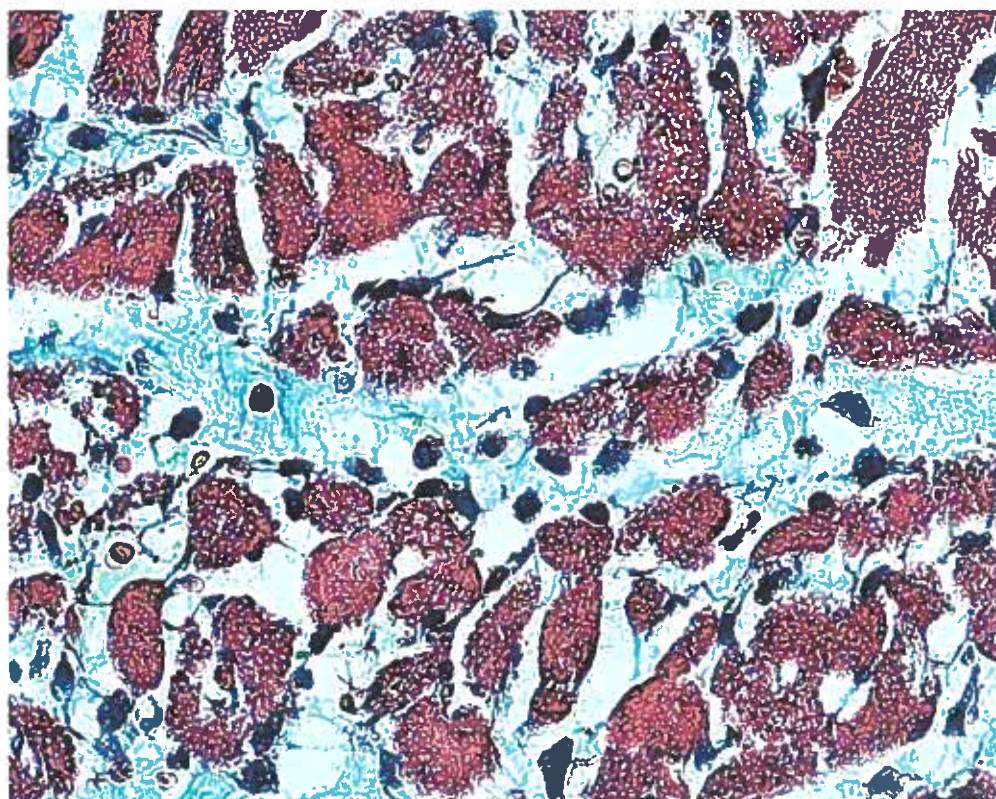
Obrázek č. 2: LA+ISO - myokard – barvení: hematoxylin - eosin, zvětšení: 200x



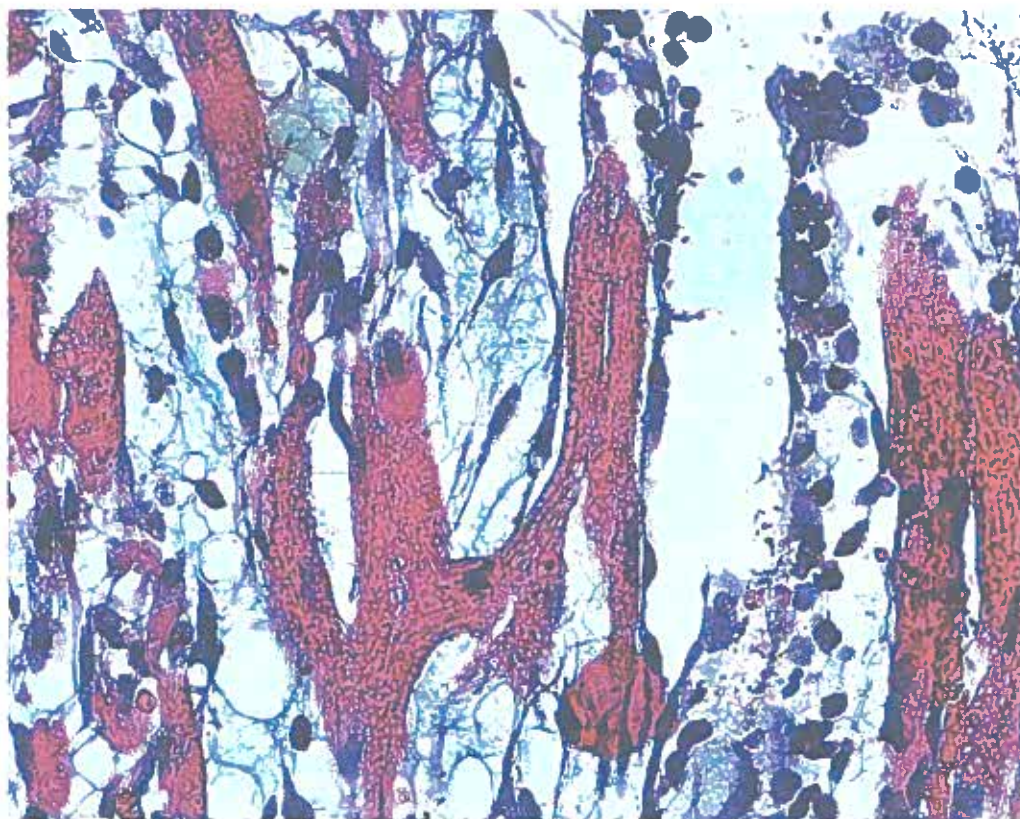
Obrázek č. 3: LA+ISO - myokard – barvení: Weigertův železitý hematoxylin – van Giesonův pikrofuchsin, zvětšení: 200x



