

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Experimentální poškození myokardu ovlivněné podáním D-penicilaminu

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Bc. EDITA BLAŽKOVÁ

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

datum

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména vedoucímu mé diplomové práce, panu doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za odborné vedení při psaní diplomové práce, ochotu i trpělivost a v neposlední řadě za věnovaný čas. Dále bych ráda poděkovala celé výzkumné skupině z Katedry farmakologie a toxikologie, pracující pod vedením doc. PharmDr. Přemysla Mladěny, Ph.D., za informace a data, jež posloužila k doplnění experimentální části této diplomové práce.

1 Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Bc. Edita Blažková

Školitel: doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Název diplomové práce: Experimentální poškození myokardu ovlivněné podáním D-penicilaminu

D-penicilamin je látka s širokým rozsahem využití při léčbě nejrůznějších onemocnění, zejména však Wilsonovy choroby. Tento standardní chelátor je znám pro svou schopnost nescificky vázat měď.

Jedním z cílů této práce byl podrobný popis histopatologických změn myokardu, vystavenému účinku katecholaminu isoprenalinu a jejich srovnání s obrazem myokardu kontrolní skupiny. Hlavním předmětem zájmu bylo však ověření potenciálně kardioprotektivního účinku D-penicilaminu na katecholaminovém modelu poškození. Popis histologických změn doplňuje rozsáhlé výsledky in vitro a in vivo analýzy.

Experiment byl proveden na dospělých potkanech kmene Wistar Han, kteří byli rozděleni do šesti skupin. První skupina sloužila jako kontrolní a obdržela pouze fyziologický roztok, druhé a třetí skupině byl podán jenom samotný D-PA, a to v dávkách 11 a 44 mg.kg⁻¹. Čtvrtá skupina obdržela pouze ISO v jednorázové dávce 100 mg.kg⁻¹. Pátá a šestá skupina byla nejprve premedikována každá odlišnou dávkou D-PA (i.v., 11 a 44 mg.kg⁻¹), poté byl každé z nich subkutánně aplikován ISO. Přítomné změny byly pozorovány a semikvantitativně zhodnoceny za 24 hodin.

U kontrolních skupin i u potkanů, kteří obdrželi pouze D-PA, nebyly až na hyperémii kapilár patrné žádné odchylky od fyziologické struktury srdce. Aplikace ISO vedla ke středně významným změnám v morfologii srdce potkanů, týkajících se kapilární hyperémie, dilatace a edému intersticiálních prostorů, zduření pojivových vláken, nekrotických změn kardiomyocytů, fragmentace myofibril a svalových trámců a přítomnosti makrofágů či žírných buněk. Premedikace oběma dávkami D-PA před podáním ISO vedla ke stejnému výsledku, kterým byl podstatný úbytek morfologických změn, a to na úroveň jejich přítomnosti mírně až málo významnou.

Kardioprotektivní potenciál D-penicilaminu byl pomocí histologické analýzy potvrzen, nicméně je třeba ještě dalšího zkoumání.

2 Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Bc. Edita Blažková

Supervisor: doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Title of thesis: Experimental myocardial damage affected the administration of D-penicillamine

D-penicillamine is a substance with a wide range of use for the treatment of various diseases, especially Wilson's disease. This standard chelator is known for its ability to bind copper nonspecifically.

The first aim of the thesis was to describe in detail histopathological changes of the myocardium exposed to the effect of catecholamine, namely isoprenaline and to compare these changes with the structure of control group myocardium. The main aim was to verify potentially cardioprotective effect of D-penicillamine on the model of catecholamine induced damage. The description of histological changes complements the extensive results of *in vitro* and *in vivo* analysis.

The experiment was performed on adult male Wistar Han rats, which were divided into six groups. The first group was used as a control and only received saline, the second one and third one received D-PA alone at doses of 11 and 44 mg.kg⁻¹. The fourth group received only ISO in a single dose of 100 mg.kg⁻¹. The fifth and sixth groups were premedicated each with a different dose of D-PA (*i.v.*, 11 and 44 mg.kg⁻¹) before ISO was subcutaneously administered to them. Present changes were observed and evaluated semiquantitatively within 24 hours.

In the control groups and rats which received only D-PA alone, no deviations from the physiological structure of the heart were seen, except capillary hyperaemia. ISO application led to moderately significant changes in the morphology of the rat heart, related to capillary hyperaemia, dilatation and edema of interstitial spaces, swelling of connective fibers, necrotic changes of cardiomyocytes, fragmentation of myofibrils and muscle trabecules and presence of macrophages or mast cells. Premedication with both doses of D-PA prior to administration of ISO led to the same result – loss of the morphological changes to slightly or not very significant level of their presence.

The cardioprotective potential of D-penicillamine has been confirmed by histological analysis, but further investigation is still needed.

Obsah

1	Abstrakt	4
2	Abstract	5
3	Zadání a cíl diplomové práce	8
4	Úvod	9
A	TEORETICKÁ ČÁST	11
5	Histologie zdravého srdce	11
6	Ischemicko-reperfuční poškození	13
6.1	Ischemie	13
6.2	Nadbytek Ca ²⁺	14
6.3	Oxidační stres.....	15
6.4	Zánět.....	16
6.5	Nekróza	20
6.6	Histopatologický obraz	21
7	Akutní infarkt myokardu	23
7.1	Klinická klasifikace.....	25
7.2	Klinický obraz.....	26
7.3	Laboratorní diagnostika	27
7.3.1	<i>Srdeční troponiny</i>	27
7.3.2	<i>CK-MB</i>	28
7.3.3	<i>Myoglobin</i>	28
7.3.4	<i>Natriuretické peptidy</i>	29
7.3.5	<i>D-dimery</i>	29
7.3.6	<i>Ostatní biomarkery</i>	29
7.4	Léčba	30
8	Isoprenalin	31
9	D-penicilamin	34

B	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
10	Provedení experimentu	36
10.1	Zvířata a použitý materiál	36
10.2	Uspořádání experimentu	38
10.2.1	<i>In vitro experiment</i>	38
10.2.2	<i>In vivo experiment</i>	39
10.2.3	<i>Analýza dat</i>	39
10.3	Použité metody	40
11	Metodika práce	43
11.1	Zpracování vzorku pro histologickou analýzu	43
11.2	Barvení Hematoxylin-eosin	45
11.3	Barvení zelený trichrom dle Goldnera	47
11.4	Mikroskopické hodnocení a fotodokumentace	48
12	Výsledky	49
12.1	Histologická analýza	49
12.2	Farmakologická analýza	58
12.2.1	<i>In vitro experiment</i>	58
12.2.2	<i>In vivo experiment</i>	59
13	Diskuze	61
14	Závěr	65
15	Seznam použitých zkratk	67
16	Seznam tabulek	70
17	Seznam grafů	70
18	Seznam obrázků	71
19	Seznam použité literatury	72

3 Zadání a cíl diplomové práce

Výzkumná skupina z Katedry farmakologie a toxikologie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové ve spolupráci s Katedrou biologických a lékařských věd již dlouhou dobu vyhodnocuje míru protektivity vybraných přírodních a semisyntetických látek, a to na katecholaminovém modelu akutního infarktu myokardu laboratorního potkana.

Cílem diplomové práce byl podrobný popis histopatologických změn myokardu potkana Wistar Han po aplikaci isoprenalinu (s.c.) v dávce 100 mg.kg^{-1} a jejich srovnání s obrazem myokardu kontrolní skupiny, která obdržela pouze fyziologický roztok. Nález byl následně porovnán s obrazem myokardu u samců potkana premedikovaných D-penicilaminem (i.v.), a to v koncentracích 11 mg.kg^{-1} a 44 mg.kg^{-1} . Podrobný popis histologických změn, pozorovaných v potkaním srdci během 24 hodin, tak doplňuje nálezy funkční a biochemické i výsledky in vitro testů.

4 Úvod

„ICHS postihuje lidstvo nejméně 3 000 let, jak bylo dokumentováno na mumiích starého Egypta“ [1].

Pojem ischemická choroba srdeční (zkr. ICHS) představuje skupinu onemocnění kardiovaskulárního systému, vznikajících na základě ischemie části srdeční svaloviny. Jedná se o závažnou zdravotní komplikaci, která značně zhoršuje kvalitu života u žijících nemocných a v nejhorším případě může vyústit v úmrtí. Je jednou z nejčastějších příčin úmrtí kardiovaskulárního původu a frekvence jejího výskytu narůstá úměrně věku nemocných.

ICHS může nabývat stabilní a nestabilní formy, z nichž každá se sestává z několika klinických jednotek. Stabilní formy způsobují nemocným obtíže zejména při fyzické námaze nebo psychické zátěži a patří mezi ně následující klinické jednotky: námahová angina pectoris, nebolestivá ischemie, variantní angina pectoris, syndrom X, ICHS s arytmiemi a také ICHS se srdeční insuficiencí. Nestabilní forma, známá také jako akutní koronární syndrom (zkr. AKS), nabývá akutního rázu a zahrnuje podjednotky, jako jsou nestabilní angina pectoris, náhlá srdeční smrt a především akutní infarkt myokardu, jenž je hlavním předmětem zájmu této práce [2,3].

Akutní infarkt myokardu vzniká v případě, kdy jakákoliv část srdečního svalu není po určitou dobu zásobena krví. K tomuto dochází povětšinou v důsledku trombózy koronární tepny, její embolizace, ale i z důvodu subintimálního krvácení nebo značného snížení krevního tlaku při šoku či velkých krevních ztrátách. Pro diagnostiku infarktu je nezbytný průkaz nekrózy myokardu, která je následkem probíhající ischemie a současně přítomnost klinických příznaků ischemii doprovázejících [4,5].

Některé akutní formy ischemické choroby srdeční byly popsány již koncem 19. století a v roce 1910 popsali V. P. Obrascov a N. D. Stražesko poprvé také klinické projevy akutního infarktu myokardu. Ačkoliv díky vývoji léčebných metod a sekundární prevence postupem času klesala kardiovaskulární mortalita, a to především na akutní formy ischemické choroby srdeční, úmrtnost na kardiovaskulární onemocnění stále tvoří 50-55 % z úmrtnosti celkové a z toho zhruba polovinu tvoří úmrtí z ICHS. Ročně na ICHS v České republice umírají 2-3 pacienti/1000 obyvatel a každoročně přibývá zhruba 5-10 případů/1000 obyvatel. Mimo to se zvyšuje věk nemocných, kteří umírají, a to ne na první, nýbrž opakovaný infarkt myokardu, který se v závěru může jevit vlastně jako jakési chronické onemocnění [1].

Z těchto důvodů je velmi opodstatněné úsilí o nalezení látek, a to jak přírodních, tak semisyntetických, klinicky použitelných v praxi, které by měly přínos pro prevenci vzniku akutního infarktu myokardu či alespoň zmírnění jeho průběhu nebo následků.

A TEORETICKÁ ČÁST

5 Histologie zdravého srdce

Srdce je dutý orgán, který je schopen rytmicky se smršťovat a vhnět tak krev do cév. Nachází se v předním mediastinu a je uloženo v perikardiálním vaku, který obsahuje čirou žlutavou tekutinu zabraňující tření. Osrdečník je tvořen dvěma listy, a to parietálním perikardem a viscerálním epikardem, které v sebe navzájem přecházejí. U srdce obvykle popisujeme jeho hrot neboli apex, bázi, přední, zadní (resp. spodní/brániční) a boční plochu. Vnitřní dutina srdce je členěna na pravou a levou síň a komoru, které jsou od sebe odděleny chlopněmi.

Stěna srdce je tvořena třemi vrstvami: endokardem, myokardem a epikardem. Nejvnitřnější vrstvu srdce představuje endokard, který pokrývá dutinu srdce, chordae tendineae i srdeční chlopně. Směrem zevnitř je tvořen endotelem, naléhajícím na vrstvičku řidšího subendotelového vaziva. Následuje vrstva tvořená kolagenem a elastickými vlákny, společně s příměsí hladkých svalových buněk. Na tu naléhá další vrstva řídkého subendokardového vaziva s četnými veny, nervy a větvemi distálního oddílu převodního systému srdce.

Střední a zároveň nejsilnější vrstva zvaná myokard je tvořena kardiomyocyty dvojího druhu. A to pracovními, které jsou kontraktilní a zabezpečují základní funkce svalové tkáně, čili svalový stah a tvorbu mechanického napětí, nebo kardiomyocyty vzrušivými, které jsou nekontraktilní a jsou součástí převodního systému srdce. V optickém mikroskopu se kardiomyocyty jeví jako válcovité buňky s centrálně uloženým jádrem, které je oválné a má 1-2 jádérka. Válcovité buňky s šířkou kolem 10-15 μm a délkou okolo 85-100 μm jsou často doplněny kardiomyocyty s výběžky, díky kterým nejspíš dochází ke svalovému stahu ve vlnách. Na povrchu buňky je patrná buněčná membrána neboli sarkolema, obalená laminou basalis. Prostor mezi jádrem a povrchem buňky je vyplněn 1-2 μm tlustými žíhanými vláčky, nazývanými myofibrily. Ty se skládají z kontraktilních proteinů, konkrétně aktinových a myozinových filament. Mezi myofibrilami jsou přítomny četné oválné mitochondrie a tzv. diády, což jsou útvary složené z jednoho T-tubulu a jedné sarkoplazmatické cisterny. V sarkoplazmě je poblíž jádra také pozorovatelný Golgiho aparát, zásoby lipofuscinu, glykogenu nebo kapénky lipidů. Mezi jednotlivými kardiomyocyty se nachází vazivové intersticiium, hojně na krevní vlasečnice, lymfatické cévy a nervy. Kardiomyocyty se řadí za sebou v paralelní

vlákna a svými konci se dotýkají. V místech takovýchto kontaktů vznikají spoje, nazývané interkalární disky. Ty se po obarvení v mikroskopu jeví jako tmavé linie na srdečních vláknech. Bývají zpravidla tvořeny dvojicí membrán a spoji typu desmozomů, fascia adherens a nexusů. Myocyty převodního systému srdce jsou vysoce specializované a zajišťují vznik a šíření vzruchu, podněcujícího kontrakci srdce. Oproti kardiomyocytům mají menší množství myofibril a mohutné zásoby glykogenu.

Vnější vrstvu srdce tvoří viscerální epikard a parietální perikard. Mezi nimi je perikardová dutina, obsahující nažloutlou tekutinu snižující tření mezi těmito listy při kontrakci srdce. Epikard je na ploše obrácené do dutiny kryt jednovrstevným plochým epitelem, nasedajícím na tenkou vrstvu kolagenního vaziva. Naopak směrem od myokardu se nachází subepikardové vazivo, obsahující tukovou tkáň, tepny, žíly, lymfatické cévy a nervy. Stejnou strukturu jako epikard má i perikard [6,7,8].

6 Ischemicko-reperfuzní poškození

Srdce pro své fungování potřebuje stálou dodávku kyslíku. Existují však stavy, jež jsou spojeny s přerušением dodávky kyslíku do srdce. V jejich důsledku dochází v srdci k ději, nazývanému ischemie, jež má pro srdce velmi negativní následky. Pro záchranu srdce je vždy nezbytně nutná reperfuze neboli obnovení dodávky kyslíku. Ta s sebou však v některých případech, obzvláště při déletrvajícím ischemii či v samotném centru poškození, nese riziko ischemicko-reperfuzního poškození. Jedná se o jev paradoxní, který je zapříčiněn souhrou mnoha patologických okolností a jehož výsledkem je poškození myokardu [9].

6.1 Ischemie

Ischemie myokardu je děj, který nastává při nepoměru dodávky kyslíku a jeho skutečnou spotřebou v srdečním svalu. Existuje několik příčin, jež ischemii způsobují. Důvodem může být značně zvýšená činnost srdce nebo snížené množství kyslíku v krvi u těžké anémie či po otravě oxidem uhelnatým. U 90 % případů však za ischemií stojí snížený přítok krve věnčitými tepnami, postiženými aterosklerózou, trombózou, spazmem či shluky trombocytů. Přítěžujícím faktorem může být kouření cigaret, v jehož důsledku dochází k vzestupu periferní koronární rezistence nebo stres a při něm uvolňované katecholaminy, zvyšující spotřebu kyslíku v myokardu [2,10].

Pro svoji funkci myokard získává energii ve formě ATP z volných mastných kyselin, glukózy a laktátu, fyziologicky za přístupu kyslíku (aerobně). Pokud však dojde k přerušení dodávky krve a tudíž i kyslíku do srdce, vzniká ATP již jen anaerobně. Anaerobní glykolýza vede ke vzniku kyseliny mléčné, která disociuje na ionty H^+ a laktát. Množství vytvořeného ATP je však nedostatečné a jeho nedostatek společně s hromaděním iontů H^+ vede k poruchám myokardiální kontrakce. Kvůli deficitu ATP může následně dojít k poškození systolické čerpací funkce komor, zvýšení tuhosti myokardu během diastoly a současně zvýšení diastolického tlaku v komorách. To vede ke stáze krve v plicním oběhu. Jestliže jsou ischemií postiženy i papilární svaly, může dojít až k jejich ruptuře, vedoucí ke vzniku akutní mitrální insuficience. V neposledním případě může dojít ke vzniku arytmií, podmíněné poruchou elektrické dráždivosti myokardu vlivem ischemie. Jsou stimulovány nociceptory, což vede k anginózním bolestem a aktivaci sympatiku neboli tachykardii, silnému pocení a nevolnosti. Pokud ischemie odezní do 20 minut, jsou vzniklé biochemické a funkční změny reverzibilní.

Jestliže však ischemie trvá déle, zastaví se nakonec díky tkáňové acidóze i samotná anaerobní glykolýza a dojde k nevratnému poškození buněk s uvolněním intracelulárních enzymů a srdečního troponinu do krve [3,9].

6.2 Nadbytek Ca^{2+}

Jedním z procesů, hrajícím významnou roli v patofyziologii ischemicko-reperfučního poškození je přetížení vápníkem. Za ischemických podmínek, kdy je dodávka kyslíku do tkáně pozastavena, dochází k produkci energie ve formě ATP pomocí anaerobní glykolýzy. Ta vede ke vzniku a akumulaci laktátu, protonů a NAD^+ a současně ke snížení buněčného pH. Mechanismus normalizace buněčného pH spočívá ve vyloučení iontů H^+ , výměnou za Na^+ skrze Na^+/H^+ transportér. Ionty Na^+ jsou vzápětí z buňky odstraňovány výměnou za Ca^{2+} , a to transportérem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Tímto způsobem dochází k výraznému vzestupu iontů Ca^{2+} v cytosolu buňky. Jelikož po reperfuzi téměř okamžitě nastává proces obnovy fyziologického pH, dochází logicky také k výraznému přetížení kardiomyocytu již zmíněnými vápenatými ionty. Současně je také narušen transport Ca^{2+} přes sarkoplazmatické retikulum. Zatímco je vychytávání vápníku prostřednictvím Ca^{2+} ATPázy sarkoplazmatického retikula téměř znemožněno, jeho uvolňování skrze příslušný receptor do buňky je spíše urychleno. Vysoká koncentrace vápenatých iontů je schopna aktivovat mnoho systémů, jež se podílí na vzniku I/R poškození. Velké množství Ca^{2+} vstupuje do mitochondrie, v níž je schopno navázat se na vazebné domény mitochondriálního póru přechodné propustnosti (zkr. MPTP), čímž dochází k jeho otevření a buněčné smrti. Otevřením tohoto kanálu totiž dochází ke kolapsu membránového potenciálu v mitochondrii a k odpojení oxidativní fosforylace, což vyústí v depleci ATP a smrt buňky. Otevření kanálu napomáhá také oxidační stres či právě obnova pH buňky, které je jinak během ischemie značně sníženo a udržuje kanál uzavřený. Nízké pH také znemožňuje kontrakci myofibril. Vyrovnáním pH buňky do normálu následně dochází ke vzniku hyperkontrakcí. Dalším cílem zvýšené hladiny vápníku v buňce je rodina cysteinových proteáz, zvaná kalpains, které jsou jeho pomocí aktivovány a degradují buněčné proteiny cytoskeletu, endoplazmatického retikula či samotné mitochondrie. Přetížení vápníkem může také nakonec vést k formování komplexů kalcia a pyrofosfátu či kyseliny močové. Ty mají schopnost vázat se na tzv. inflamazóm. Ten je schopný produkce molekul, stimulujících sekreci prozánětlivých cytokinů, chemokinů a IL 1- β [11,12,13].

6.3 Oxidační stres

Ihned během prvních minut po obnově zásobení myokardu okysličenou krví dochází k produkci nadměrného množství reaktivních forem kyslíku. Jedná se o volné radikály, což jsou molekuly či atomy, obsahující nepárové elektrony. Volné radikály vznikající z kyslíku bývají zkráceně nazývány ROS a jsou vysoce reaktivní. Primárním ROS, vznikajícím během I/R poškození, je superoxid ($O_2^{\cdot-}$). Ten je prekurzorem pro vznik dalších reaktivních forem kyslíku. Superoxidový radikál velmi rychle a spontánně podléhá dismutaci na méně toxický peroxid vodíku (H_2O_2), a to za účasti enzymu superoxidodismutázy (zkr. SOD), přítomného v cytosolu či mitochondrii. Peroxid vodíku je dále přeměněn za účasti enzymu glutathionperoxidázy (zkr. GPx), využívajícího jako substrát redukovaný glutathion (GSH), ve vodu. V podmínkách nízkého pH, které nastává i v případě ischemie myokardu, může být superoxid přeměněn také v radikál hydroperoxylový (HOO^{\cdot}). Peroxid vodíku se podílí na vzniku vysoce reaktivní formy, jakou je hydroxylový radikál (OH^{\cdot}), a to Fentonovou reakcí, nebo může sám o sobě reagovat např. s hemoglobinem a myoglobinem. Superoxidový radikál může také reagovat s oxidem dusnatým za vzniku peroxynitritu ($ONOO^-$), jenž může být nakonec protonován a vytvořit vysoce cytotoxickou kyselinu peroxodusitou ($ONOOH$) [13].

Vznik reaktivních forem kyslíku po reperfuzi může být podmíněn reaktivací elektronového transportního řetězce či např. akumulací nadbytku vápenatých iontů v buňce. Jinými zdroji mohou být také NADPH-oxidáza z neutrofilů, přilákaných do daného místa nebo xanthinoxidáza, pocházející z endoteliálních buněk. Ta využívá kyslík ke konverzi nadbytku hypoxanthinu, který se ve tkáni nahromadil během ischemie, v xanthin, a to za současné tvorby ROS.

Nadměrné množství takto vzniklých ROS není dostatečně vycitáváno antioxidantními systémy a vykazuje buněčnou cytotoxicitu. Reaktivní formy kyslíku jsou schopny poškodit buněčnou membránu peroxidací lipidů, mohou také indukovat denaturaci enzymů a v neposlední řadě mohou přímo modifikovat DNA. ROS také stimulují aktivaci, chemotaxi a adhezi leukocytů, a to prostřednictvím fosfolipázy A_2 , již potencují k přeměně v kyselinu arachidonovou, důležitý prekurzor pro syntézu eikosanoidů (tromboxan A_2 , leukotrien B_4), nebo skrze genovou expresi adhezivních molekul a cytokinů, a to aktivací transkripčních faktorů, jako je např. nukleární faktor κB [11,14].