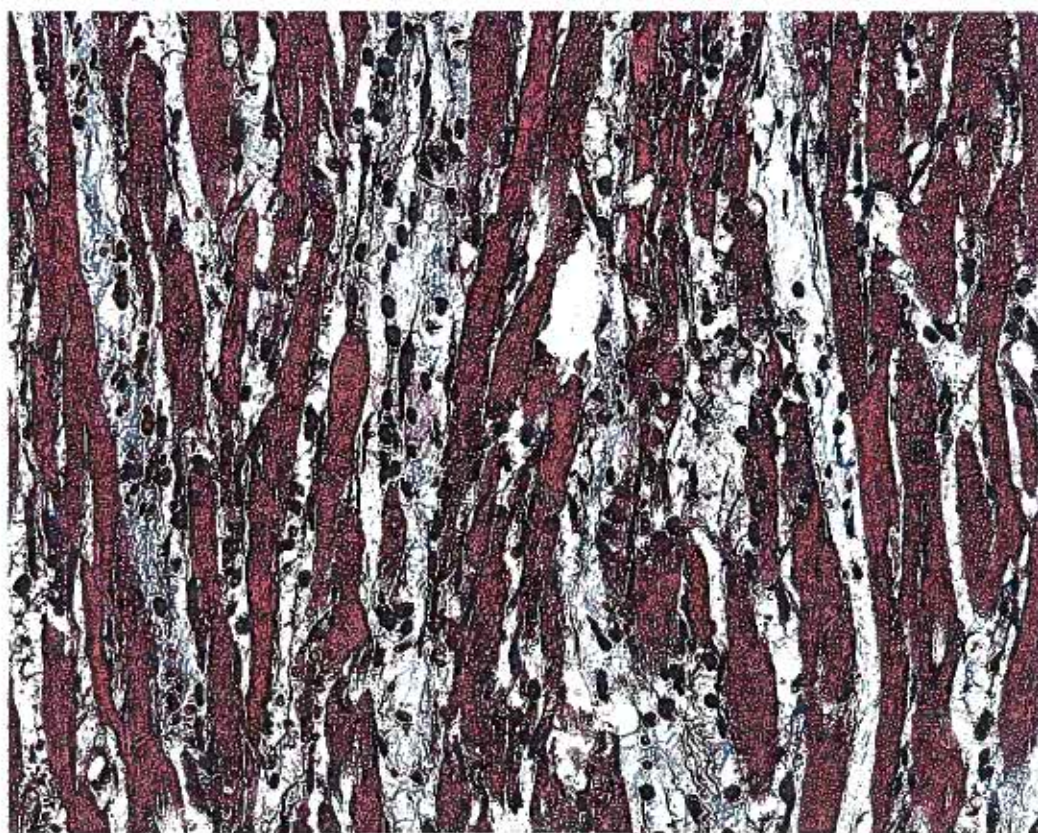
Obrázek č. 4: LA+ISO – myokard –barvení: hematoxylin - eosin, zvětšení: 400x



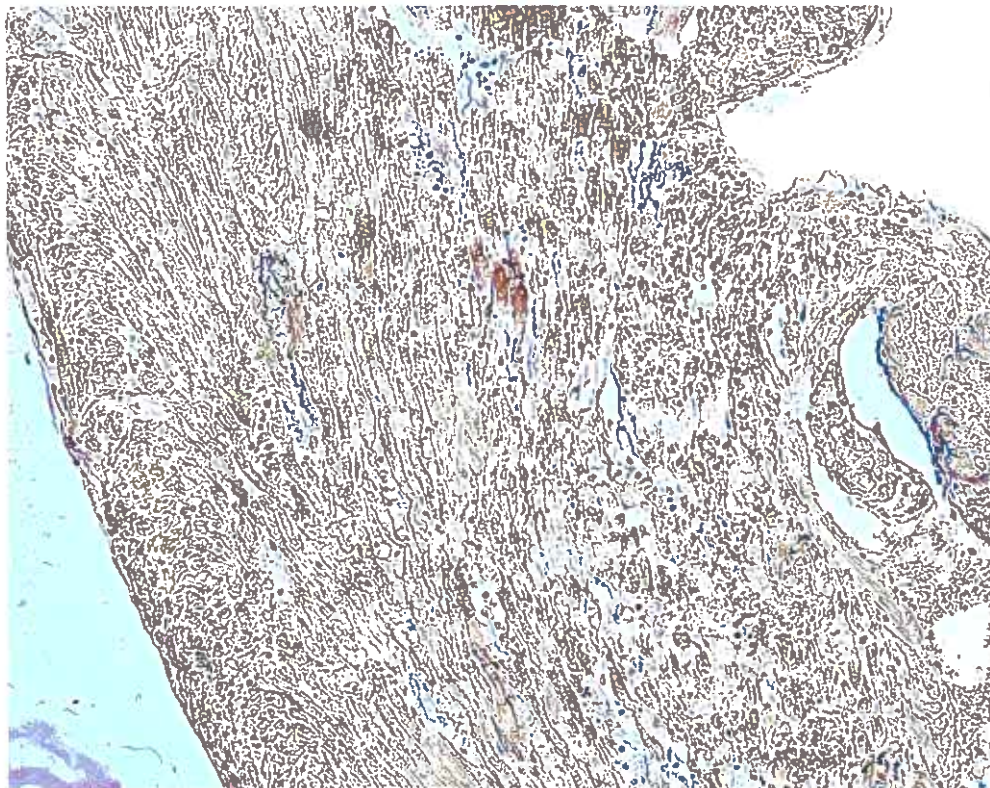
Obrázek č. 5: LA+ISO – myokard – barvení: hematoxylin - eosin, zvětšení: 400x