6.4 Záněť

První fází reparativního procesu po ischemii srdce je záněť, zprostředkovaný převážně buňkami vrozené imunity. Nicméně úplně prvními buňkami, aktivovanými v důsledku poškození myokardu ischemií, jsou krevní destičky. Ty se shlukují, aby zabránily případnému krvácení, a uvolňují důležité růstové faktory, jako jsou např. PDGF neboli destičkový růstový faktor, destičkový faktor 4 či faktor aktivující destičky (zkr. PAF). Vlivem PAF dochází k prvotnímu přilákání a adhezí neutrofilních granulocytů. Neutrofilie jsou prvními leukocyty, objevujícími se v poškozeném myokardu, a to již během několika hodin od ischemické příhody. Do postižených míst mohou být přilákány také vlivem uvolňujících se ROS, aktivací komplementu a zejména prostřednictvím „nebezpečných signálů“ [15,16].

Poškozené a postupně odumírající kardiomyocyty, ale i poškozená extracelulární matrix, uvolňují za nepříznivých podmínek ischemie substance, jež se chovají jako „nebezpečné signály“. Odborně jsou tyto látky nazývány jako s nebezpečím asociované molekulární vzory (zkr. DAMP, z anglického danger-associated molecular patterns). Patří mezi ně zejména protein HMGB1 (zkratka anglického high mobility group box-1), proteiny skupiny S100, proteiny teplotního šoku (zkr. HSP, z anglického heat shock protein), fragmenty matrix, adenosin, extracelulární RNA, nízkomolekulární kyselina hyaluronová, kyselina močová, IL-1 α a jiné. Tyto molekuly, jinak zvané také jako alarminy, jsou schopny se vázat na příbuzné PRR receptory (zkratka anglického pattern recognition receptor), přítomné na přeživších buňkách či přilákaných leukocytech. Mezi PRR zde patří zejména receptory TLR (zkratka anglického Toll-like receptor), NLR (z anglického nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor) a receptor pro konečné produkty pokročilé glykace (zkr. RAGE, z anglického receptor for advanced glycation end-products). Obvykle jsou exprimovány na leukocytech, ale i kardiomyocytech, fibroblastech či buňkách endotelu. V důsledku takto zprostředkované signalizace dochází k aktivaci MAP kinázy neboli mitogenem aktivované proteinkinázy a také nukleárního faktoru κ B (zkr. NF- κ B). Touto cestou dochází následně k vysoké expresi panelu prozánětlivých genů, a to genů pro cytokiny, chemokiny a adhezní molekuly.

Mezi prozánětlivé cytokiny, k jejichž sekreci zde v hojném množství dochází, patří IL-1 β , tumory nekrotizující faktor (zkr. TNF), IL-6 a IL-18. Jsou uvolňovány leukocyty, fibroblasty, endoteliálními buňkami a kardiomyocyty, podporují samotnou

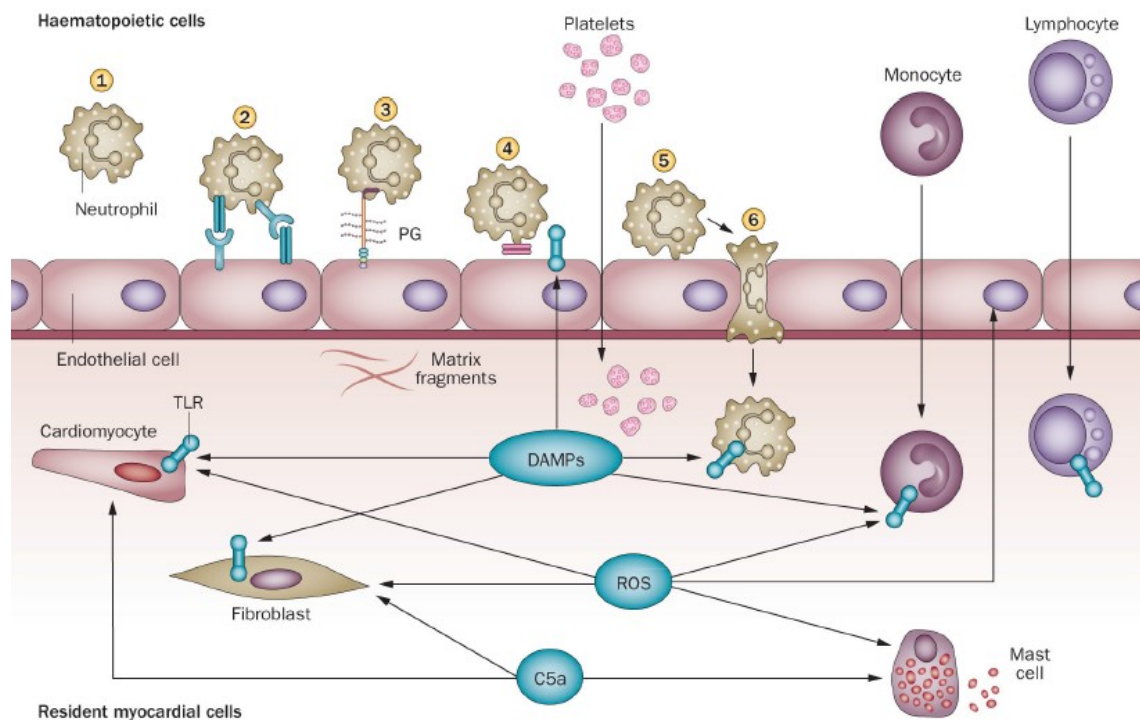
syntézu adhezních molekul a chemokinů a prohlubují zánětlivou reakci. Značně zvýšená exprese obou hlavních skupin chemokinů C-C a C-X-C je schopna přilákat do poškozeného myokardu další náplavu leukocytů. Chemokiny C-X-C obsahují tripeptidovou sekvenci Glu-Leu-Arg a zprostředkují přilákání neutrofilů, zatímco C-C chemokiny působí jako chemoatraktanty převážně monocytů a T-lymfocytů. Nejprve jsou do poškozených míst přilákány neutrofilové a poté monocytové. Adhezní molekuly jako jsou VCAM, ICAM a selektiny, jejichž exprese je také značně zvýšena, jsou s přilákanými leukocyty schopny interagovat.

Cirkulující leukocyty, nesoucí příslušné ligandy, jsou zachycovány selektinami aktivovaného endotelu a tzv. rolují podél jeho povrchu. Později jsou díky změnám v konformaci leukocytárních integrinů (LFA1 nebo Mac1), způsobených interakcí mezi CXC chemokiny a příslušnými receptory na jejich povrchu, již pevněji zachycovány endoteliálními adhezivními receptory ICAM. Takto dochází k vytvoření mnohem pevnějšího spojení a adhezivnosti. Samotná diapedéza, neboli průnik leukocytů do intersticiálního prostoru, je zprostředkována pomocí destičkové endotelové adhezní molekuly (PECAM-1), která je konstitutivně exprimována podél mezibuněčných spojů v endotelu.

Neutrofilové po jejich průniku do poškozených míst uvolňují proteolytické enzymy a odstraňují z ložiska odumřelé buňky a extracelulární debris, mohou však také napomáhat dalšímu uvolňování ROS. Následně přilákaná prozánětlivá subpopulace monocytů, která přetrvává v ložisku až po dobu 3 dnů, produkuje v místě proteázy degradující matrix, další zánětlivé cytokiny a podílí se na odklizení tzv. debris. Velmi časně po proběhlé ischemii infiltrují danou oblast také lymfocyty, a to především lymfocyty T. Za normálních okolností obsahuje zdravé srdce úložiště žírných buněk a makrofágů, které v průběhu zánětu podléhají výrazné proliferaci. Žírné buňky, strategicky umístěné v perivaskulárním prostoru, navíc obsahují preformované mediátory jako jsou TNF, histamin či tryptáza. Ať už stimulace cytokiny, adenosinem, reaktivními kyslíkovými formami či aktivace komplementu, způsobí degranulaci žírných buněk a uvolnění uvedených mediátorů do okolí. Zejména TNF a histamin poté hrají důležitou roli v probíhající zánětlivé reakci. Aktivované buňky endotelu kromě exprese adhezních molekul mohou také samy produkovat zánětlivé cytokiny a chemokiny. Myokard také za normálních podmínek obsahuje hojné množství klidových fibroblastů, hrajících roli zejména v udržování sítě extracelulární matrix. Stimulací pomocí DAMP, nabývají tyto fibroblasty schopnosti sekrece velkého

množství cytokinů a chemokinů. Množství těchto látek jsou pravděpodobně schopny produkovat také přeživší kardiomyocyty. Aktivaci zánětlivé kaskády má v neposlední řadě na svědomí také fragmentace extracelulární matrix a uvolnění fragmentů kolagenu, fibronektinu a hyaluronanu [14,15,16,17,18].

Proces zánětlivé odpovědi po ischemii myokardu, se všemi zúčastněnými buňkami a molekulami, je přehledně vyobrazen na obrázku 1.



Obrázek 1. Zánětlivá reakce po ischemii myokardu [17]

Na obrázku jsou patrný poškozené kardiomyocyty a fragmenty extracelulární matrix, uvolňující DAMP, které se vážou na TLR a tímto spouští zánětlivou reakci. Aktivace komplementu a uvolnění ROS také iniciuje zánět. Jak poškozené, tak přeživší kardiomyocyty, ale také buňky endotelu, fibroblasty, žírné buňky a přilákané krevní destičky, neutrofily a monocyty – všechny se účastní zánětlivé reakce. Cirkulující leukocyty (1) jsou zachyceny aktivovanými buňkami endotelu a rolují za pomoci selektinů (2). Rolující leukocyty jsou aktivovány chemokiny, vázanými na proteoglykanech endoteliálního povrchu (3), následně aktivované leukocyty adherují k buňkám endotelu pomocí integrinů (4). Zesílení vazby mezi leukocyty a endotelem (5) je následováno transmigrací leukocytů do ložiska infarktu (6) [17].

V další fázi reparace ischemií poškozeného myokardu, nazývané jako proliferační, spolupracují neutrofily, monocyty, buňky endotelu a pericyty na ukončení počáteční zánětlivé fáze. Prodloužení účinku zánětlivých komponent by mohlo mít pro myokard

velmi nepříznivé dopady. Pro úspěšné hojení je tedy nezbytně nutné zásadně potlačit probíhající zánětlivou reakci. Dynamické změny ve fenotypu monocytů a makrofágů, a to ve smyslu navození jejich protizánětlivého chování, jsou společně s inhibičními subpopulacemi lymfocytů jednou z hlavních komponent, napomáhajících k úspěšné redukci původně masivního zánětu. Takto pozměněné buňky se posléze postarají o odstranění neutrofilů, podléhajících apoptóze, a to prostřednictvím procesu zvaného eferocytóza. Současně původně zánětlivé neutrofilů a monocytů produkují mediátory (jako jsou např. annexin A1, laktoferin či jaderný receptor podrodiny 4, skupiny a, člen 1 (zkr. Nr4a1) a jiné), které zabraňují dalšímu náběhu takovýchto buněk. Eferocytóza je spojena také s uvolněním protizánětlivých cytokinů, jako jsou IL-10 či transformující růstový faktor β (zkr. TGF- β , z anglického transforming growth factor β), nebo také vaskulární endoteliální faktor (zkr. VEGF, z anglického vascular endothelial growth factor). Inhibice zánětlivé odpovědi je také navozena aktivací endogenních intracelulárních signálů, a to konkrétně aktivací kinázy spojené s IL-1R. Cílem této fáze reparace myokardu je odstranění zánětlivého infiltrátu a vytvoření kolagenní jizvy. Z toho důvodu jsou později nejmasivnější složkou tzv. myofibroblasty, jež jsou pouze fenotypově pozměněnými fibroblasty (zejména vlivem účinku TGF- β , renin-angiotensin-aldosteronového systému, PDGF a dalších), primárně lokalizovanými v okrajové zóně ložiska infarktu a schopnými exprimovat kontraktilní proteiny (např. α -hladkosvalový aktin, zkr. α -SMA). Aktivované myofibroblasty jsou schopny sekrece jak strukturálních proteinů, tak i matricelulárních. Specializací těchto buněk je syntéza kolagenu typu I a III, který je ve velké míře ukládán v místě poškození za účelem reparace. Kolagen může být degradován pomocí degradačních enzymů, tzv. matrixových metaloproteináz (zkr. MMP), přičemž klíčovou metaloproteinázou remodelace je intersticiální kolagenáza MMP-1. Její aktivita je regulována pomocí tkáňových inhibitorů metaloproteináz (zkr. TIMP). Syntéza MMP-1 i jejích inhibitorů je regulována pomocí lokálně produkovaných růstových faktorů, a to včetně TGF- β , který je schopen negativní regulace exprese MMP-1 a pozitivní regulace syntézy TIMP. Syntéza kolagenu je aktivována již velmi brzy po poškození myokardu, nicméně kolagen je v této časně fázi degradován pomocí MMP-1, která je posléze ve fázi fibrogenese utlumena vlivem TIMP.

Výrazně proliferační aktivita myofibroblastů je v další fázi (zvané maturační) inhibována a dochází k vyhrábní vytvořené jizvy. Uvnitř kolagenní matrix dochází

k příčnému spojování a reparativní myofibroblasty upadají do klidového stavu nebo podléhají apoptóze [15,18,19].

6.5 Nekróza

K ireverzibilním změnám v myokardu dochází tehdy, trvá-li ischemie po delší dobu. Zvyšuje se množství cirkulujících katecholaminů jakožto stresových hormonů, dochází k hromadění vápníku v buňkách a v důsledku útlumu dýchacího řetězce vznikají reaktivní formy kyslíku, které poškozují mastné kyseliny membránových fosfolipidů. Dochází k rozpadu buněčných organel a v důsledku toho se uvolňují i lysozomální kyselá hydrolázy, vedoucí k buněčné smrti neboli nekróze. Nekróza buněk se projevuje jejich morfologickými změnami, a to především změnami jádra, cytoplazmy či jiných organel. Svou roli zde hraje také apoptóza neboli programovaná buněčná smrt, ke které dochází cestou aktivace kaspáz. Při apoptóze dochází k pyknóze jádra, srašťování buňky a fragmentaci v apoptotická tělíska, odstraňovaná makrofágy. Čím je trvání ischemie delší, tím více buněk v centru ložiska postupně odumírá [9,10].

V závislosti na délce trvání ischemie, jejím rozšíření a také na místě uzávěru koronární tepny rozlišujeme infarkt transmurální – zasahuje v průřezu celou srdeční stěnu, subendokardiální – postižena je subendokardiální oblast, a dále také intramurální – postižení vnitřní části srdeční stěny. Infarkt, který není transmuralního typu, nabývá obvykle podoby jediného souvislého ložiska či mnohačetných drobných nekrot.

Dle lokalizace tepenného uzávěru můžeme transmuralní infarkty dále rozlišit na: a) přední – ischemie v oblasti přední stěny levé komory (a někdy také mezikomorových přepážek) či apikální – poškození srdečního hrotu, jež jsou způsobeny uzávěrem sestupné větve levé koronární tepny; b) zadní – poškození zadní stěny levé komory (či mezikomorových přepážek), způsobené uzávěrem pravé koronární tepny; a v neposlední řadě c) boční – postižení boční stěny levé komory, ke kterému dojde při uzávěru obkružující větve levé koronární tepny. Samotný infarkt myokardu pravé komory je vzácný, občas bývá přítomen současně s postižením komory levé. Stejně tak neobvyklý je infarkt síní [10,6].

Postižen však může být také myokard převodního systému, a to v důsledku uzávěru pravého Tawarova raménka a přední větve levého raménka nebo AV uzlu a zadní větve levého raménka.

Dle objemu zasaženého myokardu můžeme infarkt rozdělit také na velký (> 30 % levé komory), střední (10-30 %) a malý (< 10 % levé komory) [6].

6.6 Histopatologický obraz

Následkem těžké akutní ischemie trvající déle než 20 minut dochází v myokardu ke změnám, ve svém závěru odpovídajícím nekróze neboli infarktu myokardu. Avšak i tyto změny se zde vyvíjejí postupně.

Prvotní mikroskopicky pozorovatelnou změnou akutní fáze infarktu myokardu jsou tzv. vlnky, vzniklé protažením, zvlněním a ztenčením již odumřelých svalových vláken. Ty jsou takto modifikovány tahem okolní živé svaloviny. Dochází k edému intersticia a po 8-16 hodinách se objevuje nekróza kardiomyocytů. Jádro bledne, tmavne nebo se srašťuje, až nakonec mizí. Cytoplazma je více eosinofilní a ztrácí se i příčné pruhození. Zhruba po 24 hodinách jsou na okrajích ložiska patrné neutrofilní leukocyty, přilákané do místa látkami, uvolňujícími se z odumřelých buněk. Fragmentovaná vlákna jsou posléze nahrazována granulační tkání, a to za přítomnosti vlásečnic s endoteliemi, fibroblastů, žírných buněk a velkého množství makrofágů. Takto je obvykle nahrazována nejprve okrajová část ložiska, postupně směrem k jeho středu. Makroskopicky se ložisko nekrózy jeví zprvu bledé, poté tmavočervené nebo namodralé a postupně se začíná ohraničovat od svého okolí. V okolí může být patrné překrvení. Typického obrazu koagulační nekrózy, která je pro infarkt myokardu nanejvýš specifická, nabývá ložisko po 3-7 dnech. Je jílovité barvy, měkké a zakalené.

Za více než týden je nahrazena většina nekrotického ložiska a po 6 týdnech je granulační tkáň zcela přeměněna v kolagenní/hyalinní vazivo. Makroskopická podoba ložiska v pozdní fázi infarktu myokardu nabývá nejprve šedavé barvy a v konečné fázi se mění ve vyzrálou jizvu [10,6,9].

Podrobnější časový sled patologií, odehrávajících se během infarktu myokardu, vycházející z textů autorů Kumara et al. a Bishopa et al., je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Časový sled patologií při AIM [20,21]

Čas	Makroskopický vzhled	Histologický nález
0 – 0,5 h	žádné změny	žádné změny
0,5 – 4 h	žádné změny	deplece glykogenu zvlněná vlákna na okrajích
4 – 12 h	ojedinělé tmavé skvrny	počátek tvorby koagulační nekrózy edém + hemorrhagie
12 – 24 h	tmavé skvrny	tvorba koagulační nekrózy pokračuje karyopyknóza jader hypereosinofilie kardiomyocytů nekróza kontrakčních pruhů na okrajích počátek infiltrace neutrofilů
1 – 3 dny	počínající nažloutlé zbarvení center infarktu	koagulační nekróza pokračuje ztráta jader a pruhování ↑ infiltrace neutrofilů do intersticia
3 – 7 dní	hyperémie na okrajích jemná nažloutlá centra	počínající rozpad svalových vláken apoptóza neutrofilů počátek odstraňování odumřelých buněk na okrajích makrofágy
7 – 10 dní	maximální jemné a nažloutlé zbarvení červené zbarvení okrajů	↑ fagocytóza mrtvých buněk na okrajích počínající tvorba granulační tkáně na okrajích
10 – 14 dní	červeno-šedé zvýraznění okrajů	zralá granulační tkáň s kolagenem typu I
2 – 8 týdnů	šedo-bílá granulační tkáň	↑ depozice kolagenu a ↓ buněčnost
> 2 měsíce	kompletní zjizvení	vytvořena denzní kolagenní jizva

7 Akutní infarkt myokardu

Akutní infarkt myokardu (zkr. AIM) je život ohrožující onemocnění, které je zapříčiněno akutní ložiskovou nekrózou ischemického typu. Může nabývat jakékoliv velikosti a obvykle vzniká z důvodu zúžení nebo úplného uzávěru příslušné věnčité tepny, zásobující danou oblast srdečního svalu. Toto onemocnění se společně s dalšími řadí mezi akutní koronární syndromy a dělíme jej na akutní Q-infarkt myokardu a akutní non-Q-infarkt myokardu, dle nálezu patologických Q-kmitů na EKG. Q-infarkt vzniká na podkladě úplného uzávěru koronární tepny, non-Q-infarkt myokardu bývá způsoben pouze velmi krátce trvajícím či neúplným uzávěrem věnčité tepny. Na rozdíl od Q-infarktu tedy není koronární průtok zcela zastaven, ale je pouze omezen. Dělení na Q-infarkt a non-Q-infarkt je však v poslední době méně užíváno, jelikož má neurčitý anatomický a klinický význam. V současné době je více používáno dělení dle vývoje EKG na AIM bez elevací úseků S-T neboli NSTEMI (je podobný non-Q-infarktu) a na AIM s S-T elevací, zkr. STEMI (souvislost s Q-infarktem) [2,9].

V roce 2000 byla První globální pracovní skupinou pro IM (First Global MI Task Force) vytvořena definice, která za infarkt myokardu považovala jakoukoliv nekrózu, doprovázející ischemii srdečního svalu. Revizi této definice zohledňující fakt, že k infarktu myokardu mohou vést také různé jiné stavy, vydala Druhá globální pracovní skupina pro IM (Second Global MI Task Force) v roce 2007. Jelikož bylo s vývojem nových citlivých metod detekce markerů nekrózy myokardu možné rozpoznat i velmi malá poškození myokardu či malé nekrózy, bylo nutné univerzální definici IM dále revidovat a prozatím poslední revize byla předložena Třetí globální pracovní skupinou pro IM (Third Global MI Task Force) v roce 2012. Aktuální definice IM předkládá kritéria jak pro akutní infarkt myokardu, tak pro infarkt myokardu již překonaný. Dle poslední definice by měl být pojem akutní infarkt myokardu používán vždy, když jsme schopni prokázat přítomnost nekrózy myokardu, v klinické situaci odpovídající akutní myokardiální ischemii [22].

Kritéria pro akutní infarkt myokardu jsou stručně uvedena v tabulce 2, zatímco kritéria pro již překonaný infarkt myokardu jsou shrnuta v tabulce 3.

Tabulka 2. Kritéria pro definici akutního infarktu myokardu [22]

Kritéria
Akutní infarkt myokardu – musí být splněno nejméně jedno z uvedených:
a) změna hladiny srdečních biomarkerů (nejlépe cTn), z nichž alespoň jedna přesahuje 99. percentil pro normální referenční populaci a současně jsou: <ul style="list-style-type: none">- přítomny symptomy ischemie myokardu- nové významné změny úseku ST-vlny či blokáda levého Tawarova raménka (zkr. BLRT)- patologické Q-kmity na EKG- zobrazeny ztráty funkčního myokardu nebo nové regionální poruchy hybnosti srdeční stěny- nebo je identifikován intrakoronární trombus při angiografii, popř. pitvě
b) srdeční smrt současně se symptomy myokardiální ischemie a novými změnami na EKG či s novou BLRT, pokud srdeční smrt nastala před detekcí nebo před samotným zvýšením hodnot srdečních biomarkerů
c) IM s perkutánní koronární intervencí definován zvýšením hodnot cTn na > pětinašobek 99. percentilu URL u pacientů s původně normálními hodnotami, anebo vzestupem hladin cTn o > 20 %, pokud byly původní hodnoty zvýšeny a jsou nyní stabilní/klesající + alespoň některé z následujících: <ul style="list-style-type: none">- symptomy myokardiální ischemie- nové ischemické změny patrné na EKG- angiografický nález související s komplikací zákroku- potvrzení ztráty viabilního myokardu nebo hybnosti srdeční stěny
d) přítomnost trombózy stentu spojené s IM, potvrzené angiografií nebo pitvou, za podmínek ischemie, se změnou hladiny alespoň jednoho srdečního biomarkeru nad 99. percentil normální referenční populace
e) IM s provedením aortokoronárního bypassu potvrzen zvýšením hladin srdečních biomarkerů na > desetinásobek 99. percentilu pro normální referenční populaci u pacientů s původně normálními hladinami + alespoň některé z následujících: <ul style="list-style-type: none">- nové patologické Q-kmity na EKG nebo BLRT- okluze štěpu či nativní koronární tepny potvrzená angiografií- potvrzení ztráty viabilního myokardu nebo hybnosti srdeční stěny

Tabulka 3. Kritéria pro definici překonaného infarktu myokardu [22]

Kritéria
Překonaný infarkt myokardu – musí být splněno alespoň jedno z níže uvedených:
a) nové patologické Q-kmity včetně symptomů nebo symptomy chybí, při současném vyloučení neischemických změn
b) zobrazení ztráty viabilního myokardu v oblasti, která je značně ztenčená a neschopna kontrakce, při současném vyloučení neischemických změn
c) patologickoanatomický průkaz již překonaného infarktu myokardu

7.1 Klinická klasifikace

Především z důvodu nutnosti vhodně zvolené léčby, bývá v praxi infarkt myokardu členěn na několik typů. Jedním z typů IM je ten, u kterého dochází k elevaci úseku ST ve dvou sousedních svodech z jedné oblasti na EKG. Jedná se tedy o IM s elevací úseku ST neboli ST elevation IM, zkr. STEMI. O tzv. non-ST elevation (NSTEMI) mluvíme, pokud pacient tuto elevaci při EKG nevykazuje. U některých pacientů vznikají v průběhu infarktu nové Q-kmity, (typ Q-IM), u některých k tomuto však nedochází (typ non-Q-IM). Infarkt myokardu můžeme dále členit do pěti typů, majících různé patologické, klinické i prognostické odlišnosti a u kterých je především volen rozdílný postup léčby.