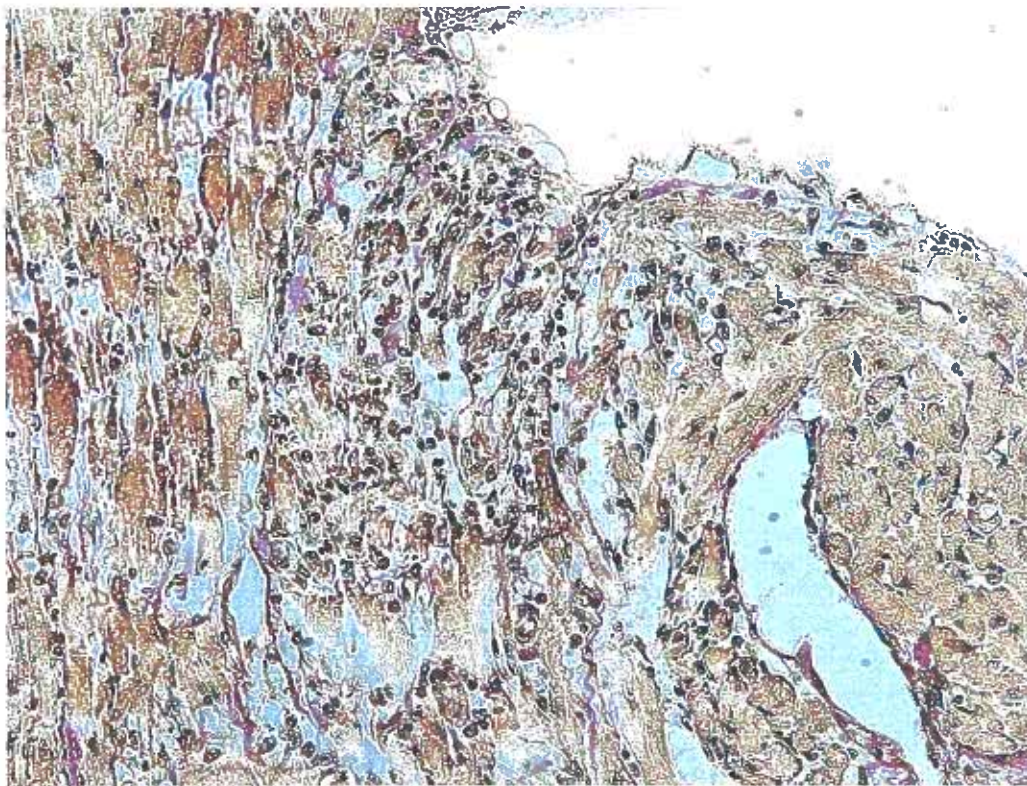
Obrázek č. 6: LA+ISO – myokard – barvení: hematoxylin - eosin, zvětšení: 200x



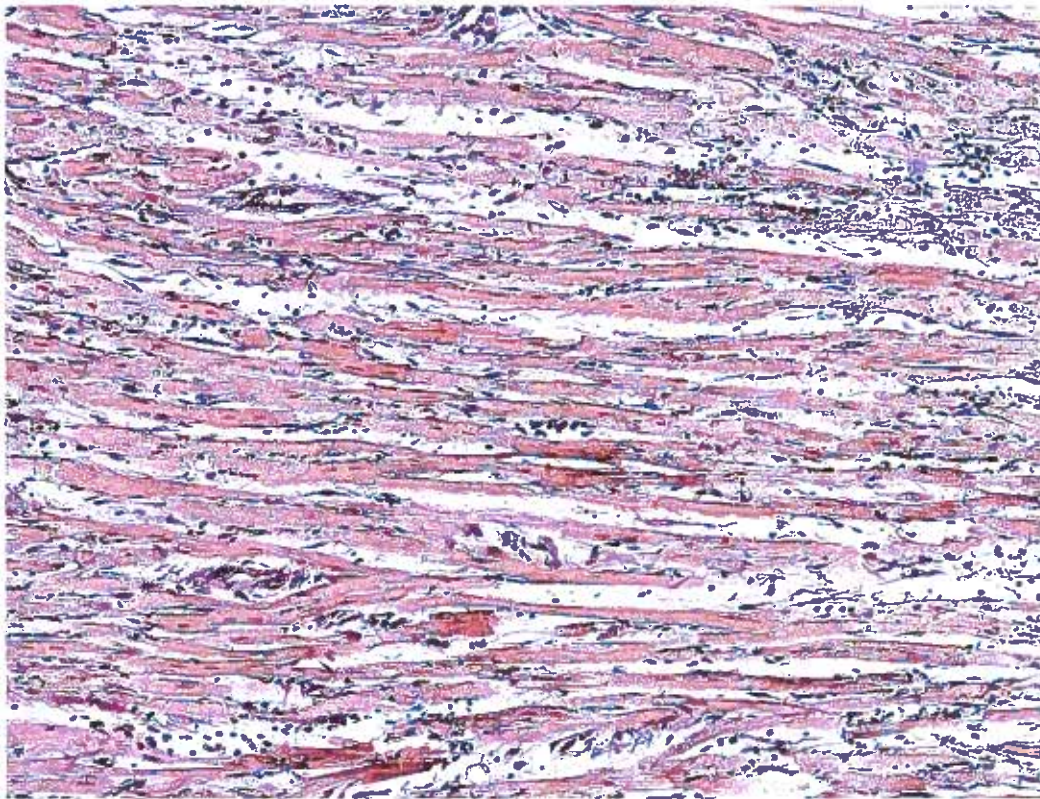
Obrázek č. 7: LA+ISO – barvení: Weigertův železitý hematoxylin – van Giesonův pikrofuchsin, zvětšení: 100x



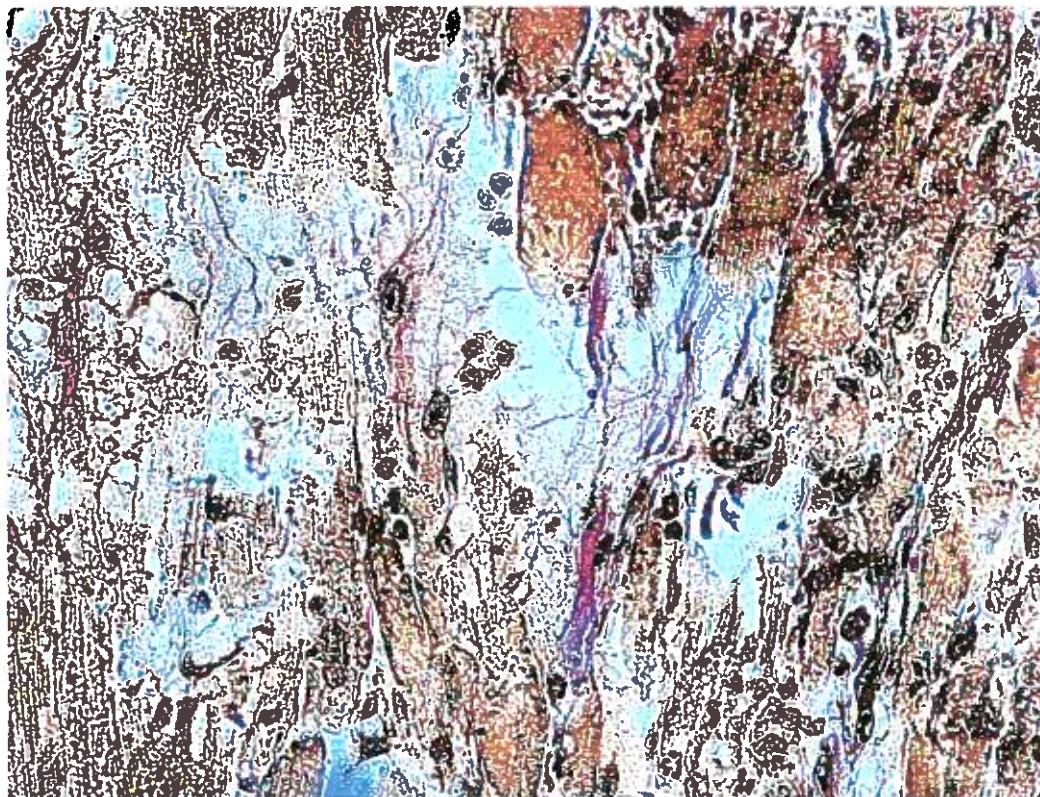
Obrázek č. 8: LA+ISO – myokard – barvení: Weigertův železitý hematoxylin – van Giesonův pikrofuchsin, zvětšení: 200x



Obrázek č. 9: LA+ISO – myokard – barvení: hematoxylin - eosin, zvětšení:100x



Obrázek č. 10: LA+ISO – myokard – barvení: Weigertův železitý hematoxylin – van Giesonův pikrofuchsin, zvětšení: 400x



5. DISKUSE

Cílem naší práce bylo charakterizovat účinky laktoferinu v organismu zdravého zvířete a zvířete s indukovaným infarktem myokardu. Hlavním záměrem bylo ověřit možnost využití laktoferinu jako chelátoru železa a tím stanovení jeho protektivních účinků při vzniku volných kyslíkových radikálů.

Jelikož naše práce byla založena na schopnosti laktoferinu chelatovat železo, seznámili jsme se zprvu s rolí, metabolismem a regulačními cestami tohoto prvku v organismu. Redoxní vlastnosti železa ho činí nezbytným pro základní buněčné funkce, ale díky této vlastnosti je také důležitým katalyzátorem chemických reakcí volných radikálů, následuje oxidativní stres a buněčné poškození. Tyto reakce mají díky produkci volných radikálů patologický charakter.

S ohledem na klíčový význam i potenciální toxicitu musí být množství železa a jeho distribuce v rámci organismu regulovány. V několika posledních letech bylo dosaženo pokroku ve studiu kinetiky železa na úrovni organismu i jednotlivých orgánů a buněk, byly popsány nové proteiny, které se těchto dějů zúčastňují, ale mnohé mechanismy zůstávají nevyjasněny.

V současnosti se medicína zabývá vyhledáváním látek, které by působily protektivně při ischemicko – reperfučním poškození, ale i u dalších patologických stavů zapříčiněných působením volných kyslíkových radikálů. Hledají se přírodní i syntetické antioxidačně působící látky. Pozornost také upoutaly látky, které chelatují železo v organismu a tím snižují jeho aktivní množství. Významným chelátorem železa je deferoxamin. Hledají se další struktury, které by se daly využít pro jejich protektivní působení.