Spontánní infarkt myokardu (IM typ 1) – dochází k němu zpravidla následkem ruptury či jiné komplikace aterosklerotického plátu a posléze vznikem trombu v některé z koronárních tepen, dodávajících do myokardu kyslík. Průtok krve je snížen a kardiomyocyty podléhají nevratným změnám.

IM podmíněný ischemickou nerovnováhou (IM typ 2) – k nerovnováze mezi dodávkou a spotřebou kyslíku do myokardu zde dochází z jiných příčin, a to například z důvodu koronárního spasmu, vysoké koncentrace cirkulujících katecholaminů s toxickými účinky, endoteliální dysfunkce, hypotenze, anémie či podstoupení rozsáhlé operace jiné než kardiologické.

Srdeční smrt v důsledku infarktu myokardu (IM typ 3) – zahrnuje nemocné, u kterých nastává srdeční smrt s příznaky myokardiální ischemie a jsou u nich předpokládány nové ischemické změny na EKG, avšak neznáme hodnoty srdečních biomarkerů, a to například proto, že smrt nastala dříve, než bylo možné odebrat krevní vzorek či posoudit výsledek.

IM spojený s revaskularizačními procedurami (IM typu 4 a 5) – může nastat v důsledku perkutánní koronární intervence (zkr. PCI) nebo po našití aortokoronárního bypassu (zkr. CABG) [22].

7.2 Klinický obraz

K akutnímu infarktu myokardu může dojít kdykoliv během dne a povětšinou je nástup příznaků pro něj svědčící velmi náhlý. I přesto bylo prokázáno, že poněkud častěji dochází ke vzniku IM v dopoledních hodinách, a to mezi šestou a dvanáctou hodinou [9,4].

Naprosto typickým symptomem je bolest na hrudi, neboli stenokardie, která je podobná bolesti při angině pectoris. Na rozdíl od té je však mnohem více intenzivní, není spojena s námahou, nýbrž se projevuje v klidu a má také mnohem delší trvání (obvykle více než 20 minut). Její intenzita se může lišit, a to v závislosti na rychlosti vzniku a stupni obstrukce příslušné tepny. Bolest může být lokalizovaná v oblasti hrudníku okolo srdce (=prekordiální bolest) či za střední třetinou sternu (retrosternální bolest). Obvykle je nemocnými popisována jako skličující bolest, která je svíravá, tlaková, drtící či pálivá. Může vyzařovat do dolní čelisti, krku, zad či epigastria, ale především hlavně do paží a horních končetin, v případě levé horní končetiny až do malíku. V některých případech se bolest projevuje jen jako neurčitý tlak v okolí hrudníku.

Stenokardii běžně provázejí také jiné symptomy, jako jsou slabost, dušnost či nauzea. Pacienti jsou bledí, potí se (objevuje se studený pot) a mohou mít chladné končetiny. Neobvyklé nejsou ani pocity úzkosti, nedostatku vzduchu a strach ze smrti. V důsledku vzniku arytmií se může objevit palpitace či celkový kolaps se ztrátou vědomí. Především starší pacienti mohou být značně zmatení či neklidní, velmi časté je i zvracení.

Ne vždy jsou příznaky akutního infarktu myokardu typické, u některých pacientů se dokonce nemusí objevit vůbec nebo se projeví až následkem komplikací, kterými jsou levostranné srdeční selhání, synkopa a periferní embolizace. Pokud nejsou klinické příznaky vyjádřeny vůbec, mluvíme o tzv. asymptomatickém infarktu myokardu. Ten bývá přítomen ponejvíce u starších osob, žen, diabetiků a u pacientů po operaci. U části nemocných se objevují příznaky, které nejsou pro IM úplně typické. Jedná se o různé nespecifické a méně intenzivní bolesti nebo je přítomna dušnost a pocení. Asymptomatických a pacientů s nespecifickými symptomy je zhruba 20 % [2,9,4,23].

7.3 Laboratorní diagnostika

Diagnostika akutního infarktu myokardu je u pacientů s bolestí na hrudi prováděna na základě diagnostických algoritmů. Jejich cílem je co nejrychleji odhalit, zda u nemocného opravdu hrozí vysoké riziko výskytu AIM a je třeba neprodleně zahájit léčbu či jestli může být bezpečně propuštěn domů. Tyto počáteční diagnostické algoritmy se opírají o důkladnou anamnézu, fyzikální vyšetření pacienta a EKG. Velmi důležitou součástí diagnostiky, na které je také z velké části postavena nejnovější definice AIM, je právě diagnostika laboratorní. V některých případech bývá pro přesnější určení diagnózy spektrum vyšetřovacích metod rozšířeno o zobrazovací metody či zátěžové testy [24,22].

Základ laboratorního vyšetření představuje stanovení hladin srdečních troponinů, koncentrace srdeční frakce kreatinkinázy (tzv. CK-MB mass) nebo myoglobinu. Jedná se o markery charakterizující nekrózu myokardu [2,5,25].

Dle některých autorů je součástí dnešní klinické praxe kromě vyšetření hladin srdečních troponinů také stanovení natriuretických peptidů a D-dimerů [24].

Existují však i další biomarkery, jejichž hladiny byly prokazatelně zvýšeny u nemocných s AKS, ale jejich využití se v klinické praxi příliš nedostalo. Jedná se např. o ischemií modifikovaný albumin (zkr. IMA), srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny (angl. zkr. H-FABP), kopeptin, myeloperoxidázu, CRP, cholin, placentární růstový faktor (zkr. PlGF), solubilní ligand CD40 (zkr. SCD40L), růstový diferenciací faktor 15 (GDF-15) a mnohé další [5,25].

7.3.1 Srdeční troponiny

Srdeční troponiny jsou strukturní proteiny, které jsou součástí tropomyosinového komplexu myocytů příčně pruhovaného svalstva, podílející se na jeho kontrakci a relaxaci. Celý komplex srdečních troponinů (zkr. cTn) je tvořen třemi podjednotkami, a to troponiny I (cTnI), T (cTnT) a C (cTnC). Změny v kardiomyocytech, vznikající v důsledku poškození srdce při AIM, způsobují uvolnění troponinů do periferní cirkulace. Odtud jsou později eliminovány retikuloendoteliálním systémem. Jelikož jsou troponiny I a T exprimovány pouze v srdeční svalovině, jedná se o biomarkery vysoce orgánově specifické, jejichž vzestup koncentrací v krvi je při současném výskytu odpovídajících symptomů považován za důsledek nekrózy myokardu.

K uvolnění troponinů do krevního oběhu dochází obvykle za 1-6 hodin od poškození myokardu, maximálních hodnot pak dosahují za 12 hodin. Poté jejich hladiny pomalu

klesají, avšak detekovatelné zůstávají ještě dalších 7-14 dní. Z těchto důvodů je doporučováno vyšetřit hladiny troponinů v krvi opakovaně - při přijetí pacienta a po určitém časovém intervalu (např. 6-9 hodinách) znovu. V současné době jsou troponiny stanovovány pomocí vysoce senzitivních metod (tzv. Hs metod), které umožňují především jejich časnější detekci. Pro nekrózu myokardu svědčí snížení či zvýšení alespoň jedné z hladin srdečních troponinů, přesahující 99. percentil pro normální referenční populaci. Pozitivita Hs troponinů je schopna svědčit pro nekrózu velmi malého rozsahu, ale i pro celou řadu jiných onemocnění srdce. Z toho důvodu je nutné interpretovat výsledky tohoto vyšetření s ohledem na celkový klinický obraz [5,24,25].

7.3.2 CK-MB

CK-MB je jedním ze třech izoenzymů kreatinkinázy, který je kromě myokardu přítomen také v kosterním svalstvu a v mozku. I přes tuto skutečnost je však zvýšení jeho hladiny v periferní krvi velmi typické právě pro nekrózu myokardu.

Dříve bývala vyšetřována sérová aktivita tohoto enzymu, dnes je doporučováno spíše stanovení hmotnostní koncentrace (CK-MB mass). Tato frakce kreatinkinázy je na vzestupu za 3-8 hodin od vzniku nekrózy, maxima dosahuje za 24-36 hodin a vymizí za 3-4 dny.

Pro diagnózu je nutný průkaz alespoň dvou po sobě jdoucích vzorků vyšších než normální hodnoty. Opakovaná vyšetření CK-MB byla po mnoho let zlatým standardem pro diagnostiku AIM, avšak s nástupem vysoce senzitivních metod pro stanovení troponinů, začalo být její použití doporučováno spíše jako doplňující k troponinům, než jako samostatně vyšetřovaný marker [5,25].

7.3.3 Myoglobin

Myoglobin je malý hemový protein, přítomný v cytoplazmě všech svalových buněk. Z toho důvodu je zvýšení jeho koncentrace v PK velmi nespecifické a může odrážet také stavy po operacích nebo traumatech kosterního svalstva [2,25].

Výhodou je naopak jeho velmi časný zvýšení, které nastává již za 1-3 hodiny od vzniku nekrózy s maximem zhruba za 6-9 hodin a normalizací do 24 hodin. Jelikož je nejdříve vyplavovaným biomarkerem od počátku stenokardie, je jeho využití ve spojení s troponiny velmi vhodné pro časnou diagnostiku. Velmi vysoká senzitivita také zaručuje jeho negativní prediktivní hodnotu, na jejímž základě jsme schopni AIM oprávněně vyloučit [25].

7.3.4 Natriuretické peptidy

Natriuretické peptidy jsou protektivní hormony, které mimo jiné zasahují do homeostázy vody a iontů a jsou produkovány svalovinou srdečních síní. Jejich účinek je podmíněn vazbou na příslušné receptory a k vzestupu jejich hladiny vede tlakové či objemové přetížení myokardu. Mimo poškození myokardu však mohou reflektovat také jiná onemocnění srdce, jako jsou například chlopenní vady, arytmie, zánětlivá onemocnění srdce, ale i plicní embolizace a mnohá další. Ačkoli v těchto případech nedosahují hladiny natriuretických peptidů v krvi tak vysokých hodnot, je nutné tuto skutečnost vzít při interpretaci výsledků v potaz.

Přestože existují dva hlavní natriuretické peptidy, a to mozkový natriuretický peptid – BNP a síňový natriuretický peptid – ANP, v klinické praxi se uplatilo především stanovení BNP a N-terminálního fragmentu proBNP (zkr. NT-proBNP), jenž je biologicky neaktivní a vzniká postupným odštěpováním prekurzoru. Vyšetření BNP a NT-proBNP se stalo nedílnou součástí rutinní diagnostiky srdečního selhání, a to především u pacientů s nejasným klinickým obrazem (např. polymorbidních).

Natriuretické peptidy jsou velmi přínosné pro svou negativní prediktivní hodnotu u pacientů jak s akutním, tak chronickým srdečním selháním. Dle současných evropských doporučení platí, že v případě podezření na akutní srdeční selhání je hodnota BNP < 100 pg/ml a NT-proBNP < 300 pg/ml dostačující pro vyloučení srdečního selhání. Co se týče chronického srdečního selhání, stejně platí hodnoty BNP < 35 pg/ml a NT-proBNP < 125 pg/ml [24,25].

7.3.5 D-dimery

D-dimery jsou konečnými produkty štěpení fibrinu, k jehož degradaci došlo v návaznosti na aktivaci krevního srážení. K jejich zvýšení v cirkulaci dochází zejména u tromboembolických stavů, ale existují i jiné stavy, které jejich zvýšení doprovází (např. zánět, trauma, sepse, atd.).

Pro klinickou praxi představuje nejvyšší přínos zejména negativní prediktivní hodnota tohoto vyšetření, přičemž nejvyšší senzitivity je dosaženo použitím metody ELISA. Interpretace výsledků musí být opět opírána o celkový klinický obraz [24].

7.3.6 Ostatní biomarkery

Mezi další biomarkery, jejichž zvýšení bylo opakovaně prokázáno právě u nemocných s AKS, patří například CRP, jenž je proteinem akutní fáze, produkováným

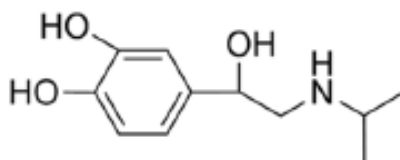
játry jako odpověď na zánět. Na nespecifické známky zánětu může mimo CRP upozornit také např. zvýšená hodnota TNF- α . Na probíhající ischemii myokardu může poukázat zvýšená hodnota ischemií modifikovaného albuminu (IMA), který vzniká z albuminu poškozením jeho N-konce za ischemických podmínek. IMA není schopen vázat kovy a je možné jej detekovat v krvi pomocí kobalt-vázacího testu. Kromě něj o ischemii vypovídá také protein vázající mastné kyseliny, konkrétněji jeho srdeční typ (H-FABP), exprimovaný především právě v myokardu. Díky své malé molekule může proniknout ischemií poškozenými buněčnými membránami. O interakci destiček a monocytů vypovídají např. placentární růstový faktor a solubilní ligand CD40, interakce trombocytů s leukocyty jsou charakterizovány interleukiny (6,10). V průběhu akutních koronárních syndromů může dojít také ke zvýšení hladiny myeloperoxidázy jako markeru oxidativního stresu, cirkulujících metaloproteináz, markerů endoteliální dysfunkce, kopeptinu nebo cholinu. Tyto parametry si však své místo pro diagnostiku AKS nezískaly a využívány jsou pouze již zmíněné ukazatele nekrózy myokardu [5,25].

7.4 Léčba

Úspěšnost léčby akutního infarktu myokardu pomocí nejefektivnější a dnes široce nejvyužívanější z metod je 90-95 %. U akutních koronárních syndromů je včasná diagnostika a léčba základem úspěchu. Riziko úmrtí pacienta je značně sníženo, pokud je mu včas poskytnuta odborná lékařská pomoc, a to dnes za pomoci moderního přístrojového vybavení na kardiologických jednotkách. Cílem obecné léčebné strategie je zprůchodnění uzavřené věnčité tepny a obnovení dodávky kyslíku do srdce. Toho je ve většině případů dosaženo právě již zmiňovanou perkutánní koronární intervencí (PCI). V některých případech je také využíváno účinků trombolytické léčby, ale i celé řady dalších léčebných metod, které však značně přesahují obsah této diplomové práce [2,9].

8 Isoprenalin

Isoprenalin (zkr. ISO) je syntetická látka, známá také pod názvem isoproterenol. Molekulový vzorec této látky je $C_{11}H_{17}NO_3$, strukturální vzorec je uveden na následujícím obrázku:



Obrázek 2. Strukturální vzorec isoprenalinu [26]

Jedná se o neselektivního agonistu β -adrenergních receptorů, který se společně s adrenalinem, noradrenalinem či dopaminem řadí do skupiny katecholaminů. Jelikož jeho účinek působí především na srdce, plíce, kosterní svalstvo a trávicí trakt, může být využíván jako bronchodilatátor či srdeční stimulant [26,27].

Endogenní katecholaminy, jako jsou právě adrenalin, noradrenalin či dopamin, jsou signální molekuly, které se podílí na udržování homeostázy kardiiovaskulárního systému. Jejich přítomnost je ve velmi nízkých koncentracích pro organismus nezbytná, avšak vyšší koncentrace katecholaminů, ať už uvolněných, nebo exogenních podaných organismu zvenčí, jsou kardiotoxické [26,28].

Kardiotoxicita vyšších dávek isoprenalinu je schopna navodit stav, který je v mnoha aspektech velice podobný akutnímu infarktu myokardu u člověka. Z toho důvodu je isoprenalinový model již od roku 1970 široce využívaným experimentálním modelem pro navození myokardiálního poškození u potkanů i jiných laboratorních zvířat. Jelikož se jedná o relativně levný a neinvazivní postup s možností snadného vytvoření velkého množství reprezentativních vzorků v krátkém čase, vzniklo již v minulosti mnoho studií, využívajících tento model k testování účinnosti nejrůznějších potenciálně protektivních látek v problematice myokardiálního poškození [29,30,31].

Mechanismus kardiotoxického účinku isoproterenolu je poměrně složitý. Nadměrná stimulace β -adrenergních receptorů vede ke zvýšené poptávce energie v myokardu. K tomu navíc stimulace β_2 -adrenergních receptorů způsobuje periferní vazodilataci, snížení diastolického krevního tlaku a tím i perfuzi myokardu. K energetické nerovnováze se dále připojují další změny, jako je např. přetížení vápníkem či agregace trombocytů s možným utvořením trombu. Dalším spolupůsobkem je i zde oxidační

stres. Ať už v důsledku spontánní autooxidace katecholaminů, oxidace katalyzované kovovými ionty, nebo důsledkem ischemie, vznikají v myokardu po podání ISO reaktivní kyslíkové radikály. Tyto změny společně s dalšími strukturálními změnami (změna v propustnosti buněčné membrány) hrají společně významnou roli v patogenezi poškození myokardu. Oblastí jeví se jako nejvíce citlivou k uvedeným změnám je především subendokard levé komory srdce [26,30,32].

Míra poškození myokardu je závislá na použité dávce isoprenalinu. Studií Mladěnký et al. (2009a) bylo potvrzeno, že dávka 100 mg.kg^{-1} s.c. je schopna navodit značné změny v myokardu, v jejichž důsledku došlo k uvolnění nadbytku srdečního troponinu T do periferie, zrychlení srdečního tepu, poklesu systolického objemu a zvýšení indexu vlhké hmotnosti komor. Především uvolnění značného množství troponinů do periferie, které je základním kamenem diagnostiky, jenom potvrzuje velkou podobnost experimentálního poškození myokardu, navozeného pomocí isoprenalinu u laboratorních zvířat, se skutečným akutním infarktem myokardu u člověka. Tato dávka byla navíc schopna způsobit 31% míru mortality pokusných zvířat, která v zásadě odpovídá míře úmrtnosti v lidské populaci před zavedením současné nefarmakologické léčby [31,28].

Podání dostatečné dávky isoprenalinu laboratornímu zvířeti je schopno také vyvolat změny v histologii myokardu jeho srdce. Mladěnký et al. (2009a) potvrdil, že po podání dávky 100 mg.kg^{-1} , následné autopsii části tkáně srdeční komory a jejím běžném histologickém zpracování, bylo v preparátech obarvených barvením Hematoxylin-eosin patrné difúzní toxické poškození se zánětlivou reakcí. To bylo přítomno v celém myokardu, nejvíce však v oblasti subendokardu. Kardiomyocyty s intenzivně eosinofilní cytoplazmou byly značně degenerované až nekrotické. Kromě toho byl pozorován mírný zánětlivý infiltrát s leukocyty a také mírný edém intersticia [31].

Brazílská studie Loba Filha et al. potvrzuje toxické účinky isoprenalinu mimo jiné přehlednou obrazovou dokumentací mikroskopického nálezu u samečů potkana Wistar, po podání dávky 150 mg.kg^{-1} ve dvou 24 hodinových intervalech. Mikroskopický nález klasifikuje do několika úrovní poškození myokardu, a to na: (0) žádné změny, (1) mírné změny – fokální poškození kardiomyocytů nebo malá multifokální degenerace s lehkou zánětlivou reakcí, (2) střední změny – rozsáhlá degenerace myofibril a/nebo difúzní zánětlivý proces, (3) těžké změny - nekróza a difúzní zánětlivý proces [29].

Prince ve své studii mimo vyhodnocení míry protektivního účinku (-)epikatechinu také semikvantitativně vyjádřil intenzitu histopatologických změn v myokardu,

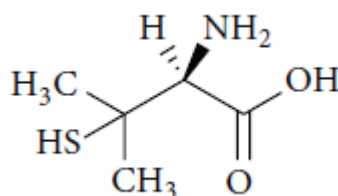
navozených právě samotným isoprenalinem. Stupeň poškození vyjádřil v podobě křížků, a to jako: (A) žádné změny, (+) mírné změny, (+++) značné změny. Oproti kontrolní skupině potkanů, která nevykazovala žádné změny, byly u skupin potkanů po aplikaci ISO patry značné změny (+++) co se týče edému, nekrózy i přítomnosti zánětlivých buněk. V této studii byl ISO podáván pokusným zvířatům opět v dávce 100 mg.kg^{-1} , avšak v intervalu 24 h po dobu dvou dnů [33].

Úroveň poškození se však také mění v čase, uplynulém od podání dané dávky. Podrobnější analýzou histopatologických změn, ve spojení se studiem dalších změn biochemických, navíc s vyhodnocením možnosti ovlivnění výsledku konkrétní látkou se zabývá např. Zhang et al. [30].

Kromě značného zvýšení hladiny srdečního troponinu T v PK, byla pozorovatelná také zvýšená hladina cTnI či např. AST a močoviny. Bylo také prokázáno celkové zvýšení počtu leukocytů. Sérová hladina CK byla zvýšena, zatímco její hladina v srdci se značně snížila. Hladiny antioxidantních enzymů katalázy, superoxiddismutázy a glutathionperoxidázy byly, společně s glutathionem jako takovým, jejich zvýšenou spotřebou značně vyčerpány. Hladiny vitaminů E a C, pravděpodobných antioxidantů, vykazovaly tendence ke snížení. Byla prokázána také zvýšená myokardiální složka mědi. Tato zjištění byla potvrzena právě mnohými studii [29,32,31,28].

9 D-penicilamin

D-penicilamin, známý také jen jako penicilamin, dimethylcystein či např. merkaptovalin, je degradačním produktem penicilinových antibiotik. Tento derivát aminokyseliny cysteinu má molekulový vzorec $C_5H_{11}NO_2S$ a následující strukturní vzorec, uvedený na obrázku 3.