Velmi perspektivní molekulou v této oblasti se jeví laktoferin. Laktoferin je tělu vlastní glykoprotein. V organismu vykazuje mnoho účinků, včetně schopnosti chelatovat železo. Svoji strukturou a biochemickými vlastnostmi ukazuje, že může hrát určitou roli v metabolismu železa jako jeho transportní molekula. Přestože je ale laktoferin intenzivně zkoumán, stále chybí přesvědčivý důkaz o jeho zapojení do regulace homeostázy železa. Další

studium laktoferinu by mělo být přínosem v terapii onemocnění zapříčiněných působením volných kyslíkových radikálů. Laktoferin představuje slibný článek v ochraně tkáni vůči železem – katalyzovaným reakcím.

Co se týká lokalizace, soustředil se náš zájem především na změny v myokardiální tkáni, především na ischemicko – reperfúzní poškození.

Zaměřili jsme se na metabolismus železa v organismu, hlavně na spojitost mezi hladinami železa v organismu a výskytem kardiovaskulárního poškození. Vycházeli jsme z mnohých experimentálních studií, převážně zahraničních, zaměřených na tuto problematiku. Řada studií prokazovala souvislost mezi nadměrnými hladinami železa v organismu a kardiovaskulárním poškození. Některé studie tuto souvislost ale nepotvrdily.

Pro experiment jsme použili jako zvířecí model samce i samice laboratorního potkana kmene Wistar. 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. Následně jsme provedli histopatologické vyšetření.

Z výsledků našeho experimentu jednoznačně nevyplývá, že by docházelo k výraznému protektivnímu účinku laktoferinu při ischemii myokardu. Použili jsme ale malý počet experimentálních jedinců, proto nemůžeme protektivní efekt laktoferinu zcela vyloučit. Navíc jsme u jednoho zvířete, kterému byl opakovaně podáván laktoferin, zaznamenali menší známky poškození myokardu oproti dalším experimentálním zvířatům.

Protože při ischemicko – reperfúzním poškození hraje důležitou roli železo, zamýšleli jsme také lokalizovat depozita železa ve strukturách poškozeného myokardu. Přes opakované použití specifických metod a jejich modifikací se nám to ale nepodařilo.

My jsme podávali laktoferin pouze i.v. jednorázově nebo i.v. opakovaně (3 aplikace). V navazujících studiích by bylo vhodné použít větší počet

experimentálních jedinců a vyzkoušet jiné formy podání laktoferinu (p.o. dlouhodobě) v různých dávkových schématech.

Naše výsledky sice neukazují na jednoznačné protektivní působení laktoferinu při ischemicko – reperfúzním poškození myokardu, ale další studie by mohly vést k osvětlení účinku laktoferinu při tomto patologickém stavu a k nalezení optimálního dávkového schématu, délky a způsobu podávání laktoferinu.

6. ZÁVĚR

Závěrem můžeme konstatovat, že se nám nepodařilo jednoznačně prokázat protektivní účinek laktoferinu při ischemicko – reperfúzním poškození myokardu. Přes opakované použití specifických metod a jejich modifikací se nám nepodařilo ani lokalizovat depozita železa ve strukturách poškozeného myokardu.

Nejprve jsme provedli pilotní studii podávání laktoferinu, na ni jsme navázali studií vlivu laktoferinu na model akutního infarktu myokardu. Pro studium infarktu myokardu jsme vybrali isoprenalinový model. K experimentům jsme použili samce i samice laboratorního potkana. Potkanům jsme podali isoprenalin s. c. v dávce 100 mg/kg a za 24 hodin po aplikaci jsme měřili funkční parametry. V celkové anestezii jsme provedli měření srdečního výdeje a odvozených parametrů s využitím Stewartovy – Hamiltonovy termodiluční metody. Dále jsme provedli histologické vyšetření vybraných orgánů se zaměřením na myokard.

Na histologické ověření změn, které po experimentálním podání laktoferinu a následně isoprenalinu vyvolaly ve struktuře myokardu obraz podobný nálezu při akutní infarzaci, jsme zvolili příčné i podélné řezy celým vypreparovaným srdcem. Při velkém zvětšení byly dobře pozorovatelné histologické změny způsobené ischemickou nekrózou srdeční svaloviny. Zvláště instruktivní byl takovýto obraz pozorován při velkém zvětšení na preparátech barvených kombinací pomocí jádrového barvení železitým hematoxylinem podle Weigerta a van Giesonova barvení pikrofuchsinem.

V navazujících studiích by bylo vhodné vyzkoušet další možnosti podávání laktoferinu (p.o.) v různých dávkových schématech. Další studium účinků laktoferinu by mělo být přínosem v terapii onemocnění zapříčiněných působením volných kyslíkových radikálů.

Seznam literatury

- 1) PÁCAL, L., KAŇKOVÁ, K.: *Novější poznatky o metabolismu železa a jeho poruchách*. Časopis lékařů českých, Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 1/2004, Praha, 2004, s. 9-14, ISSN: 0008-7335.
- 2) VOKURKA, M., NEČAS, E.: *Hepcidin – peptid regulující množství a distribuci železa v organismu ve zdraví a nemoci*. Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, 8/2003, Praha, 2003, s. 465-469, ISSN: 0008-7335.
- 3) MASOPUST, J.: *Klinická biochemie*. Karolinum, Praha, 1998, s. 627-632.
- 4) RACEK, J.: *Železo, volné radikály a ateroskleróza*. Vnitřní lékařství, Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha, ročník 50, č.3, 2004, s. 181-183, ISSN: 0042-773X.
- 5) 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, s. 9-18.
- 6) ŠTÍPEK, S., et al.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Grada Publishing, spol. s r. o., Praha, 2000, s. 21-23, 27, 54-55, 65-70, 76, 117, 286, ISBN: 80-7169-704-4.
- 7) 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, Jun 12, 103(23):2799-2804.
- 8) ĎURAČKOVÁ, Z.: *Volné radikály a antioxidanty v medicíne (I)*. Slovak Academic Press, s.r.o., 1998, s. 281-282, ISBN: 80-88908-11-6.

- 9) CAIRO, G., PIETRANGELO, A.: *Iron regulatory proteins in pathobiology*. Biochem. J., 2000, s. 241-250.
- 10) NAPIER, I., PONKA, P., RICHARDSON, D. R.: *Iron trafficking in the mitochondrion : novel pathways revealed by disease*. Blood, 2005, March 1, Vol. 105, No. 5, s. 1867-1874.
- 11) VOET, D., VOETOVÁ, J. G.: *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha, 1990, s. 10-11, ISBN: 80-85605-44-9.
- 12) SANTOS, M., de SOUSA, M., MARX, J. J. M.: *Regulation of intracellular iron levels in iron-acceptor and iron-donor cells*. Transfusion Science 23, 2000, s. 225-235.
- 13) PIETRANGELO, A.: *Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 282, 2002, G403-G414.
- 14) KUHN, L. C.: *Molecular regulation of iron proteins*. Baillieres Clin Haematol, 1994, Dec, 7(4) : 763-785 (Abstract).
- 15) ČIHÁK, R.: *Anatomie 2*. Avicenum, 1988, s. 82-89.
- 16) ROY, C. N., ENNS, C. A.: *Iron homeostasis : new tales from the crypt*. Blood, 2000, Vol. 96, No. 13, s. 4020-4027.
- 17) KAPLAN, J.: *Mechanisms of cellular iron acquisition : another iron in the fire*. Cell, Vol. 111, 2002, s. 603-606.
- 18) ANDREWS, N. C.: *Disorders of iron metabolism*. The New England Journal of Medicine, Medical Progress, 1999, s. 1986-1995.

- 19) ABOUD, S., HAILE, D. J.: *A novel mammalian iron –regulated protein involved in intracellular iron metabolism*. J. Biol. Chem., Vol. 275, 2000, s. 19906-19912.
- 20) CONNOR, J. R., BEARD, J. L.: *Dietary iron supplements – Use or not to use?*. Nutrition Today, 1997, May – June, http://www.findarticles.com/p/articles/mi_m0841/is_n3_v32/ai_19588769/pg_3.
- 21) ZIMA, T.: *Laboratorní diagnostika*. Galén, Praha, 2002, s. 38-40.
- 22) PONKA, P., BEAUMONT, C., RICHARDSON, D. R.: *Function and regulation of transferrin and ferritin*. Semin Hematol., 1998, Jan, 35(1):35-54 (Abstract).
- 23) HENTZE, M. W., MUCKENTHALER, M. U., ANDREWS, N. C.: *Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism*. Cell, Vol. 117, 2004, April, s. 285-297.
- 24) EISENSTEIN, R. S., BLEMINGS, K. P.: *Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis*. The Journal of Nutrition, Vol. 128, 1998, December, s. 2295-2298.
- 25) OKA, J. M., SIMIĆ, D. V., SIMIĆ, T. P.: *Free radicals in cardiovascular diseases*. Facta universitatis, Medicine and Biology, Vol. 6, No. 1, 1999, s. 11-22.
- 26) TAKETANI, S.: *Aquisition, mobilization and utilization of cellular iron and heme: endless findings and growing evidence of tight regulation*. Tohoku J. Exp. Med., 2005, s. 297-318.
- 27) HARRISON, P. M., AROSIO, P.: *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. Biochim Biophys Acta, 1996, Jul, 1275(3):161-203 (Abstract).

- 28) KRUSZEWSKI, M.: *The role of labile iron pool in cardiovascular diseases*. Acta Biochimica Polonica, Vol. 51, No. 2, 2004, s. 471-480.
- 29) SCHWARTZ, K. A., LI, Z., SCHWARTZ, D. E., COOPER, T. G., BRASELTON, W. E.: *Earliest cardiac toxicity induced by iron overload selectively inhibits electrical conduction*. J Appl Physiol, Vol. 93, 2002, August, s. 746-751.
- 30) PENKA, M., BULIKOVÁ, A., MATÝŠKOVÁ, M., ZAVŘELOVÁ, J.: *Hematologie I*. Grada Publishing, spol. s. r. o., Praha, 2001, s. 15-16, ISBN: 80-247-0023-9.
- 31) WEINBERG, E. D.: *Iron loading and disease surveillance*. Emerging Infectious Diseases, 1999, 5:346-352.
- 32) BUREŠ, J., HORÁČEK, J.: *Základy vnitřního lékařství*. Galén, Praha, 2003, s. 363-365, ISBN: 80-7262-208-0.
- 33) de VALK, B., MARX, J. J. M.: *Iron, atherosclerosis, and ischemic heart disease*. Arch Intern Med., 1999, 159: 1542-1548.
- 34) MATTERA, R., STONE, G. P., BAHUR, N., KURYSHEV, Y. A.: *Increased release of arachidonic acid and eicosanoids in iron-overloaded cardiomyocytes*. Circulation, 2001, 103:2395.
- 35) ANDERSON, L. J., WESTWOOD, M. A., HOLDEN, S., DAVIS, B., PRESCOTT, E., WONKE, B., PORTER, J. B., WALKER, J. M., PENNELL, D. J.: *Myocardial iron clearance during reversal of siderotic cardiomyopathy with intravenous desferrioxamine: a prospective study using T2* cardiovascular magnetic resonance*. British Journal of Haematology, Vol. 127, 2004, November.