Obrázek 3. Strukturní vzorec D-penicilaminu [34]

D-penicilamin je látka s širokým rozsahem využití při léčbě nejrůznějších onemocnění. Používá se v léčbě revmatoidní artritidy, kde působí jako imunosupresor a redukuje tak počty lymfocytů, inhibuje funkci makrofágů, snižuje hladinu IL-1, samotného revmatoidního faktoru a brání síťování kolagenu. Využití jej dále lze při léčbě cystinurie, sklerodermie, otrav těžkými kovy ale především v léčbě Wilsonovy choroby. Wilsonova choroba je geneticky podmíněná autozomálně recesivní onemocnění, spočívající v poruše metabolismu mědi. Postižen je gen kódující ATPázu transportující měď, jejíž absence či snížená aktivita vede k nadměrné akumulaci mědi v játrech a k jejímu nedostatečnému vylučování žlučí. Měď může však také proniknout do krevního oběhu a ukládat se i v jiných orgánech, např. v mozku, ledvinách nebo rohovce a zde způsobit poškození. Cílem terapie Wilsonovy choroby je redukce nadměrné akumulace mědi, a to zvýšením její exkrece močí. Tyto předpoklady výborně splňuje právě D-penicilamin, který je účinným chelátorem kovů, schopným vázat měď a potencovat její vyloučení močí [35,34,36].

Měď je esenciální stopový prvek, fungující jako kofaktor mnoha enzymů zapojených do redoxních reakcí – jedná se především o enzymy cytochrom c oxidázu, askorbát oxidázu či superoxid dismutázu. Je však také prvkem, schopným navodit oxidační stres, a to dvěma možnými způsoby. Zaprvé, může přímo katalyzovat vznik reaktivních forem kyslíku skrze reakci podobnou Fentonově. Ionty Cu(II) mohou být za přítomnosti superoxidového radikálu nebo biologických reduktantů, jako jsou například glutathion či askorbová kyselina, redukovány na Cu(I). Právě ty jsou pak schopny

katalyzovat rozklad peroxidu vodíku výše uvedenou reakcí, a to za vzniku velmi reaktivního hydroxylového radikálu, dále schopného poškozovat ostatní buněčné molekuly. Zadržuje, zvýšené množství uvolněné mědi může značně snížit hladiny glutathionu. Ten je substrátem mnoha enzymů, odklízejících ROS a je sám také účinným antioxidantem. Jeho deplece může vyústit v prohloubení cytotoxicity reaktivních forem kyslíku a také jejich masivnější produkci, z důvodu vyšší katalytické aktivity mědi za nepřítomnosti glutathionu [37].

Již před mnoha lety bylo ve vědeckých experimentech prokázáno, že po reperfuzi ischemického srdce následuje okamžité uvolnění značného množství mědi (a také železa). Tyto kovové ionty ve své redox aktivní formě hrají významnou roli v procesu vzniku reaktivních forem kyslíku, zodpovědných za poškození srdeční tkáně v průběhu ischemie a následné reperfuze [38].

Mnohé studie jasně potvrzují, že u pacientů s akutním infarktem myokardu byly skutečně nalezeny vyšší hladiny mědi v séru, než u zdravých jedinců kontrolních skupin a že je měď spojena s vyšší mortalitou na kardiovaskulární choroby u pacientů, podstupujících koronární angiografii [39,40].

Není proto překvapením, že se na základě těchto zjištění přímo nabídla otázka ovlivnění tkáňového poškození pomocí chelátorů nebezpečných přechodných kovů. Některé chelátory železa, které by mohly ovlivnit průběh poškození myokardu v jeho isoprenalinovém modelu, byly předmětem zkoumání již několika zahraničních studií [41,42,43].

Výzkumná skupina Mladěanky z Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové poukázala na kardioprotektivní účinky dvou chelátorů železa, a to PCTH a dexrazoxanu [44,45].

Poněkud méně pozornosti bylo v dosavadních letech věnováno studiu kardioprotektivity chelátorů mědi. Prozatím je známa pouze jedna studie, která testovala efekt známého chelátoru mědi, a to konkrétně neocuproinu, v experimentálním modelu ischemie myokardu a následné reperfuze, konkrétně na izolovaných srdcích potkanů [46].

Jelikož navíc nejsou záznamy o pokusech, prováděných na plném zvířecím modelu, byl pro naši studii vybrán právě standardní chelátor mědi D-penicilamin, který je látkou v minulosti široce využívanou pro léčbu nejrůznějších uvedených patologií [34].

B EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

10 Provedení experimentu

Tato diplomová práce vychází ze studie autorů Říhy et al. (2016) a údaje, potřebné pro doplnění experimentální části, byly od těchto autorů převzaty s jejich svolením [34].

10.1 Zvířata a použitý materiál

V experimentu bylo použito 46 samců potkana Wistar Han, získaných od firmy Meditox (Česká republika). Potkani byli chováni v klecích, umístěných ve speciální klimatizované místnosti, v níž se periodicky střídal světelný režim s tmou ve 12 hodinových cyklech. Zvířata měla po dobu dvou týdnů volný přístup ke kohoutkové vodě a standardní peletkové stravě pro hlodavce. Po této době aklimatizace byli zdraví potkani vážící okolo 390 g použiti pro provedení experimentu. Tato studie byla schválena Etickou komisí Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a odpovídá doporučením, zvaným The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, publikovaným americkou Národní Institucí Zdraví (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

V pokusech byly využity tyto reagensie a roztoky:

- katecholaminy epinefrin a isoprenalin
- D-penicilamin
- hexahydrát chloridu železitého ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- heptahydrát síranu železnatého ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- ferrozín
- octan sodný
- kyselina octová
- 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (zkr. HEPES)
- sodná sůl HEPES
- hydroxylamin
- kyselina salicylová
- 2,3-dihydroxybenzoová a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina

Všechny výše uvedené chemikálie a roztoky byly pořízeny od Sigma Aldrich (USA).

Dále bylo využito:

- deferoxamin (Novartis, Švýcarsko)
- dimethylsulfoxid (Avantor Performance Materials, USA)

- methanol (JT Baker, USA)
- chemikálie a roztoky použité pro buněčné kultury, jako jsou kultivační média, séra a další (Sigma Aldrich, USA; Lonza Group, Švýcarsko)
- zásobní roztoky železnatých a železitých iontů, připravené ředěním destilovanou vodou (Milli-Q RG, Merck Millipore, USA)
- peroxid vodíku
- vodný roztok kyseliny fosforečné
- neutrální červeň (Sigma)
- formaldehyd obohacený o CaCl_2
- ethanol
- sondy propidium iodid a Hoechst 33342 (Molecular Probes, USA)
- voda do injekce (B. Braun, Německo)
- vodný roztok urethanu (Sigma Aldrich, USA)
- vodný roztok chloridu draselného
- askorbát, FeSO_4
- solný roztok a různé další pufrů
- buněčná linie H9c2, odvozená z embryonální BD1X srdeční tkáně potkana (American Type Culture Collection, USA)

Byly použity také tyto přístroje a nástroje:

- mikrodestičkový reader Synergy HT Multi-Detection (BioTek Instruments Inc., USA) včetně mikrodestiček
- HPLC systém (Dionex Ultimate 3000, Dionex Corp., USA) s kolonou C18 Eclipse Plus (4.6×100 mm, $3.5 \mu\text{m}$, Agilent Inc., USA)
- 75 cm^2 kultivační nádobky pro tkáně (Techno Plastic Products AG)
- mikrodestičkový spektrofotometr Tecan Infinite 200 M (Tecan, Švýcarsko)
- epifluorescenční mikroskop Nikon Eclipse TS100 s 10-40 \times zvětšujícími objektivy (Nikon, Japonsko), vybavenými digitální kamerou 1300Q (VDS Vosskühler GmbH, Německo)
- tlakový snímač MLT0380/D (ADInstruments, Austrálie)
- tlakově-objemový katetr typu Millar (Millar pressure-volume catheter SPR-838 2 F, 4E, 9 mm, Millar Instruments Inc., USA), PE katetry
- elektrody pro měření EKG II MLA1215 (ADInstruments)
- PowerLab se softwarem LabChart 7 (ADInstruments)

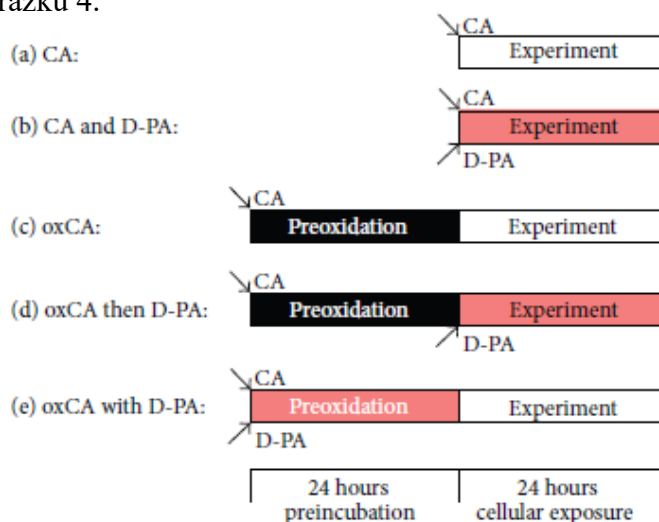
- Cobas e411 od firmy Roche pro vysoce senzitivní elektrochemiluminiscenční imunanalýzu
- HPLC systém LC-10A (Shimadzu, Japonsko)
- PrinCE 750 pro elektroforézu s UV detekcí (Nizozemsko)
- ultrazvukový buněčný homogenizátor (Model XL2000, Misonics, USA)

10.2 Uspořádání experimentu

Protektivní účinky D-penicilaminu, klinicky často využívaného chelátoru mědi, v experimentálním modelu akutního infarktu myokardu vyvolaném katecholaminy, byly testovány jak v in vitro experimentech za použití zejména kardiomyoblastové buněčné linie H9c2, tak v in vivo experimentech na potkanech kmene Wistar Han.

10.2.1 In vitro experiment

Hlavní podstatou této části vědeckého experimentu bylo ověření, zdali je D-penicilamin schopen mít pozitivní efekt na buněčné poškození, vyvolané katecholaminy epinefrinem a isoprenalinem v kardiomyoblastové buněčné linii H9c2. Jelikož tyto katecholaminy spontánně oxidují v množství chemicky příbuzných produktů, bylo v buněčných experimentech vytvořeno pět různých protokolů pro studium toxického či protektivního účinku daných sloučenin. Katecholaminy byly k buňkám H9c2 přidány jak čerstvě připravené ve své původní podobě, tak oxidované, a to po 24 h preinkubaci v kultivačním médiu při 37 °C. Do směsi s katecholaminy byl přidán D-penicilamin, a to buď na počátku prováděného buněčného experimentu, nebo na začátku 24 h preoxidace katecholaminů. Dodržované experimentální protokoly jsou znázorněny na obrázku 4.



Obrázek 4. Přehled protokolů buněčného experimentu

V samotném buněčném experimentu byla následně, po expozici uvedeným látkám, vyhodnocena cytotoxicita, a to na základě množství životaschopných buněk. Nedílnou součástí této části bylo také pozorování změn v buněčné morfologii. Jelikož je známo, že chelátory kovů nejsou obvykle příliš specifické, zajímalo autory studie také, zdali je D-PA schopen vázat i železo. Proto bylo součástí in vitro experimentu také vyšetření redukční a chelatační kapacity D-PA pro železo anebo test zábrany produkce hydroxylového radikálu, probíhající normálně právě za katalýzy železem.

10.2.2 In vivo experiment

V in vivo experimentu byly jak protektivní účinky D-PA, tak toxické účinky ISO přímo hodnoceny na zvířecím modelu. Laboratorní potkani byli náhodně rozděleni do šesti skupin. Skupina C (negativní kontrola) obdržela vodu ve formě injekce do ocasní žíly, zatímco skupiny D-PA11 a D-PA44 D-penicilamin v dávce 11 nebo 44 mg.kg⁻¹. ISO v dávce 100 mg.kg⁻¹ nebo voda v injekci byla potkanům podána o pět minut později subkutánně. Ke třem uvedeným skupinám tak přibyly skupiny ISO (pozitivní kontrola), D-PA11+ISO a D-PA44+ISO. Po podání uvedených látek měla zvířata ještě po dobu následujících 12 hodin přístup k vodě a krmivu, na dalších 12 hodin před operací jim byly tyto zdroje odebrány. Zvířata byla uspána pomocí intraperitoneální injekce vodního roztoku urethanu a byly u nich vyšetřeny hemodynamické parametry. Následně byl z abdominální aorty odebrán do heparinizované zkumavky krevní vzorek, který byl posléze podroben biochemické analýze. Na konci experimentu byla zvířata bezbolestně utracena za použití intravenózní aplikace vodního roztoku chloridu draselného.

10.2.3 Analýza dat

K detekci odlehlých hodnot, a to jak v buněčném, tak ve zvířecím modelu, byl použit Grubbsův test. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SD. Pro vícečetná porovnání byla využita jednofaktorová ANOVA, následně s Tukeyho testem (in vivo experiment) a Bonfferoniho post hoc analýzou (in vitro experiment). Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly považovány za signifikantní, pokud byla hodnota $P < 0,05$. Všechny statistické analýzy byly provedeny v programu GraphPad Prism verze 6.0 (GraphPad Software, USA), pouze výsledky buněčného experimentu byly vyhodnoceny pomocí statistického softwaru SigmaStat (Systat Software Inc., USA).

10.3 Použité metody

K dosažení výsledků uvedené části experimentální studie bylo využito několika následujících metod.

10.3.1.1 Kultivace buněk

K tomu, aby mohly být provedeny níže uvedené buněčné in vitro experimenty, musely být buňky linie H9c2 nejdříve kultivovány, a to v Dulbeccoem modifikovaném Eaglově médiu (zkr. DMEM), obohaceném o 10% tepelně inaktivované fetální bovinní sérum, 1% roztok penicilinu/streptomycinu a HEPES pufr. Buňky byly kultivovány v kultivačních lahvích při 37 °C a ve zvlhčené atmosféře s 5 % CO₂. Narostlé kultury byly dvakrát týdně subkultivovány a následně nasazeny do mikrodestiček. V další fázi také došlo k výměně kultivačního média za médium bez séra, a to 24 h před zahájením experimentu z toho důvodu, aby byla zastavena proliferace buněk. V tomto séru také chyběl pyruvát, jelikož by jako antioxidant mohl ovlivnit toxicitu spojenou s ROS.

10.3.1.2 Test absorpce neutrální červeně

Poté co byly k buněčným kulturám dle uvedených protokolů přidány katecholaminy a D-PA, byla výsledná cytotoxicita vyhodnocena na základě množství životaschopných buněk. Tato metoda je založena na schopnosti přeživších buněk inkorporovat neutrální červeně. Toto barvivo je schopno snáze proniknout membránou živých buněk a ukládat se v buněčných lysozomech. Do jamek mikrotitrační destičky s přeživšími buňkami bylo tedy v následujícím kroku přidáno médium s neutrální červení. Po 3h inkubaci při 37 °C byl odstraněn supernatant, buňky byly fixovány formaldehydem obohaceným o CaCl₂ a poté dvakrát promyty pufovaným fyziologickým roztokem. Následovala solubilizace 1% kyselinou octovou v 50% methanolu za současného míchání. Tímto způsobem se z buněk neutrální červeně zpětně uvolnila do extracelulární tekutiny a její absorbance byla změřena pomocí mikrodestičkového spektrofotometru.

10.3.1.3 Epifluorescenční mikroskopie

K posouzení změn v morfologii buněk bylo využito inverzního epifluorescenčního mikroskopu, a to po obarvení jader molekulárními sondami, jež jsou určeny k identifikaci nekrotických buněk a apoptózy. Barvení oběma sondami probíhalo po dobu 10 minut při 37 °C.

10.3.1.4 Test chelatace a redukce železa

Tento experiment byl proveden s využitím látky ferrozinu, který je schopen jako specifický indikátor tvořit purpurově zbarvené komplexy s železnatými ionty. Ačkoliv ferrozín běžně nereaguje s železitými ionty, je možné tyto ionty nejprve redukovat pomocí vhodného redukčního činidla (např. hydroxylaminu) na ionty železnaté a poté nechat již úspěšně reagovat s ferrozinem za vzniku zbarvení. Hodnocení chelatace železa D-penicilaminem bylo prováděno v jamkách mikrotitrační destičky za přítomnosti pufrů, acetátu a HEPES pufru. Po přidání různých koncentrací D-PA do jamek destičky, přišlo na řadu přidání roztoku s železnatými a železitými ionty a následovala inkubace po dobu 2 minut. Pro posouzení celkové chelatace železa byl do jamek nejprve přidán hydroxylamin a následně ihned a po 5 minutách od přidavku ferrozinu změřena absorbance vzniklých komplexů. V případě určení stupně redukce železitých iontů, byly testované látky v různých koncentracích smíseny v jamkách destičky s železitými ionty a pufrů a i zde byla po uplynutí intervalu 2 minut a přidavku ferrozinu ihned i po 5 minutách změřena absorbance.

Množství nezchelatovaného či nezredukovaného železa bylo vypočteno jako rozdíl absorbancí testovaného vzorku (s ferrozinem) a blanku (bez ferrozinu) ku rozdílu absorbancí kontrolního vzorku (se známým množstvím železa, bez přidavku testované sloučeniny) a kontrolního blanku.

10.3.1.5 Inhibice produkce hydroxylových radikálů

V tomto testu byly železnaté ionty míseny s testovanými látkami o různých koncentracích, rozpuštěnými v methanolu, a to po dobu 2 minut. Poté byl ke směsi přidán peroxid vodíku a kyselina salicylová, která je schopna zachytit vzniklé hydroxylové radikály za vzniku 2,3-dihydroxybenzoové a 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny. Tyto produkty jsou pak snadno detekovatelné pomocí HPLC systému s kolonou C18 Eclipse Plus. Jako mobilní fáze byl použit 40% methanol a také 0,085% vodný roztok kyseliny fosforečné. Jako interní standard byly použity kyseliny 2,3-dihydroxybenzoová a 2,5-dihydroxybenzoová.

Koncentrace hydroxylových radikálů byla vypočtena jako průměr vzorků, smísených (1) s methanolem a (2) s interním standardem.

10.3.1.6 Vyšetření hemodynamických parametrů

V průběhu anestezie proběhlo u potkanů měření tlaku, a to zavedením PE katetru napojeného na tlakový snímač MLT0380/D do levé společné kyčelní arterie. Skrze pravou společnou karotidu byl do levé komory srdce připojen tlakově-objemový katetr typu Millar. Tyto společně s elektrodami pro záznam EKG byly napojeny na PowerLab se systémem LabChart 7. Data byla sbírána po dobu 30 minut a následně byla po ukončení experimentu provedena kalibrace hypertonickou solí.

10.3.1.7 Biochemická analýza

V krevním vzorku, odebraném během operace zvířete, byla následně stanovena hladina cTnT v séru za pomoci vysoce senzitivní elektrochemiluminiscenční imunoanalýzy na přístroji Cobas e411. Vitamin E v plasmě byl stanoven po deproteinizaci za použití HPLC systému LC-10A s fluorimetrickou detekcí, vitamin C elektroforézou (PrinCE) s UV detekcí. Pro měření peroxidace lipidů bylo 100-150 mg srdeční tkáň nejprve zalito ledově vychlazeným pufrem fosforečnanu draselného. Poté byla tkáň nakrájena a rozdrcena ultrazvukovým homogenizátorem XL2000. Rozdrcená tkáň byla inkubována po dobu 30 minut při 37 °C s askorbátem a FeSO₄. Množství CO uvolněného do vialky bylo stanoveno pomocí plynové chromatografie.

11 Metodika práce

11.1 Zpracování vzorku pro histologickou analýzu

Základní postup standardního zpracování materiálu pro histologickou analýzu se sestává z několika kroků, jimiž jsou fixace, zalévání, krájení, lepení řezů, dále jejich barvení a samotné montování preparátu.

První krok, fixace materiálu, je nezbytnou součástí úspěšného zpracování odebraného vzorku. Slouží ke konzervaci buněk a tkání a zabraňuje jejich rozkladu jak autolyticky (působením buněčných enzymů), tak heterolyticky (poškození tkáně mikroorganismy). K zachování vlastností materiálu pro účely dalšího studia je tedy nutná rychlá denaturace proteinů a usmrcení buněk, a to právě fixací. Ideálně by fixativa měla být schopna rychlé penetrace do vzorku, neměla by snižovat jeho barvitelnost a ani ovlivnit další zpracování. V histologii bývá nejčastěji využívána fixace pomocí formaldehydu, který příčně svazuje polypeptidové řetězce proteinů a velmi dobře zachovává mikroskopickou strukturu tkání.

V našem experimentu byl k fixaci materiálu využit chlazený roztok 10% pufovaného formaldehydu. Odebraný materiál byl do něj okamžitě ponořen, a to na 24 hodin.

Následující proces zalévání se sestává z několika kroků. Prvním z nich je odvodnění vzorku, a to obvykle za pomoci ethanolu o stoupající koncentraci, přičemž doba potřebná k odvodnění závisí na velikosti a struktuře tkáňového bločku, obvykle se však pohybuje od 13 do 28 hodin. Následuje projasnění, jelikož se po odvodnění musí ethanol z tkáně řádně odstranit. K tomu se často využívá látky s nižším bodem varu, xylenu. Posledními kroky jsou prosycení tkáně v tekutém parafinu a konečně samotné zalití tkáně do tohoto zalévacího média [47,48].

Při histologickém zpracování našeho preparátu byly použité látky i časové intervaly jejich působení upraveny dle aktuálních potřeb a tradičních postupů laboratoře a celý postup zalévání je podrobně rozepsán v tabulce 4.

Tabulka 4. Postup při zalévání fixovaného materiálu

Použitá látka	Časový interval	Proces
70% ethanol	30 minut	odvodnění
70% ethanol	30 minut	
80% ethanol	3 hodiny	
90% ethanol	2 hodiny	
96% ethanol	přes noc	
aceton I.	30 minut	
aceton II.	30 minut	
xylén I.	2 hodiny	projasnění
xylén II.	4 hodiny	
parafín I.	přes noc	prosycení + zalití
parafín II.	přes noc	

Z takto vytvořených parafinových bločků byly následně pomocí sáňkového mikrotomu LEICA DSC 1 vytvořeny řezy o tloušťce zhruba 5 μm . Ty byly vzápětí přeneseny na podložní sklíčka s kapkou vody. Tyto podložní sklíčka byla také předem potřena směsí glycerolu s bílkou, která napomáhá přilepení a fixaci řezu na sklíčko.

Před vlastním barvením bylo dále nutné odstranit z řezů zalévací médium (odparafinovat je) pomocí vhodného rozpouštědla, a to proto, abychom zajistili správný účinek barviv, většinou používaných ve formě vodných roztoků. V posledním kroku bylo třeba řezy převést do destilované vody [47].

K těmto úkonům byl v naší laboratoři využit postup, uvedený v následující tabulce:

Tabulka 5. Postup při odparafinování bločku

Použitá látka	Časový interval	Proces
xylen	5 minut	odparafinování
xylen	5 minut	
xylen	5 minut	
96% ethanol	5 minut	
70% ethanol	5 minut	
destilovaná voda	5 minut	převedení do vody
otření sklíček	-	

V našem experimentu bylo pro zvýraznění potřebných struktur preparátu využito metod pro přehledná barvení, a to konkrétně barvení Hematoxylin-eosin (zkr. H-E) a zelený trichrom dle Goldnera.