- 36) MA, J., STAMPFER, M. J.: *Body iron stores and coronary heart disease*. Clinical Chemistry, 2002, 48:601-603.
- 37) ĎURAČKOVÁ, Z., BERGENDI, L., ČÁRSKY, J., et al.: *Volné radikály a antioxidanty v medicíne II*. Slovak Academic Press, s. r. o., 1999, s. 75-79,90-97, ISBN: 80-88908-46-9.
- 38) WATTS, R. N., WARDROP, S. L., RICHARDSON, D.: *Studies on the mechanism of action of nitrogen monoxide on iron uptake from transferrin*. (<http://www.uclm.es/inabis2000/symposia/files/139/session.htm>).
- 39) GUPTA, M., SINGAL, P. K.: *Higher antioxidative capacity during a chronic stable heart hypertrophy*. Circ Res., 1989, 64(2):398-406.
- 40) BAKER, H. M., BAKER, E. N.: *Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release*. BioMetals, 2004, 17:209-216.
- 41) ABDALLAH, F. B., EL HAGE CHAHINE, J. M.: *Transferrins: iron release from lactoferrin*. J Mol Biol, 2000 Oct 20, 303(2):255-266.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) RAGHUVeer, T. S., McGUIRE, E. M., MARTIN, S. M., WAGNER, B. A., REBOUCHE, C. J., BUETTNER, G. R., WIDNESS, J. A.: *Lactoferrin in the preterm infants' diet attenuates iron-induced oxidation products*. Pediatr Res, 2002 Dec, 52(6):964-72.

- 45) STEIJNS, J. M., van HOOIJDONK, A. C. M.: *Occurrence structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin*. Br J Nutr, 2000 Nov, 84 Suppl 1:S11-7.
- 46) 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):2004-2010.
- 47) SUZUKI, Y., LÖNNERDAL, B.: *Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor*. Biochem., 2001, 40:15771-9.
- 48) HE, H., FURMANSKI, P.: *Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA*. Nature 37, 1995, 3:721-4.
- 49) 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.
- 50) BROCK, J. H.: *The physiology of lactoferrin*. Biochem Cell Biol, 2002, 80(1):1-6.
- 51) FARNAUD, S., EVANS, R. W.: *Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties*. Mol Immunol, 2003 Nov, 40(7):395-405.
- 52) KRUZEL, M. L., ZIMECKI, M.: *Lactoferrin and immunologic dissonance: clinical implication*. Immun Therap Exper, 2002, 50, s. 399-410.
- 53) 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.

54) BLASIG, I. E., ZIPPER, J., MUSCHISK, P., MODERSOHN, D., LÖWE, H.: *Absolute and relative myocardial ischemia by isoproterenol overdose*. *Biochem Acta*, 1985, 44:1641-9.

55) VACEK, Z.: *Histologie a histologická technika*. Avicenum, Praha, 1988, s. 286-359, 448.