11.2 Barvení Hematoxylin-eosin

Jedná se o základní barvicí metodu, hojně využívanou pro přehledné barvení. Hematoxylin je bazické barvivo, které barví jádra buněk. Jelikož však roztok hematoxylinu sám o sobě bazofilní substance nebarví, je nejdříve třeba jej oxidací přeměnit v hematein a z něj připravit barevný lak přidáním mořidla. Nejčastěji využívaným hematoxylinem pro rutinní barvení je Mayerův hematoxylin. Eosin je barvivo kyselé, které barví acidofilní substance, jakou je např. cytoplazma [48].

Celkový výsledek barvení pak je [47]:

jádra buněk	modře
cytoplazma	růžově
kolagenní vazivo	růžově
svalstvo	červeně
chrupavka	modře

V našem experimentu byl využit 1% roztok eosinu v destilované vodě a hematoxylin, připravený dle postupu uvedeného v tabulce 6.

Tabulka 6. Složení roztoku hematoxylinu

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

Postup, dle kterého bylo provedeno samotné barvení pomocí takto připravených roztoků, je uveden v tabulce 7.

Tabulka 7. Postup při barvení metodou H-E

Látka	Časový interval
hematoxylin	6-8 minut
pramenitá voda	10 minut
otření sklíček	-
eosin	2 minuty
destilovaná voda	opláchnutí

Obarvené řezy je následně třeba odvodnit a projasnit. Za účelem odvodnění byly preparáty dvakrát opláchnuty v 96% ethanolu a ponořeny nejprve do směsi ethanolu s xylenem v poměru 2:1 na 3 minuty, a poté znovu do směsi ethanol-xylen, avšak v poměru 1:2 na 3 minuty. Projasnění bylo dosaženo pomocí třech lázní xylenu, ve kterých byla sklíčka ponořena vždy po dobu 3 minut. V posledním kroku byla sklíčka důkladně osušena a konečně zamontována do kanadského balzámu.

11.3 Barvení zelený trichrom dle Goldnera

Jedná se o často využívanou metodu barvení, vhodnou zejména k vyšetření kolagenního vaziva. K barvení vaziva slouží světlá zeleň žlutavá, k barvení jader je obvykle použit Weigertův hematoxylin, k dobarvení kolagenu a dalších struktur ponceau kyselý fuchsin, oranž G, světlá zeleň žlutavá, případně anilinová modř [47,48].

Celkový výsledek barvení pak je [47]:

jádra buněk	modře až hnědočerně
svalstvo	červeně
erytrocyty	oranžově
kolagenní vazivo	zeleně

Pro toto barvení bylo nejdříve nutno připravit potřebné roztoky, kterými byly Goldner I a Goldner III. Přesný postup jejich přípravy je uveden v tabulce 8 a v tabulce 9. Jako Goldner II byl využit 1% vodný roztok kyseliny fosfowolframové.

Tabulka 8. Příprava roztoku Goldner I

Látka	Množství	Potřebné množství pro roztok Goldner I
ponceau de xilidin	1 g	20 ml
koncentrovaná kys. octová	1 ml	
destilovaná voda	100 ml	
oranž G	1 g	10 ml
koncentrovaná kys. octová	1 ml	
destilovaná voda	100 ml	
Fuchsin S	1 ml	10 ml
koncentrovaná kys. octová	1 ml	
destilovaná voda	100 ml	

Tabulka 9. Příprava roztoku Goldner III

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

Samotné barvení bylo provedeno dle uvedeného schématu:

- 1) Nejprve byly řezy odparafinovány, a to stejným způsobem jako v případě barvení metodou Hematoxylin-eosin (viz tabulka 5)
- 2) V dalším kroku byly odparafinované řezy ponořeny do roztoku hematoxylinu po dobu 4 minut
- 3) Následně proběhlo opláchnutí v 70% alkoholu a diferencování v kyselém alkoholu
- 4) Bylo provedeno modření preparátu opláchnutím pod tekoucí vodou
- 5) Preparáty byly ponořeny do roztoku Goldner I po dobu 10 minut, následovalo opláchnutí destilovanou vodou
- 6) Následovalo ponoření do roztoku Goldner II na 10 minut + oplach destilovanou vodou
- 7) Vložení preparátů do roztoku Goldner III (10 minut) a znovu oplach destilovanou vodou
- 8) Nakonec byl preparát odvodněn a zamontován do Solakrylu

11.4 Mikroskopické hodnocení a fotodokumentace

Takto zpracované histologické preparáty byly důkladně prohlédnuty a fotodokumentace, uvedená v této práci, byla vybrána dle charakteristiky přítomných nálezů. Mikroskopické hodnocení bylo provedeno za pomoci světelného mikroskopu OLYMPUS AX-70, vybaveného digitální kamerou ProgRes LT3 od firmy Jenoptik (Německo). Snímky byly dále zpracovány v zobrazovacím softwaru NIS - ELEMENTS AR 4.00.11 (Česká republika).

12 Výsledky

12.1 Histologická analýza

Na samotný začátek je třeba uvést histologický obraz myokardu kontrolní skupiny potkanů, jimž nebyl podán ani ISO ani D-PA. Ten je zachycen na obrázku 5. Je zde patrná část myokardu, která vykazuje všechny známky charakteristické pro fyziologický nálezn. Jedná se zejména o viditelné příčné pruhování, oválná jádra kardiomyocytů, spojení mezi kardiomyocyty v podobě interkalárních disků a také úzké intersticiální prostory s krevními cévami.

Histologický obraz myokardu u skupin potkanů, jimž byl intravenózně podán pouze samotný D-PA, se při prohlížení v mikroskopu jevil jako velmi podobný kontrolní skupině. Obrázek 6 představuje preparát obarvený zeleným trichromem dle Goldnera, na kterém je patrný endokard, myokard i epikard, a to po podání dávky 11 mg.kg^{-1} D-PA. Na obrázku 7 je při větším zvětšení zobrazen endokard s papilárními svaly, a to po podání dávky 44 mg.kg^{-1} D-PA. Ať už v koncentraci 11 nebo 44 mg.kg^{-1} , v žádném z preparátů těchto dvou skupin nebyly zpozorovány známky probíhající nekrózy a celkový obraz připomínal fyziologickou strukturu myokardu. Jedinou odchylkou se může zdát být kapilární hyperémie, která byla zpozorována ve všech vrstvách srdce kontrolní skupiny i skupin D-PA11 a D-PA44. Překrvení kapiláry je dobře viditelné právě na obrázku 7.

Aplikace ISO v dávce 100 mg.kg^{-1} u ISO skupiny potkanů, vedla ke vzniku ischemického poškození myokardu. V místě tohoto poškození byly patrné charakteristické známky počínající nekrózy kardiomyocytů, a to v podobě fragmentovaných buněk myokardu s eosinofilní cytoplazmou. Značně dilatované intersticiální prostory vyplňoval markantní edém a překrvené krevní kapiláry. Takto rozšířené intersticiium z velké části vyplňoval infiltrát zánětlivých buněk. Na obrázku 8 je zobrazen myokard, u něhož je v důsledku podání ISO patrný výrazný difúzní zánětlivý infiltrát v dilatovaném intersticiu. Stejně mohutný difúzní infiltrát byl přítomen také v epikardu (obrázek 9) i endokardu (obrázek 10). Na obrázku 10 je v zobrazeném endokardu kromě mohutného kulatobuněčného infiltrátu dobře patrná také silná eosinofilie a homogenizace cytoplazmy se ztrátou typického pruhování. Masivní fragmentace je doprovázena také výraznou hyperémií kapilár.

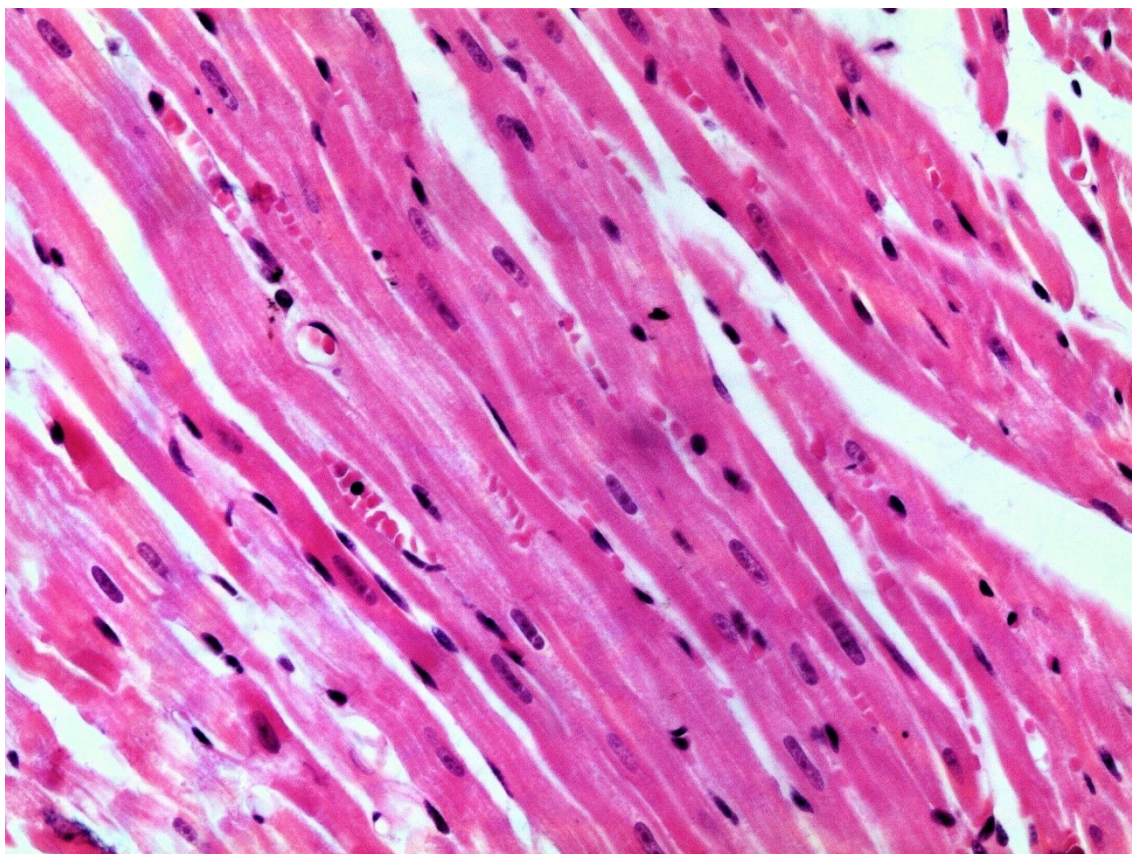
Premedikace potkanů oběma dávkami D-penicilaminu (11 a 44 mg.kg^{-1}), vedla po následné aplikaci ISO k vzájemně velmi podobnému výsledku histologické analýzy.

U obou těchto skupin došlo ke zlepšení změn v histopatologickém obraze, které nastaly vlivem podání isoprenalinu, přičemž toto zlepšení bylo patrné především v epikardu a myokardu. Ischemické poškození, ačkoliv mnohem menšího rázu než u samotných ISO skupin, zůstalo patrné spíše v endokardu obou skupin.

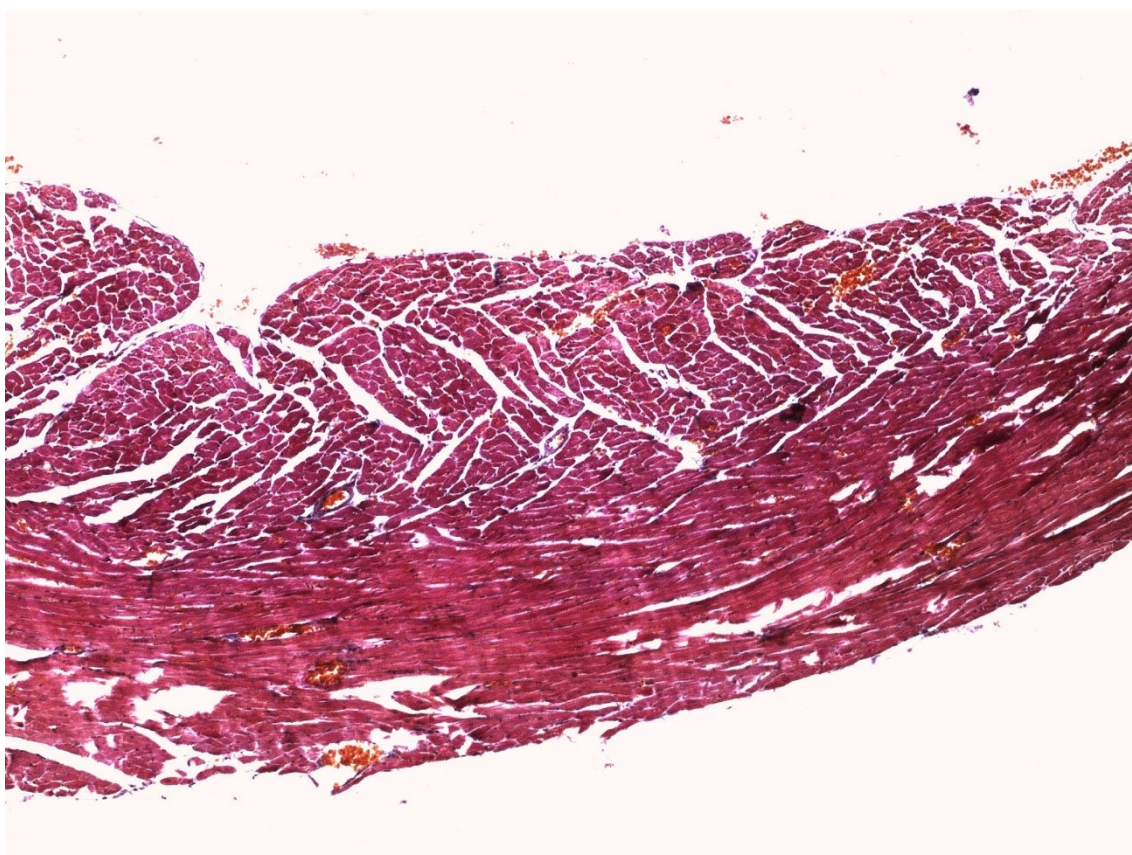
Na obrázku 11 je zobrazen myokard a endokard skupiny po premedikaci pomocí D-PA v dávce 11 mg.kg^{-1} . Na této detailnější fotografii je viditelný mírný zánětlivý infiltrát a fragmentace cytoplazmy, vyskytující se především právě v endokardu. Obrázek 12 představuje myokard skupiny potkanů D-PA11+ISO s mírnými změnami v podobě zánětlivé infiltrace cév, difúzně se šířící celou strukturou myokardu. Tento infiltrát je však v porovnání s ISO skupinami opravdu mírnějšího rázu. Na obrázku 13 jsou detailně zachyceny jedny z hlavních komponent zánětlivé populace buněk, jimiž jsou žírné buňky. Ty byly nalezeny v malém počtu právě v myokardu skupiny D-PA11+ISO.

Následující obrázek 14 zachycuje endokard a myokard skupiny potkanů D-PA44+ISO, na kterém pozorujeme změny v podobě dilatace intersticiálních prostorů a mírného zánětlivého infiltrátu, a to opět především v endokardu. Podobný obraz je viditelný na obrázku 15, kde je v endokardu stejné skupiny opět přítomen mírný zánětlivý infiltrát a hyperémie kapilár, zatímco myokard vykazuje jen malé změny. Poslední obrázek 16 představuje endokard skupiny potkanů, premedikovaných pomocí D-PA v dávce 44 mg.kg^{-1} , který po podání ISO jevil známky drobnější infiltrace zánětlivými buňkami, a to např. dobře viditelnými monocyty, označenými v obrázku zelenými šipkami. Přítomny jsou také četné fibroblasty (označené modrými šipkami), rozšířené intersticiální prostory a drobné překrvené kapiláry. Všechny tyto uvedené změny mají však, ve srovnání s histopatologickým obrazem u skupin potkanů, jimž byl podán pouze ISO v dávce 100 mg.kg^{-1} , mírnější podobu.

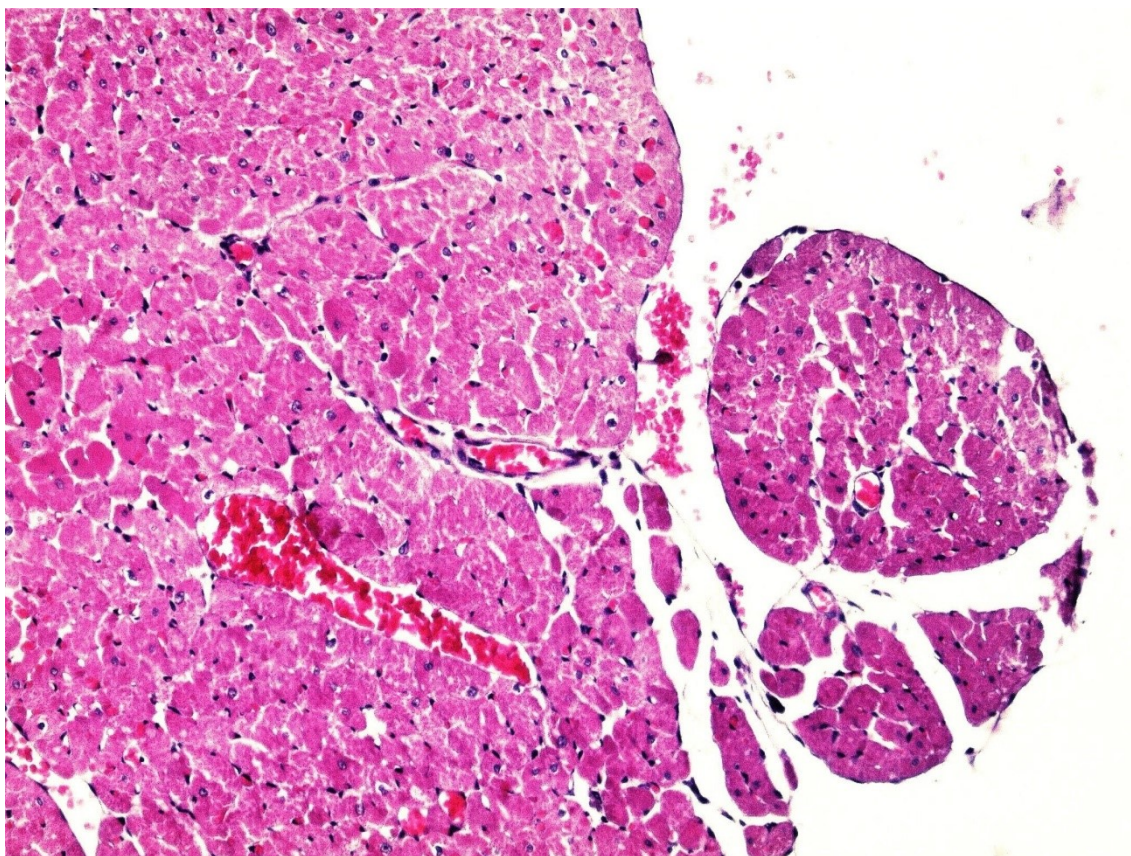
Na závěr této práce byly jednotlivé změny v histopatologickém obraze srdcí potkanů kontrolní skupiny, skupin po aplikaci D-PA v koncentracích 11 a 44 mg.kg^{-1} , ale i ISO, ISO+D-PA 11 a ISO+D-PA 44, semikvantitativně zhodnoceny. Přítomnost či nepřítomnost změn, charakteristických pro ischemické poškození byla hodnocena pro každou vrstvu srdce samostatně. Semikvantitativní hodnocení popisuje přítomné patologické změny jako: žádné (-), málo (+), mírně (++) a středně významné (+++). Přehled semikvantitativního hodnocení je uveden v tabulce 10.



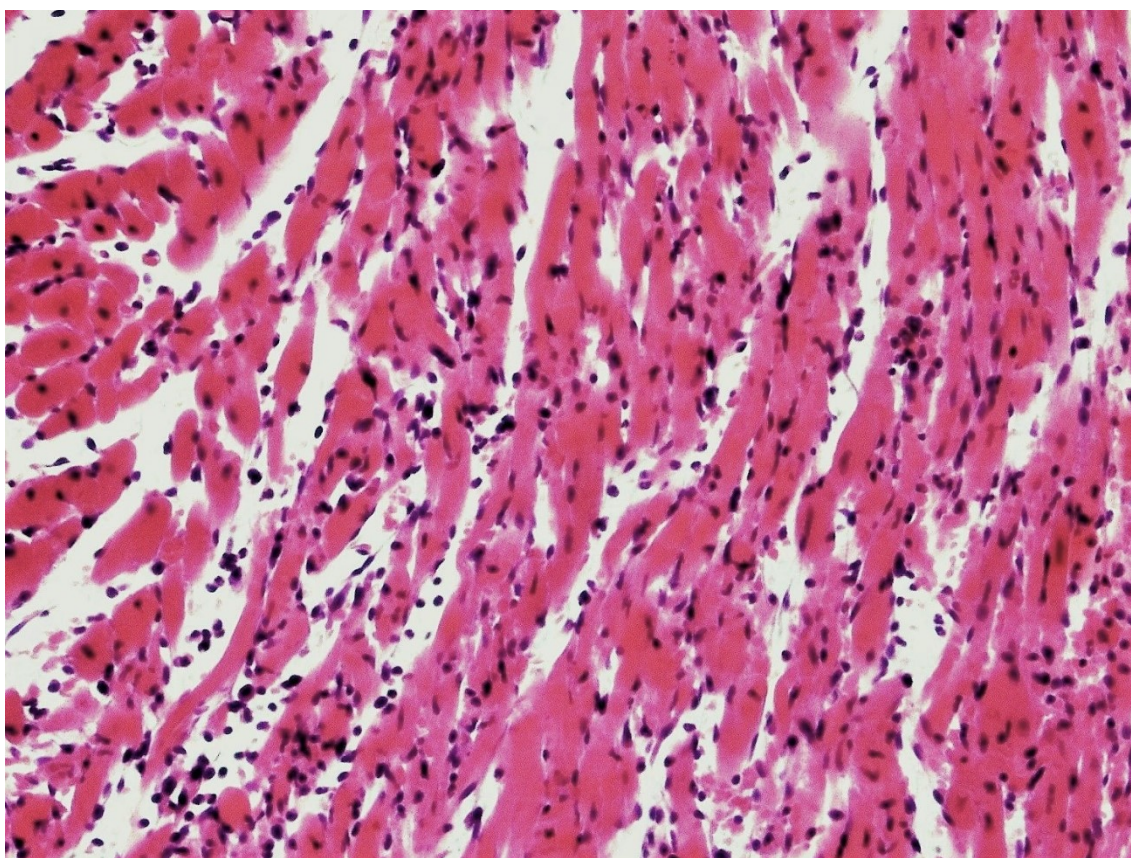
Obrázek 5. Myokard (kontrolní skupina), barvení H-E, zv. 200×



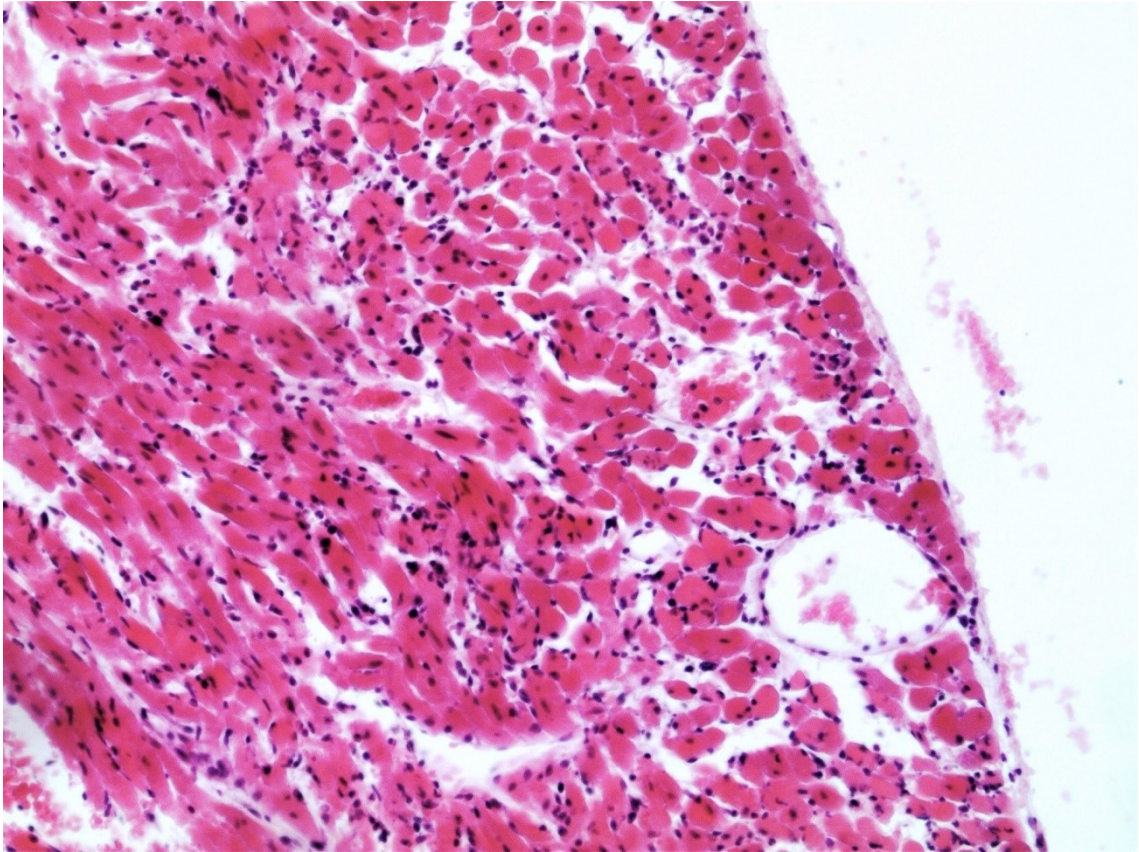
Obrázek 6. Endokard, myokard a epikard (D-PA11), barvení zelený trichrom, zv. 40×



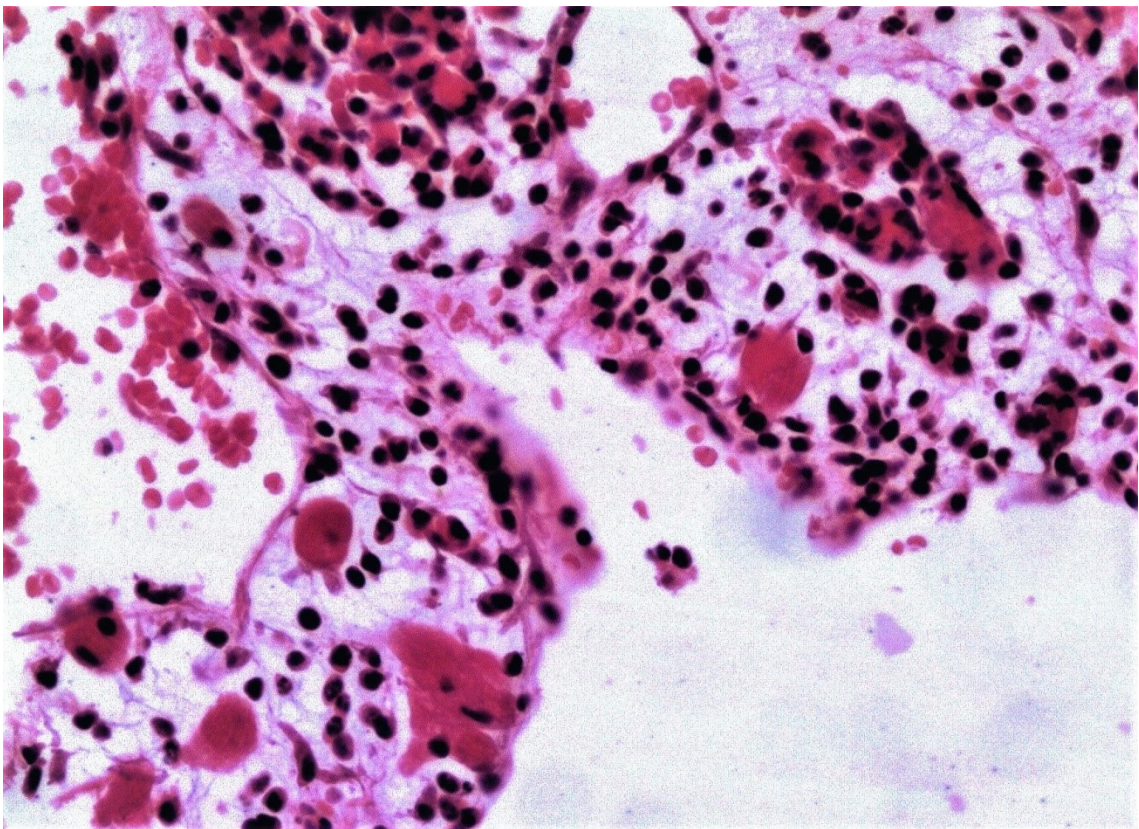
Obrázek 7. Endokard a papilární svaly (D-PA44), barvení H-E, zv. 100×



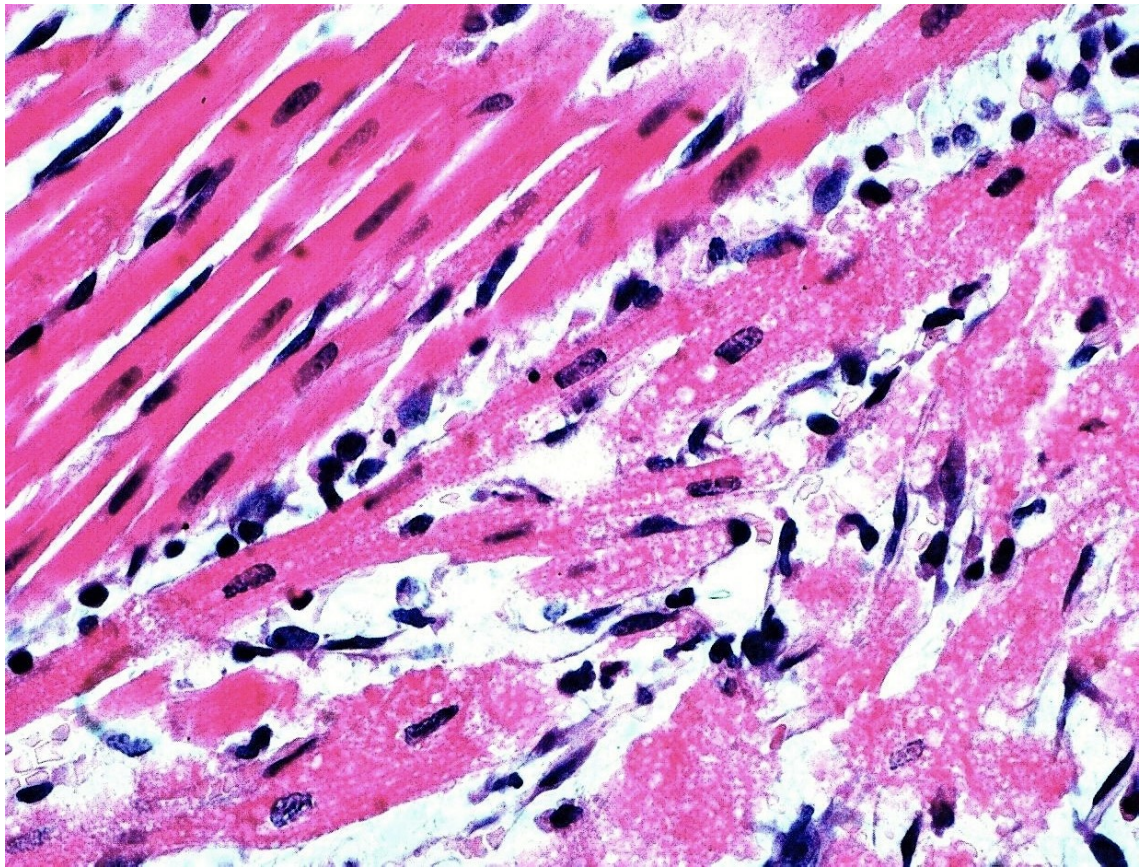
Obrázek 8. Myokard (ISO), barvení H-E, zv. 200×



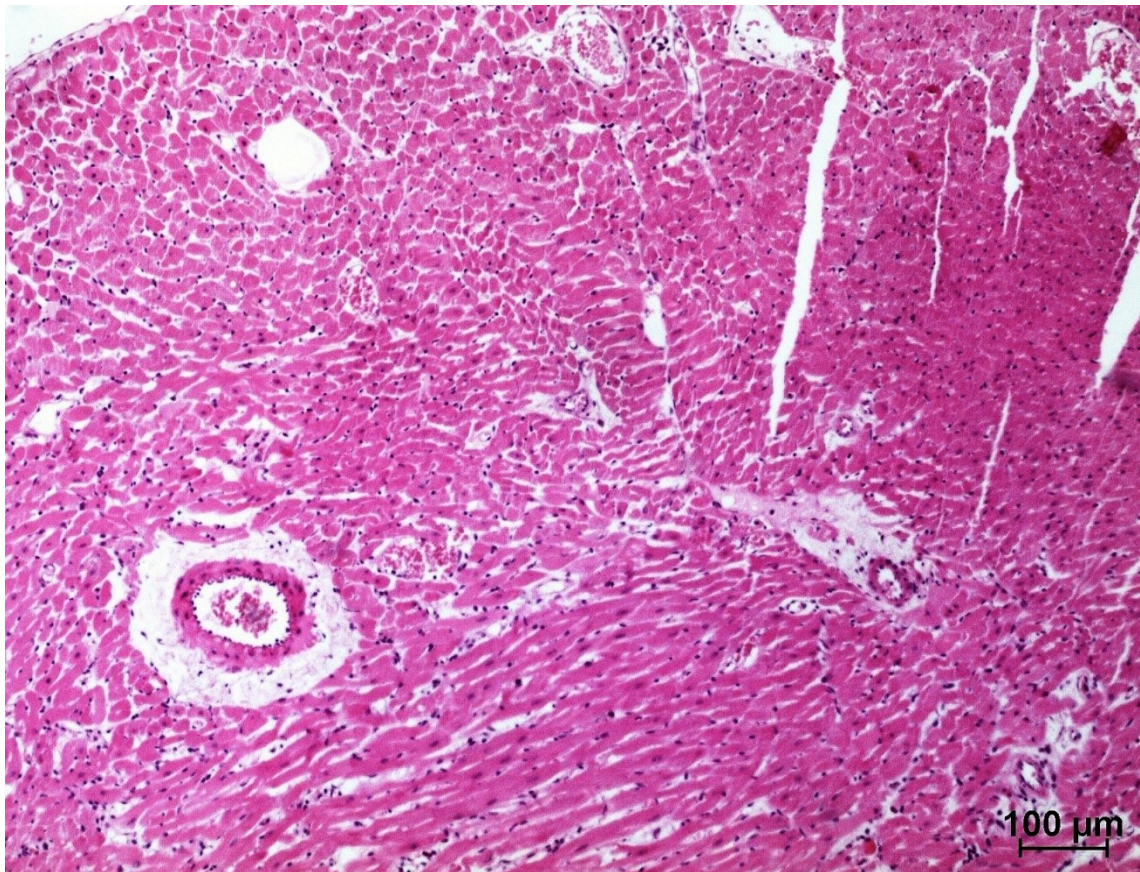
Obrázek 9. Epikard (ISO), barvení H-E, zv. 100×



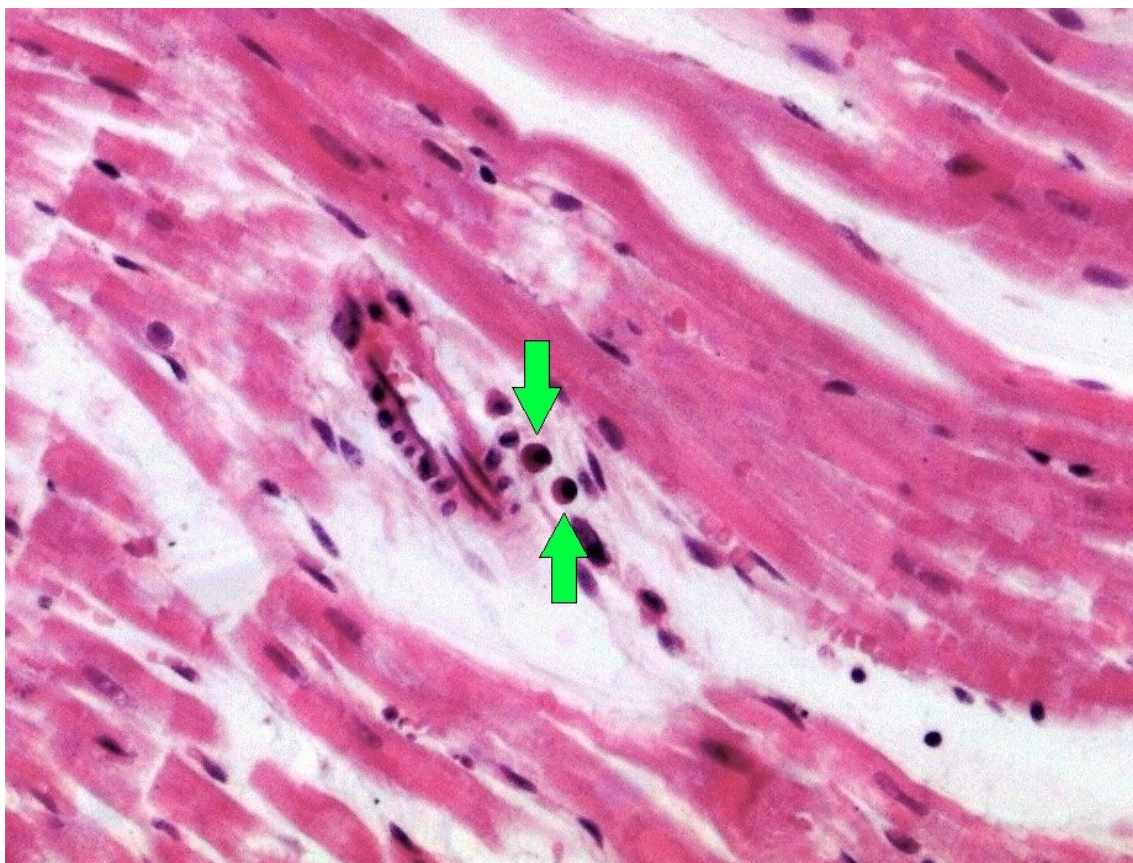
Obrázek 10. Endokard (ISO), barvení H-E, zv. 200×



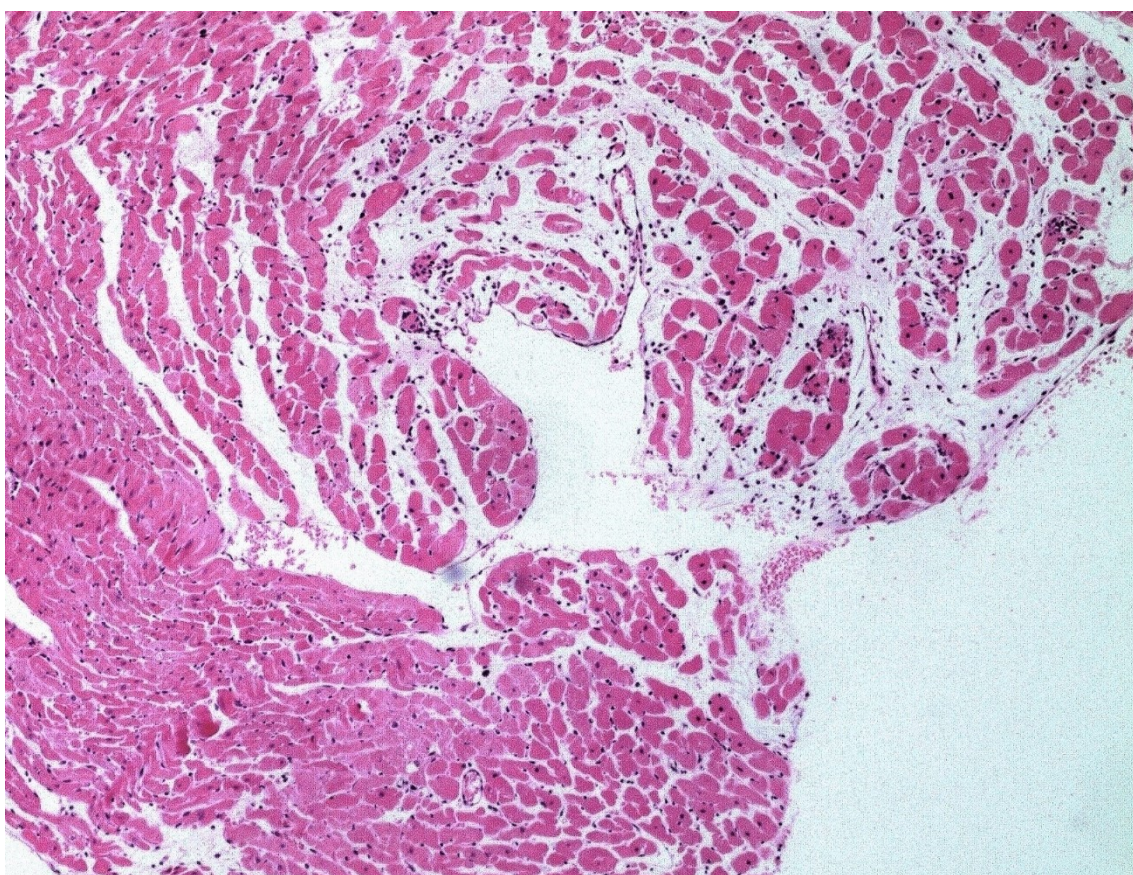
Obrázek 11. Myokard a endokard (D-PA11+ISO), barvení H-E, zv. 400×



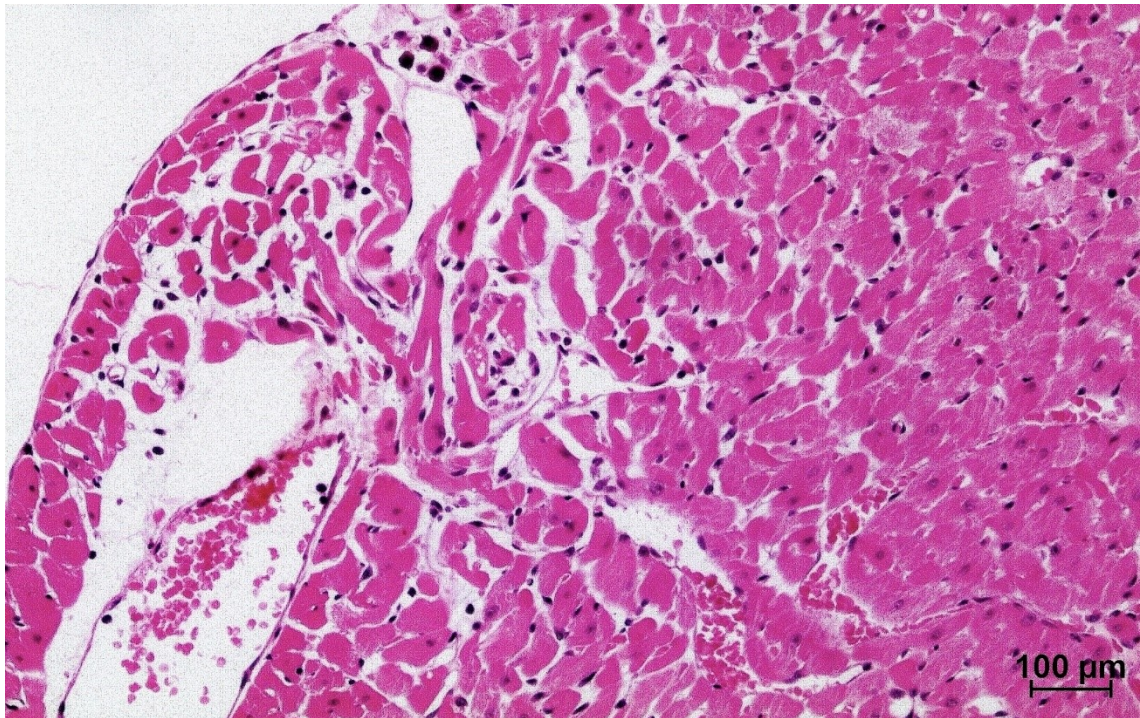
Obrázek 12. Myokard (D-PA11+ISO), barvení H-E, zv. 40×



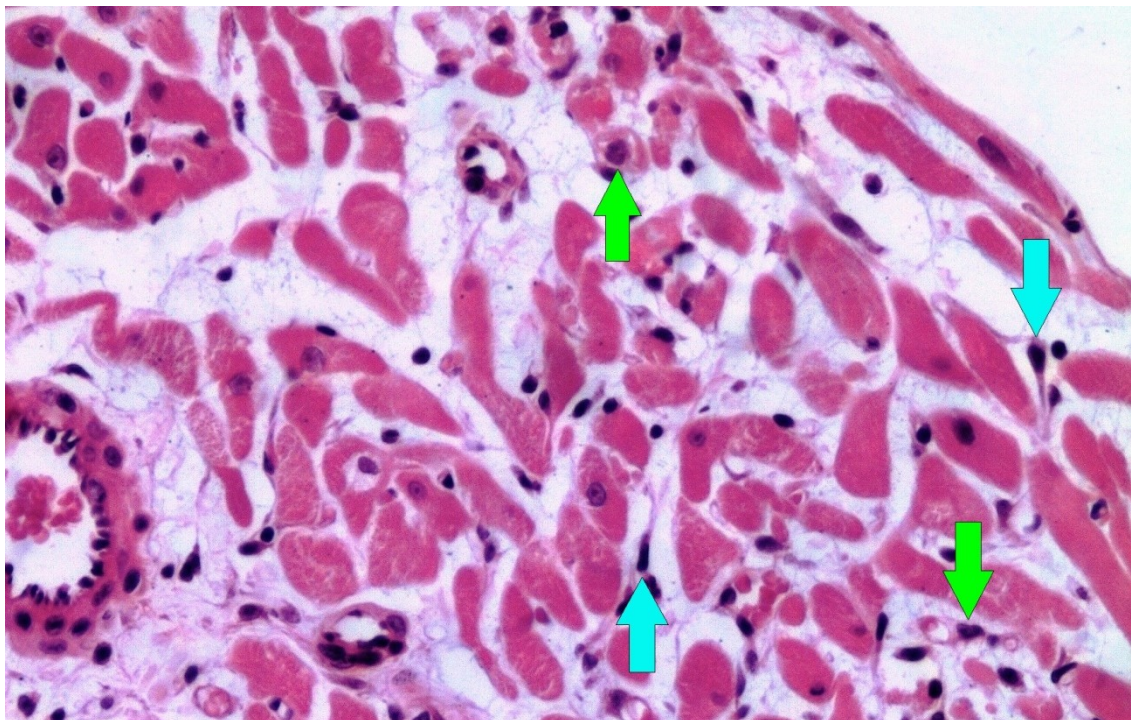
Obrázek 13. Žírné buňky v myokardu (D-PA11+ISO), barvení H-E, zv. 200×