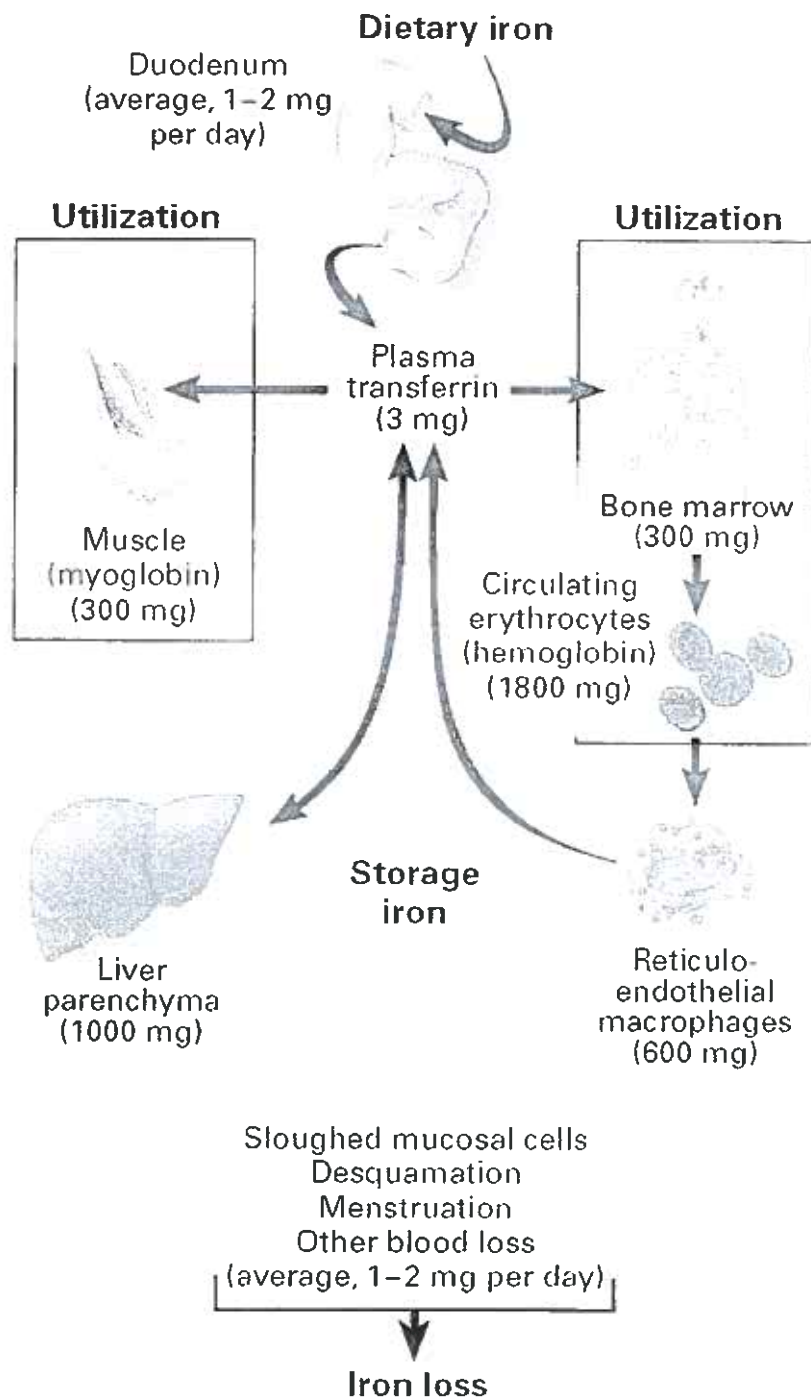
Přílohy

Příloha č. 1: Distribuce železa u dospělého člověka

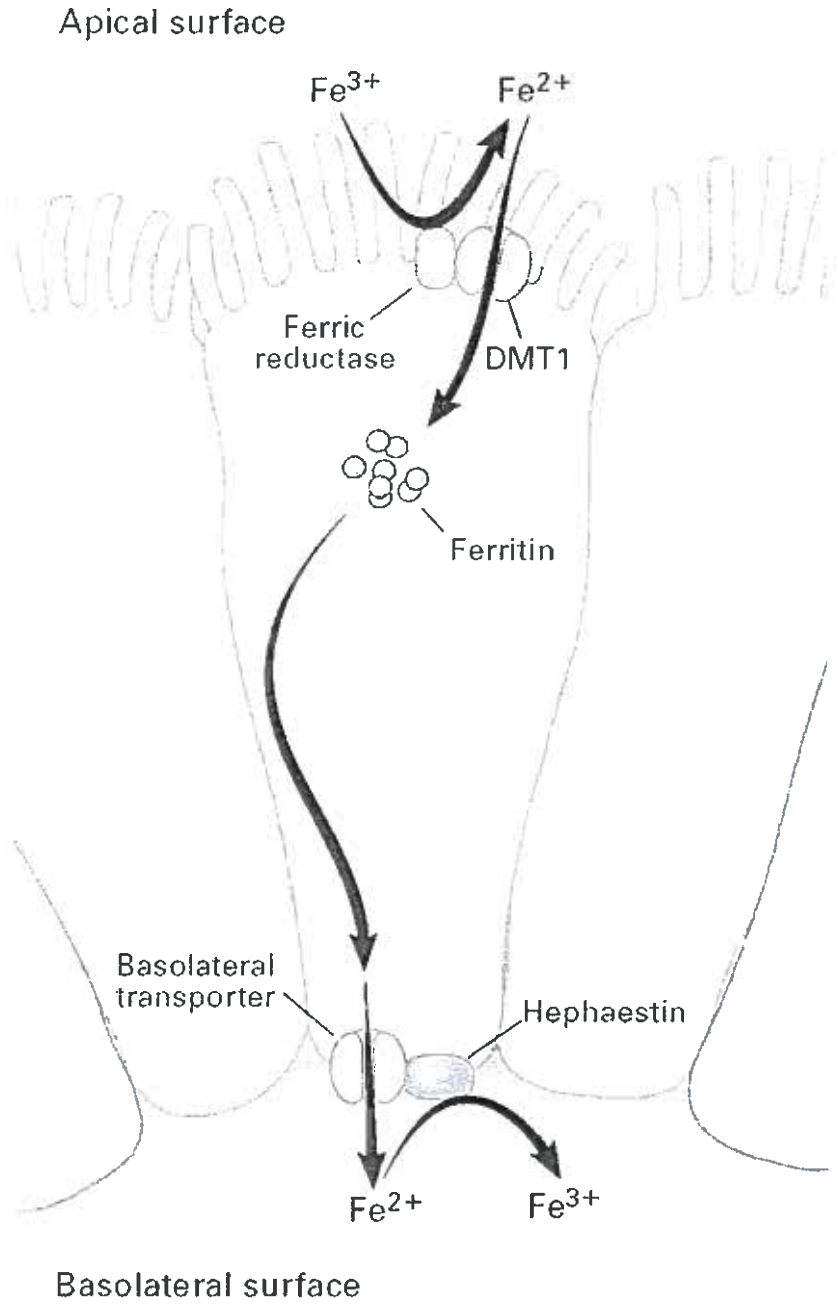
Příloha č. 2: Transport železa přes intestinální epitel

Příloha č. 3: Cyklus transferinu

Příloha č. 1: Distribuce železa u dospělého člověka (Andrews, N. C., 1999)



Příloha č. 2: Transport železa přes intestinální epitel (Andrews, N. C., 1999)



Příloha č. 3: Cyklus transferinu (Andrews, N. C., 1999)