Obrázek 14. Endokard a myokard (D-PA44+ISO), barvení H-E, zv. 40×



Obrázek 15. Endokard a myokard (D-PA44+ISO), barvení H-E, zv. 100×



Obrázek 16. Endokard (D-PA44+ISO), barvení H-E, zv. 200×

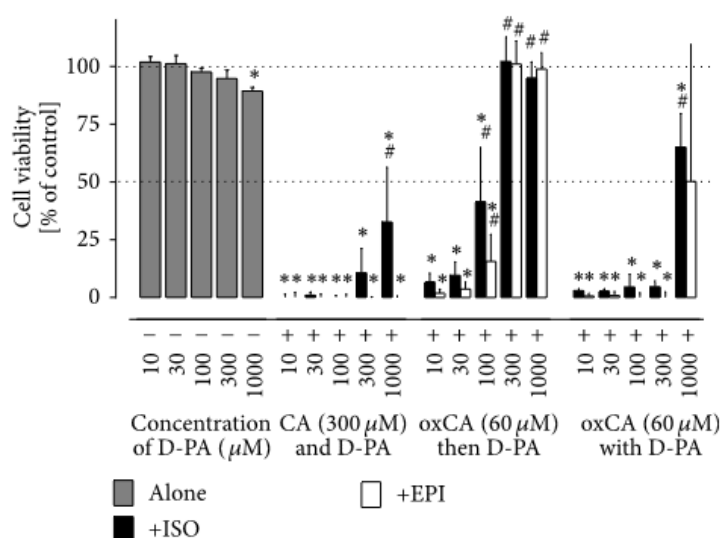
Tabulka 10. Semikvantitativní hodnocení změn v srdci potkana

Změna	Oblast	Kontrola	D-PA 11	D-PA 44	ISO	ISO+D-PA 11	ISO+D-PA 44
Místní kapilární hyperémie	Endokard	+	+	+	+++	++	++
	Myokard	+	+	+	+++	+	+
	Epikard	+	+	+	+++	+	+
Dilatace a edém intersticia	Endokard	-	-	-	+++	++	++
	Myokard	-	-	-	+++	+	+
	Epikard	-	-	-	+++	+	+
Zduření pojivových vláken	Endokard	-	-	-	+++	++	++
	Myokard	-	-	-	+++	+	+
	Epikard	-	-	-	+++	+	+
Nekrotické změny kardiomyocytů	Endokard	-	-	-	+++	++	++
	Myokard	-	-	-	+++	+	+
	Epikard	-	-	-	+++	+	+
Fragmentace myofibril	Endokard	-	-	-	+++	++	++
	Myokard	-	-	-	+++	+	+
	Epikard	-	-	-	+++	+	+
Fragmentace svalových trámců	Endokard	-	-	-	+++	++	++
	Myokard	-	-	-	+++	+	+
	Epikard	-	-	-	+++	+	+
Přítomnost makrofágů/ žírných buněk	Endokard	-	-	-	+++	++	++
	Myokard	-	-	-	+++	++	++
	Epikard	-	-	-	+++	++	++

12.2 Farmakologická analýza

12.2.1 In vitro experiment

12.2.1.1 Test absorpce neutrální červeně



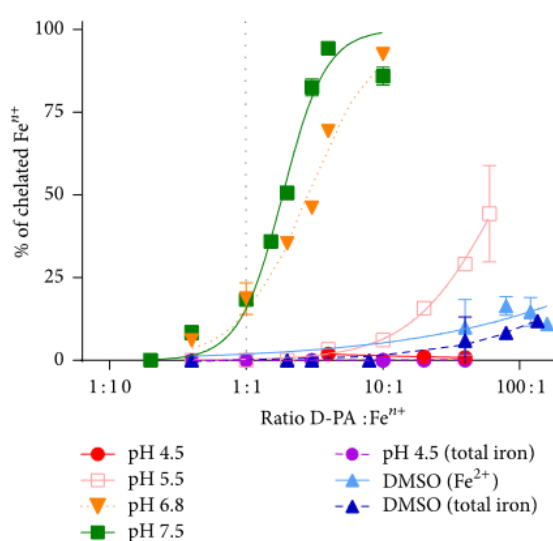
Aplikace samotného D-PA neovlivnila životnost buněk linie H9c2. Avšak D-PA, v kombinaci s aplikací katecholaminů (obzvláště preoxidovaných) napomohl zvýšit životnost buněk, a to v závislosti na jeho koncentraci. 300 a 1000 μM D-PA spolehlivě zabránilo buněčné smrti.

Graf 1. Životnost buněk po aplikaci D-PA, katecholaminů a jejich oxidačních produktů

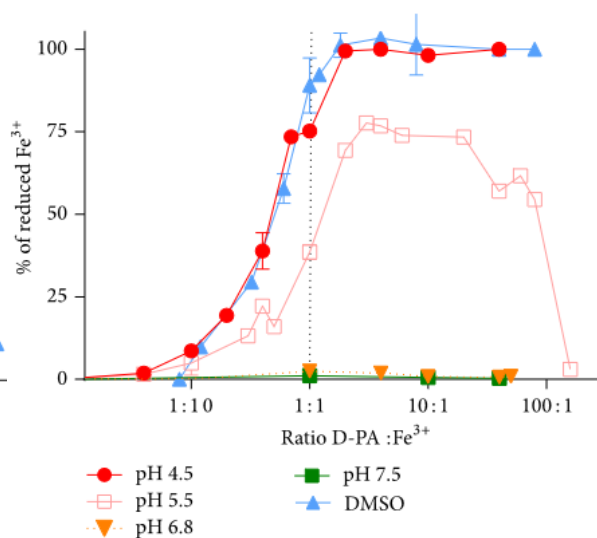
12.2.1.2 Epifluorescenční mikroskopie

Samotný D-PA neovlivnil buněčnou morfologii, koncentrace 300 μM ochránila kardiomyoblasty před poškozením katecholaminy.

12.2.1.3 Test chelatace a redukce železa



Graf 2. Míra chelatační aktivity D-PA pro železo

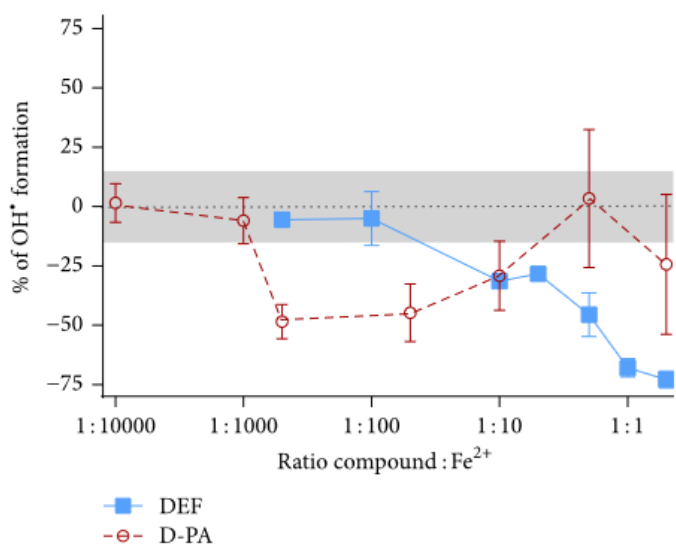


Graf 3. Míra redukce železa pomocí D-PA

Za pomoci kompetitivní spektrofotometrické metody byla potvrzena schopnost D-PA vázat železo, avšak míra chelatační aktivity této látky klesá se snižujícím se pH okolí.

Bylo potvrzeno, že D-PA je schopen značně redukovat železité ionty, avšak opět v závislosti na pH prostředí.

12.2.1.4 Inhibice produkce hydroxylových radikálů

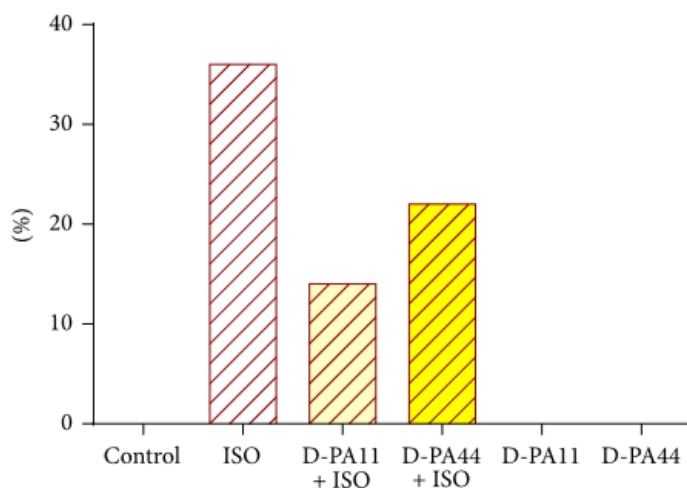


U D-PA bylo v porovnání se standardním chelátorem železa DEF, který snižuje produkci hydroxylových radikálů v závislosti na dávce, prokázáno komplexnější chování. Při nízkých koncentracích D-PA úspěšně blokoval Fentonovu reakci, vyšší koncentrace nevykazovaly žádný efekt.

Graf 4. Vliv D-PA na produkci hydroxylových radikálů

12.2.2 In vivo experiment

12.2.2.1 Mortalita



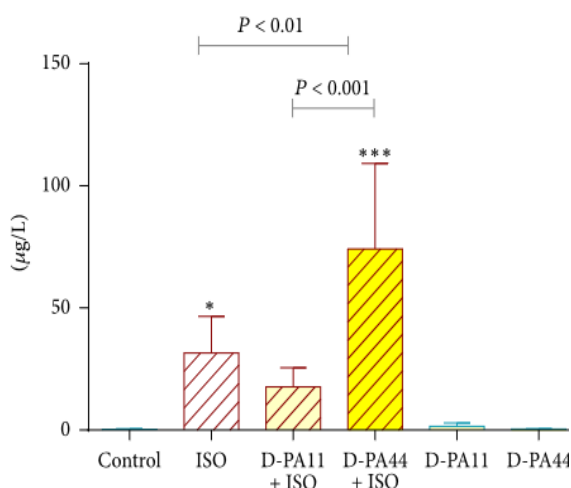
Dávka 100 mg.kg⁻¹ ISO aplikovaná subkutánně vedla k 36% mortalitě zvířat. Premedikace D-PA v dávce 11 mg.kg⁻¹ snížila mortalitu na 14 %, dávka 44 mg.kg⁻¹ na 22 %. Celkem 4 zvířata zemřela během operace, ne však následkem podaných látek.

Graf 5. Mortalita zvířat po aplikaci kontroly, ISO, D-PA a ISO+D-PA

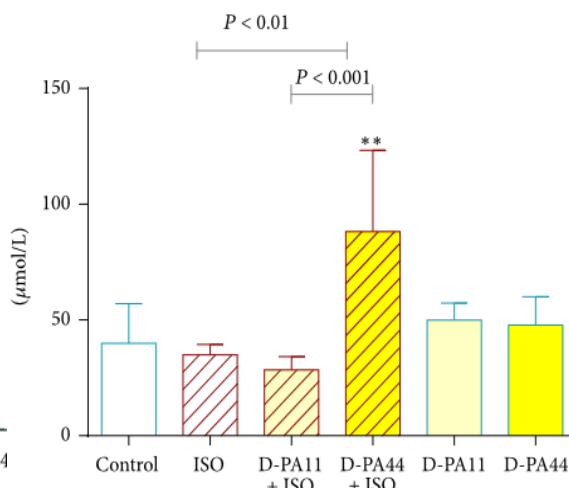
12.2.2.2 Hemodynamické parametry

Podání ISO zvířatům nezměnilo jejich tlak krve, avšak za 24 hodin po jeho administraci došlo ke zrychlení srdečního tepu a ke snížení systolického objemu a ejekční frakce. Sám D-PA neměl na tyto parametry žádný efekt, jako premedikace před podáním ISO dokázal ve své vyšší dávce zabránit poklesu systolického objemu. Ostatní hemodynamické parametry nevykazovaly žádné další signifikantní rozdíly.

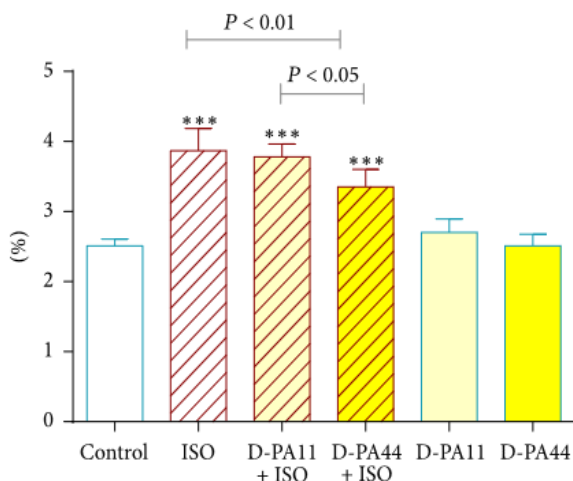
12.2.2.3 Biochemické markery a vlhká hmotnost komor



Graf 6. Hladiny cTnT po podání ISO, D-PA a jejich kombinací



Graf 7. Hladiny vitamínu C po podání ISO, D-PA a kombinací



Graf 8. Index vlhké hmotnosti komor po podání ISO, D-PA a kombinací

Vyšší dávka D-PA s ISO signifikantně zvýšila hladinu cTnT vzhledem ke kontrolním a ISO skupinám. Ve skupině D-PA11+ISO došlo k poklesu oproti ISO skupině, avšak tento rozdíl není signifikantní. Samotný ISO způsobil mírný pokles hladiny vitamínu C, vyšší dávka D-PA+ISO vedla ke značnému zvýšení jeho hladiny.

Aplikace ISO vedla ke zvýšení indexu vlhké hmotnosti komor, což vypovídá o přítomnosti edému v myokardu. Premedikace vyšší dávkou D-PA před podáním ISO vedla ke zlepšení průběhu edému, nižší dávka k tomu pouze směřovala.

13 Diskuze

Ischemická choroba srdeční je život ohrožující onemocnění, vznikají v důsledku poškození a ztráty viabilního myokardu vlivem ischemie. Nemocného pacienta s velmi typickými příznaky pro akutní infarkt myokardu je nezbytně nutné co nejdříve dopravit do nemocnice za účelem poskytnutí odborné lékařské péče. Série vyšetření a diagnostická kritéria, stručně popsána v této práci, poté diagnózu AIM potvrdí, v lepším případě vyvrátí. Za pomoci moderních léčebných metod a přístrojové techniky kardiologických jednotek jsou v dnešní době odborníci schopni dosáhnout 90-95 % úspěšnosti léčby, a to za použití nejobvyklejší z metod, tzv. PCI. I přesto však úmrtí na kardiovaskulární onemocnění představují 50-55 % z úmrtnosti celkové, přičemž zhruba polovinu z toho tvoří úmrtí z ICHS. Ročně na ICHS v České republice umírají 2-3 pacienti/1000 obyvatel a každoročně přibývá zhruba 5-10 případů/1000 obyvatel [9,1].

Z toho důvodu existuje již po několik let snaha o nalezení látek, ať už přírodních či semisyntetických, které by měly kardioprotektivní účinek a mohly by případnému infarktu myokardu zabránit nebo alespoň prokazatelně zlepšit jeho průběh a následky. Studium kardioprotektivity vybraných látek je realizováno jak na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, tak na celosvětové úrovni. Výzkumná skupina pod vedením Mladěny již v minulých letech provedla vyhodnocení účinku mnohých látek na uměle vyvolané poškození myokardu. Jednalo se například o přírodní látky, tzv. flavonoidy, konkrétně quercetin a rutin [28,49]. Stejnými flavonoidy se ve své diplomové práci zabýval také Hruška, který doplňuje výsledek výzkumné skupiny o detailnější histopatologickou analýzu [50]. Flavonoidy se zabývaly také mnohé zahraniční studie. Například Prince vyhodnotil míru kardioprotektivního účinku flavonoidu (-)epikatechinu na uměle navozené poškození myokardu [33].

Výzkumná skupina Kardiovaskulární a respirační farmakologie a toxikologie se v minulých letech zaměřila také na studium látek, schopných vázat železo. Jelikož jsou ionty železa důležitým katalyzátorem Fentonovy reakce, v jejímž důsledku vznikají při ischemii myokardu reaktivní kyslíkové formy trvale poškozující myokard, mohla by být přínosem pro zlepšení průběhu IM právě aplikace chelátorů železa. Ve svých pracích se výzkumný tým zaměřil na studium PCTH, dexrazoxanu a laktoferinu [44,45,51]. Také chelátory železa se zabývali mnozí zahraniční vědci. Chelátor železa deferoxamin se stal terčem zájmu pro Bolliho et al. či například Paraskevaidise et al. [41,42].

V ischemickém poškození myokardu, zprostředkovaném mimo jiné z velké části také vlivem ROS, hrají důležitou roli také ionty dalšího přechodného kovu – mědi. Chelátorům mědi byla doposud věnována pozornost jen minimálně a pouze studie Appelbauma et al. posuzuje vliv neocuproinu na izolovaná srdce potkana [46]. Z toho důvodu byl pro tuto diplomovou práci i studii výzkumné skupiny vybrán jako předmět zájmu chelátor mědi D-penicilamin, který je znám svými schopnostmi nespecificky vázat ionty mědi a je často využíván pro léčbu Wilsonovy choroby [36].

Ačkoliv v dnešní době existuje více modelů experimentálního poškození myokardu, pro studium kardioprotektivity různých látek je nejvíce vhodný právě model katecholaminový. Aplikace isoprenalinu představuje možnost, široce využívanou v oblasti vědeckého výzkumu, jak relativně snadno a levně navodit v srdci laboratorního zvířete stav, velmi podobný akutnímu infarktu u člověka. V histopatologickém obrazu srdce u skupin potkanů, jimž byla v našem experimentu podána subkutánně jednorázová dávka 100 mg.kg^{-1} isoprenalinu, bylo patrné markantní poškození. Jak v endokardu, tak i v myokardu a epikardu byly nalezeny středně významné změny, týkající se kapilární hyperémie, dilatace a edému intersticia, zduření pojivových vláken, nekrotických změn kardiomyocytů, fragmentace myofibril a svalových trámčů a přítomnosti žírných buněk či makrofágů. Mladěnka et al. (2009a) ve své studii popisuje mimo jiné histopatologický obraz myokardu potkana po 24 hodinách od podání jednorázové dávky 100 mg.kg^{-1} ISO. V jeho nálezu byla potvrzena přítomnost zánětlivého infiltrátu, edému intersticia a nekrotických změn kardiomyocytů s výraznou eosinofilií cytoplazmy [31]. Tento obraz se slučuje s obrazem myokardu skupiny potkanů, jimž byl v této práci podán pouze ISO. Kostinková ve své práci podrobně popsala časné histopatologické změny v myokardu potkanů, jimž byl podán ISO (dávka 100 mg.kg^{-1}), a to po 2 hodinách od jeho aplikace a výsledný obraz srovnala s obrazem kontrolní skupiny. Kostinková u ISO skupin upozorovala na rozšíření intersticia s edémem, zánětlivý infiltrát, překrvení cév, fragmentaci myofibril a buněk myokardu či mizení jader [52]. Tento nález je velmi podobný nálezu, patrnému u ISO skupiny v naší práci. Lobo Filho et al. ve svém experimentu podával potkanům isoprenalin subkutánně v dávce 150 mg.kg^{-1} , a to v intervalu 24 hodin ve dvou po sobě jdoucích dnech. Výsledkem byl nález středně těžkých až těžkých změn v histologii srdce potkana [29]. Stejně tak ve dvou dávkách a intervalu 24 hodin bylo 100 mg.kg^{-1} isoprenalinu podáno potkanům ve studii Princeho. Ten popsal změny v histologii srdce, týkající se projevů nekrózy, edému a přítomnosti zánětlivých buněk jako výrazné a vyjádřil je semikvantitativně pomocí

třech křížků (+++) [33]. To se shoduje se semikvantitativním hodnocením ISO skupin v naší práci. Zhang et al. ve své práci aplikoval potkanům jednorázovou dávku isoprenalinu, a to ve třech různých variantách (125, 250 a 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). V případě podání 250 a 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ byly po 3 hodinách od aplikace látky v histologickém obraze srdcí potkanů patrný hyperkontrakční proužky a nekrotické změny kardiomyocytů. V intervalu dalších 6, 12 a 24 hodin byly pozorovány změny na úrovni nekrózy kardiomyocytů, edému intersticia a mohutná infiltrace makrofágy. Současně bylo po 12 hodinách patrné malé množství kolagenu. Za 48 hodin od aplikace ISO (125 či 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) byla patrná mohutná kolagenní vlákna se zbytky nekrotických kardiomyocytů [30]. Uvedené experimentální studie se však od naší liší v podané dávce isoprenalinu a také v časovém intervalu pozorování případných změn. Právě tyto dva faktory jsou zásadní pro výslednou podobu histopatologického obrazu. V našem experimentu byla potkanům podána pouze jednorázová dávka 100 mg.kg^{-1} a po 24 hodinách od jejího podání byly pozorovány změny. Jelikož pozorovatelným změnám vévodí především masivní kulatobuněčná infiltrace, popřípadě výskyt makrofágů a žírných buněk, můžeme tento stav přirovnat k časně akutní fázi zánětlivé reakce myokardu. V důsledku krátkého časového intervalu totiž nedochází k plnému rozvinutí opravdového infarktu myokardu tak, jak ho známe u lidí a proto tento model infarkt pouze připomíná. Navíc není bráno v potaz stárnutí myokardu i organismu jako takového. Stárnutí myokardu mění stav prostředí extracelulární matrix a zhoršuje efektivitu remodelace po IM ve smyslu redukce tvorby kolagenní jizvy při hojení [53].

Histologický obraz srdce u skupin potkanů, jimž byl podán jenom samotný D-PA, ať už v koncentraci 11, nebo 44 mg.kg^{-1} , nejevil až na hyperémii kapilár žádné další změny. Překrvení cév mohlo být zapříčiněno invazivitou samotného podání dané látky.

Premedikace potkanů pomocí D-PA (11 a 44 mg.kg^{-1}) a následná aplikace ISO, vedla u obou použitých dávek k podobnému výsledku histologické analýzy. Většina uvedených změn, vznikajících vlivem isoprenalinu se po předchozí premedikaci tímto chelátorem mědi jevila jako mnohem mírnějšího rázu. Semikvantitativně byly tyto změny v myokardu a epikardu potkaních srdcí hodnoceny jako málo významné, snad jen v endokardu zůstaly přece jen více patrné (mírně významné). Jen co se týče infiltrace makrofágy a žírnými buňkami, zůstaly změny zřetelnější (mírně významné).

V in vitro testech jevil D-PA tendenci bránit poškození a buněčné smrti vyvolané podáním katecholaminů či blokovat Fentonovu reakci, avšak výsledný efekt závisel na

použité dávce. Byla potvrzena schopnost D-penicilaminu vázat a redukovat železo, avšak míra jeho aktivity závisela na vlastnostech okolního prostředí. V in vivo experimentu snížil D-PA mortalitu zvířat z 36 % na 14 % (11 mg.kg⁻¹) a 22 % (44 mg.kg⁻¹), z hemodynamických parametrů vedl pouze k zábraně poklesu systolického objemu. Vyšší dávka D-PA vedla ke snížení indexu vlhké hmotnosti komor a zlepšila tak probíhající edém, nižší dávka k tomu pouze směřovala. Naopak, co se týká cTnT, zatímco v případě nižší dávky došlo k poklesu hladiny uvolněného cTnT, vyšší dávka vedla k jeho značnému zvýšení. Samotný ISO způsobil mírný pokles hladiny vitamínu C, vyšší dávka D-PA+ISO vedla k opětovnému zvýšení jeho hladiny. Výsledky provedených in vivo i in vitro testů jsou tak oproti histologické analýze, která ve výsledku potvrdila pozitivní efekt D-PA na katecholaminy indukované poškození myokardu potkana, spíše nejednoznačné.

14 Závěr

Za pomoci podrobné histologické analýzy včetně semikvantitativního hodnocení nálezu byly potvrzeny negativní účinky isoprenalinu podaného v jednorázové dávce 100 mg.kg^{-1} . Změny v histologii potkaního srdce byly pozorované po uplynutí intervalu 24 hodin a byly porovnány s obrazem kontrolních skupin. Svým rázem připomínaly akutní infarkt myokardu. Jak v endokardu, tak i v myokardu a epikardu byly přítomny středně významné změny, týkající se kapilární hyperémie, dilatace a edému intersticiálních prostorů, zduření pojivových vláken, nekrotických změn kardiomyocytů, fragmentace myofibril a svalových trámců a přítomnosti makrofágů či žírných buněk.

Histopatologický obraz skupin potkanů, jimž byl podán pouze samotný D-PA, a to v dávkách 11 a 44 mg.kg^{-1} , nejevil až na překrvení kapilár žádné morfologické změny.

Premedikace pomocí D-PA (11 a 44 mg.kg^{-1}) podaná před aplikací ISO, vedla u obou dávek k podobnému výsledku, jímž je zlepšení uvedených morfologických změn, vyvolaných právě účinky ISO. Co se týká epikardu a myokardu, byly změny týkající se kapilární hyperémie, dilatace a edému intersticia, zduření pojivových vláken, nekrotických změn kardiomyocytů či fragmentace myofibril a svalových trámců jen málo významné. Snad jen v endokardu zůstaly uvedené změny poněkud výraznější a byly hodnoceny jako mírně významné. Zánětlivá infiltrace makrofágy a žírnými buňkami přetrvala v endokardu, myokardu i epikardu mírně významná.

Pro lepší přehlednost jsou souhrnné výsledky semikvantitativního hodnocení histopatologických změn uvedeny v tabulce 10.

Byly provedeny také in vitro testy, ve kterých jevil D-PA tendenci bránit poškození a buněčné smrti vyvolané podáním katecholaminů či blokovat Fentonovu reakci, avšak výsledek závisel na dávce. Také schopnost D-penicilaminu vázat a redukovat železo závisela na vlastnostech okolního prostředí. V in vivo experimentu snížila premedikace pomocí D-PA mortalitu zvířat, co se týká hemodynamiky, vedla pouze k zábraně poklesu systolického objemu. Vyšší dávka vedla ke snížení indexu vlhké hmotnosti komor a zlepšila tak probíhající edém, nižší dávka k tomu pouze směřovala. Zatímco v případě nižší dávky došlo k poklesu hladiny uvolněného cTnT, vyšší dávka naopak vedla k signifikantnímu zvýšení. Vyšší dávka D-PA vedla ke zvýšení hladiny vitamínu C, původně snížené vlivem ISO.

Výsledky provedených in vivo i in vitro funkčních testů spíše předpokládají, že podání D-PA nemá výrazný protektivní vliv na modelové poškození myokardu potkana indukované katecholaminy.

Oproti tomu histopatologický obraz zmírnění rozsahu alterací v myokardech potkanů, kterým byl D-PA aplikován ve výše zmíněných koncentracích, přesvědčivě dokládá jeho pozitivní působení.

15 Seznam použitých zkratek

AIM	akutní infarkt myokardu
AKS	akutní koronární syndrom
ANOVA	analýza rozptylu
ANP	síňový natriuretický peptid
AST	aspartátaminotransferáza
ATP	adenosintrifosfát
AV uzel	atrioventrikulární uzel
BLRT	blokáda levého Tawarova raménka
BNP	mozkový natriuretický peptid
CA	katecholamin
CABG	aortokoronární bypass
CD	diferenciační skupina
CK	kreatinkináza
CK-MB	kreatinkináza s podjednotkami M a B
CRP	C-reaktivní protein
cTn	srdeční troponin
cTnC	srdeční troponin C
cTnI	srdeční troponin I
cTnT	srdeční troponin T
DAMP	s nebezpečím asociované molekulární vzory
DEF	deferoxamin
DMEM	Dulbeccoem modifikované Eaglovo médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleová
D-PA	D-penicilamin
EKG	elektrokardiografie
ELISA	z anglického <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> , enzymově značený imunotest s využitím pevné fáze
EPI	epinefrin
GDF-15	růstový diferenciační faktor 15
GPx	glutathionperoxidáza
GSH	glutathion

H-E	Hematoxylin-eosin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
H-FABP	srdeční typ proteinu vázajícího mastné kyseliny
HMGB1	z anglického <i>High mobility group box-1</i>
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
hs	vysoce senzitivní
HSP	protein teplotního šoku
i.v.	intravenózně
I/R poškození	ischemicko-reperfuzní poškození
ICAM	intercelulární adhezivní molekula
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL	interleukin
IL-1R	interleukin-1 receptor
IM	infarkt myokardu
IMA	ischemií modifikovaný albumin
ISO	isoprenalin
LFA1	z anglického <i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
Mac1	z anglického <i>Macrophage-1 antigen</i>
MAP kináza	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MMP	matrixové metaloproteinázy
MMP-1	intersticiální kolagenáza
MPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti
NAD	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NF-κB	nukleární faktor κB
NIH	Národní instituce zdraví
NLR	z anglického <i>Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor</i> , „receptory podobné NOD“
Nr4a1	jaderný receptor podrodiny 4, skupiny a, člen 1
NSTEMI	infarkt myokardu bez elevace úseku ST
NT-proBNP	N-terminální fragment proBNP
oxCA	oxidovaný katecholamin
PAF	faktor aktivující destičky
PCI	perkutánní koronární intervence

PCTH	2-pyridylkarboxaldehyd-2-thiofenkarboxylhydrazon
PDGF	destičkový růstový faktor
PE	polyethylen
PECAM-1	destičková endotelová adhezní molekula 1
PK	periferní krev
PIGF	placentární růstový faktor
PRR	receptory rozeznávající molekulové vzory
RAGE	receptor pro konečné produkty pokročilé glykace
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní kyslíkové formy
s.c.	subkutánně
SCD40L	solubilní ligand CD40
SD	směrodatná odchylka
SOD	superoxiddismutáza
STEMI	infarkt myokardu s elevací úseku ST
TGF-β	transformující růstový faktor β
TIMP	tkáňový inhibitor metaloproteináz
TLR	z anglického <i>Toll-like receptor</i> , „receptory podobné Toll“
TNF	tumory nekrotizující faktor
URL	horní referenční limit
VCAM	vaskulární adhezivní molekula
VEGF	vaskulární endoteliální faktor
α-SMA	α -hladkosvalový aktin

16 Seznam tabulek

Tabulka 1. Časový sled patologií při AIM

Tabulka 2. Kritéria pro definici akutního infarktu myokardu

Tabulka 3. Kritéria pro definici překonaného infarktu myokardu

Tabulka 4. Postup při zalévání fixovaného materiálu

Tabulka 5. Postup při odparafinování bločku

Tabulka 6. Složení roztoku hematoxylinu

Tabulka 7. Postup při barvení metodou H-E

Tabulka 8. Příprava roztoku Goldner I

Tabulka 9. Příprava roztoku Goldner III

Tabulka 10. Semikvantitativní hodnocení změn v srdci potkana

17 Seznam grafů

Graf 1. Životnost buněk po aplikaci D-PA, katecholaminů a jejich oxidačních produktů

Graf 2. Míra chelatační aktivity D-PA pro železo

Graf 3. Míra redukce železa pomocí D-PA

Graf 4. Vliv D-PA na produkci hydroxylových radikálů

Graf 5. Mortalita zvířat po aplikaci kontroly, ISO, D-PA a ISO+D-PA

Graf 6. Hladiny cTnT po podání ISO, D-PA a jejich kombinací

Graf 7. Hladiny vitamínu C po podání ISO, D-PA a kombinací

Graf 8. Index vlhké hmotnosti komor po podání ISO, D-PA a kombinací

18 Seznam obrázků

Obrázek 1. Zánětlivá reakce po ischemii myokardu

Obrázek 2. Strukturní vzorec isoprenalinu

Obrázek 3. Strukturní vzorec D-penicilaminu

Obrázek 4. Přehled protokolů buněčného experimentu

Obrázek 5. Myokard (kontrolní skupina), barvení H-E, zv. 200×

Obrázek 6. Endokard, myokard a epikard (D-PA11), barvení zelený trichrom, zv. 40×

Obrázek 7. Endokard a papilární svaly (D-PA44), barvení H-E, zv. 100×

Obrázek 8. Myokard (ISO), barvení H-E, zv. 200×

Obrázek 9. Epikard (ISO), barvení H-E, zv. 100×

Obrázek 10. Endokard (ISO), barvení H-E, zv. 200×

Obrázek 11. Myokard a endokard (D-PA11+ISO), barvení H-E, zv. 400×

Obrázek 12. Myokard (D-PA11+ISO), barvení H-E, zv. 40×

Obrázek 13. Žírné buňky v myokardu (D-PA11+ISO), barvení H-E, zv. 200×

Obrázek 14. Endokard a myokard (D-PA44+ISO), barvení H-E, zv. 40×

Obrázek 15. Endokard a myokard (D-PA44+ISO), barvení H-E, zv. 100×

Obrázek 16. Endokard (D-PA44+ISO), barvení H-E, zv. 200×

19 Seznam použité literatury

1. ŠPINAR, J. Budeme umírat na infarkt myokardu i ve 21. století? *Medicína pro praxi* [online]. 2007, 4, 11, [cit. 2017-11-22], s. 439. Dostupné z: <https://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2007/11/01.pdf>
2. KÖLBEL, F. et al. *Praktická kardiologie*. Praha, Karolinum, 2012, 308 s. ISBN 978-80-246-1962-0
3. SILBERNAGL, S.; LANG, F. *Atlas patofyziologie*. Praha, Grada, 2012, 416 s. ISBN 978-80-247-3555-9
4. NAVRÁTIL, L. et al. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha, Grada, 2008, 424 s. ISBN 978-802-4723-198
5. VOJÁČEK, J. et al. *Klinická kardiologie*. Praha, Nucleus HK, 2012, 1134 s. ISBN 978-80-87009-89-5
6. ŠTEINER, I. *Kardiopatologie: pro patology i kardiology*. Praha, Galén, 2010, 124 s. ISBN 978-80-7262-672-4
7. HORKÝ, D.; ČECH, S. *Mikroskopická anatomie*. Brno, Vydavatelství MU, 2003, 353 s. ISBN 80-210-2208-6
8. ČECH, S.; HORKÝ, D. *Přehled obecné histologie*. Brno, Vydavatelství MU, 2005, 140 s. ISBN 80-210-3854-3
9. ŠTEJFA, M. et al. *Kardiologie*. Praha, Grada, 2007, 722 s. ISBN 978-80-247-1385-4
10. MAČÁK, J.; MAČÁKOVÁ, J.; DVOŘÁČKOVÁ, J. *Patologie*. Praha, Grada, 2012, 346 s. ISBN 978-80-247-3530-6
11. HAUSENLOY, D. J.; YELLON, D. M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 2013, 123, 1, [cit. 2018-01-25], s. 92-100. DOI: 10.1172/JCI62874. ISSN 0021-9738. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/62874>
12. FRANK, A. et al. Myocardial Ischemia Reperfusion Injury. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* [online]. 2012, 16, 3, [cit. 2018-01-25], s. 123-132. DOI: 10.1177/1089253211436350. ISSN 1089-2532. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1089253211436350>

13. LEJAY, A. et al. Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [online]. 2016, 91, [cit. 2018-01-25], s. 11-22. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.12.020. ISSN 00222828. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022282815301589>
14. COLLARD, CH. D.; GELMAN, S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology* [online]. 2001, 94, [cit. 2018-01-25], s. 1133-1138. Dostupné z: <http://anesthesiology.pubs.asahq.org/Article.aspx?articleid=1944870>
15. VAN ZUYLEN, V. - L. et al. Post-myocardial Infarct Inflammation and the Potential Role of Cell Therapy. *Cardiovascular Drugs and Therapy* [online]. 2015, 29, 1, [cit. 2018-03-02], s. 59-73. DOI: 10.1007/s10557-014-6568-z. ISSN 0920-3206. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10557-014-6568-z>
16. PRABHU, S. D.; FRANGOIANNIS, N. G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Circulation Research* [online]. 2016, 119, 1, [cit. 2018-03-02], s. 91-112. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303577. ISSN 0009-7330. Dostupné z: <http://circres.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>
17. FRANGOIANNIS, N. G. The inflammatory response in myocardial injury, repair and remodelling. *Nature Reviews Cardiology* [online]. 2014, 11, 5, [cit. 2018-03-02], s. 255-265. DOI: 10.1038/nrcardio.2014.28. ISSN 1759-5002. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrcardio.2014.28>
18. SAXENA, A.; RUSSO, I.; FRANGOIANNIS, N. G. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Translational Research* [online]. 2016, 167, 1, [cit. 2018-03-02], s. 152-166. DOI: 10.1016/j.trsl.2015.07.002. ISSN 19315244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524415002418>
19. SUN, Y. et al. Cardiac remodeling by fibrous tissue after infarction in rats. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* [online]. 2000, 135, 4, [cit. 2018-03-15], s. 316-323. DOI: 10.1067/mlc.2000.105971. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022214300577427>
20. KUMAR, V. et al. *Robbins basic pathology*. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2007, 960 s. ISBN 14-160-2973-7

21. BISHOP, J. et al. Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [online]. 1990, 22, 10, [cit. 2018-02-26], s. 1157-1165. DOI: 10.1016/0022-2828(90)90079-H. ISSN 00222828. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002228289090079H>
22. VOJÁČEK, J.; JANSKÝ, P.; JANOTA, T. Third universal definition of myocardial infarction. *Cor et Vasa* [online]. 2013, 55, 3, [cit. 2017-11-01], s. e228-e235. DOI: 10.1016/j.crvasa.2012.12.004. ISSN 00108650. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0010865012001518>
23. O'ROURKE, R. A. et al. *Kardiologie: Hurstův manuál pro praxi*. Praha, Grada, 2010, 767 s. ISBN 978-80-247-3175-9
24. MOŤOVSKÁ, Z. et al. *Novinky v akutní kardiologii*. Praha, Mladá fronta, 2016, 384 s. ISBN 978-80-204-3903-1
25. KEHL, D. W. et al. Biomarkers in acute myocardial injury. *Translational Research* [online]. 2012, 159, 4, [cit. 2017-12-20], s. 252-264. DOI: 10.1016/j.trsl.2011.11.002. ISSN 19315244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931524411003860>
26. MLADĚNKA, P. et al. Comprehensive review of cardiovascular toxicity of drugs and related agents. *Medicinal Research Reviews* [online]. 2018, [cit. 2018-02-12] s. 1-72. DOI: 10.1002/med.21476. ISSN 01986325. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/med.21476>
27. National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Database; CID=3779* [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3779>
28. ŘÍHA, M. et al. Oral administration of quercetin is unable to protect against isoproterenol cardiotoxicity. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* [online]. 2014, 387, 9, [cit. 2018-02-12], s. 823-835. DOI: 10.1007/s00210-014-0995-z. ISSN 0028-1298. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00210-014-0995-z>
29. LOBO FILHO, H. G. et al. Experimental model of myocardial infarction induced by isoproterenol in rats. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* [online]. 2011, 26, 3, [cit. 2018-02-12], s. 469-476. DOI: 10.5935/1678-9741.20110024. ISSN 0102-7638. Dostupné z: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1678-9741.20110024>

30. ZHANG, J. et al. Isoproterenol-induced Cardiotoxicity in Sprague-Dawley Rats: Correlation of Reversible and Irreversible Myocardial Injury with Release of Cardiac Troponin T and Roles of iNOS in Myocardial Injury. *Toxicologic Pathology* [online]. 2008, 36, 2, [cit. 2018-02-12], s. 277-278. DOI: 10.1177/0192623307313010. ISSN 0192-6233. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623307313010>
31. MLADĚNKA, P. et al. Cardiac biomarkers in a model of acute catecholamine cardiotoxicity [online]. *Human and Experimental Toxicology*. 2009a, 28, 10, [cit. 2018-02-12], s. 631-640. DOI: 10.1177/0960327109350665. ISSN 0960-3271. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0960327109350665>
32. MEERAN MEERAN. M. F.; JAGADEESH, G. S.; SELVARAJ, P. Synthetic catecholamine triggers β 1-adrenergic receptor activation and stimulates cardiotoxicity via oxidative stress mediated apoptotic cell death in rats: Abrogating action of thymol. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2016, 251, [cit. 2018-02-12], s. 17-25. DOI: 10.1016/j.cbi.2016.03.017. ISSN 00092797. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279716300874>
33. PRINCE, P. S. M. A biochemical, electrocardiographic, electrophoretic, histopathological and in vitro study on the protective effects of (-)epicatechin in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2011, 671, 1-3, [cit. 2018-03-15], s. 95-101. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.09.036. ISSN 00142999. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299911010004>
34. ŘÍHA, M. et al. Protective Effects of D-Penicillamine on Catecholamine-Induced Myocardial Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2016, 2016, [cit. 2018-02-15], s. 1-10. DOI: 10.1155/2016/5213532. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/5213532/>
35. National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Database*; CID=5852 [cit. 2018-02-15]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5852>

36. HUANG, L. et al. Metal Element Excretion in 24-h Urine in Patients with Wilson Disease under Treatment of d-Penicillamine. *Biological Trace Element Research* [online]. 2012, 146, 2, [cit. 2018-02-15], s. 154-159. DOI: 10.1007/s12011-011-9250-3. ISSN 0163-4984. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12011-011-9250-3>
37. JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* [online]. 2011, 283, 2-3, [cit. 2018-02-21], s. 65-87. DOI: 10.1016/j.tox.2011.03.001. ISSN 0300483X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X11000886>
38. CHEVION, M. et al. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1993, 90, 3, [cit. 2018-02-21], s. 1102–1106. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC45819/pdf/pnas01101-0328.pdf>
39. CHEN, A.; LI, G.; LIU, Y. Association between copper levels and myocardial infarction: a meta-analysis. *Inhalation Toxicology* [online]. 2015, 27, 5, [cit. 2018-02-21], s. 237-246. DOI: 10.3109/08958378.2015.1030480. ISSN 0895-8378. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08958378.2015.1030480>
40. GRAMMER, T. B. et al. Copper, ceruloplasmin, and long-term cardiovascular and total mortality (The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study). *Free Radical Research* [online]. 2014, 48, 6, [cit. 2018-02-21], s. 706-715. DOI: 10.3109/10715762.2014.901510. ISSN 1071-5762. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10715762.2014.901510>
41. BOLLI, R. et al. The iron chelator desferrioxamine attenuates postischemic ventricular dysfunction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* [online]. 1987, 253, 6, [cit. 2018-02-21], s. H1372-H1380. DOI: 10.1152/ajpheart.1987.253.6.H1372. ISSN 0363-6135. Dostupné z: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.1987.253.6.H1372>

42. PARASKEVAIDIS, I. A. et al. Deferoxamine infusion during coronary artery bypass grafting ameliorates lipid peroxidation and protects the myocardium against reperfusion injury: immediate and long-term significance. *European Heart Journal* [online]. 2005, 26, 3, [cit. 2018-02-21], s. 263-270. DOI: 10.1093/eurheartj/ehi028. ISSN 1522-9645. Dostupné z: <http://academic.oup.com/eurheartj/article/26/3/263/487143/Deferoxamine-infusion-during-coronary-artery>
43. TANG, W. H. et al. Polyol pathway mediates iron-induced oxidative injury in ischemic–reperfused rat heart. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2008, 45, 5, [cit. 2018-02-21], s. 602-610. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.003. ISSN 08915849. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584908002785>
44. MLADĚNKA, P. et al. The Novel Iron Chelator, 2-Pyridylcarboxaldehyde 2-Thiophenecarboxyl Hydrazone, Reduces Catecholamine-Mediated Myocardial Toxicity. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2009b, 22, 1, 217 [cit. 2018-02-21], s. 208-. DOI: 10.1021/tx800331j. ISSN 0893-228X. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx800331j>
45. ZATLOUKALOVÁ, L. et al. Dexrazoxane provided moderate protection in a catecholamine model of severe cardiotoxicity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* [online]. 2012, 90, 4, [cit. 2018-02-21], s. 473-484. DOI: 10.1139/y2012-009. ISSN 0008-4212. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/y2012-009>
46. APPELBAUM, Y. J. et al. The protective role of neocuproine against cardiac damage in isolated perfused rat hearts. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 1990, 8, 2, [cit. 2018-02-21], s. 133-143. DOI: 10.1016/0891-5849(90)90086-X. ISSN 08915849. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/089158499090086X>
47. ŠEBESTOVÁ, R. *Histologické návody a praktická cvičení studijního oboru „Zdravotní laborant ZDRL“*. Brno, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Ústav histologie a embryologie, 2007, 71 s.
48. DVOŘÁK, K. et al. *Základy histopatologických vyšetřovacích metod*. Brno, 2008. 119 s. Dostupné z: <http://atlases.muni.cz/atlases/stud/pdf/histmet.pdf>

49. MLADĚNKA, P. et al. Direct administration of rutin does not protect against catecholamine cardiotoxicity. *Toxicology* [online]. 2009c, 255, 1-2, [cit. 2018-04-15], s. 25-32. DOI: 10.1016/j.tox.2008.09.027. ISSN 0300483X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X08004642>
50. HRUŠKA, P. Ovlivnění časně fáze ischemického poškození myokardu potkana vybranými flavonoidy. [Influencing the early phase of ischemic injury of rat myocardium selected flavonoids] [diplomová práce]. Hradec Králové (Česká republika): Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015 [cit. 2018-04-15]
51. MLADĚNKA, P. et al. The effects of lactoferrin in a rat model of catecholamine cardiotoxicity. *BioMetals* [online]. 2009d, 22, 2, [cit. 2018-04-15], s. 353-361. DOI: 10.1007/s10534-008-9172-5. ISSN 0966-0844. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10534-008-9172-5>
52. KOSTINKOVÁ, V. Patofyziologické hodnoty myokardu potkana po akutní expozici isoprenalinu. [Patophysiological values of rat myocardium after acute exposition of isoprenaline] [diplomová práce]. Hradec Králové (Česká republika): Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2011 [cit. 2018-04-15]
53. MESCHIARI, C. A. et al. The impact of aging on cardiac extracellular matrix. *GeroScience* [online]. 2017, 39, 1, [cit. 2018-04-15], s. 7-18. DOI: 10.1007/s11357-017-9959-9. ISSN 2509-2715. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11357-017-9959-9>