

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**VLIV SUNITINIBU NA EXPRESI P-SELEKTINU U  
NORMOTENZNÍCH A HYPERTENZNÍCH POTKANŮ**

EFFECT OF SUNITINIB ON THE EXPRESSION OF P-SELECTIN  
IN NORMOTENSIVE AND HYPERTENSIVE RATS

Rigorózní práce

Studijní obor: Farmakologie a toxikologie

Vedoucí rigorózní práce: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Kateřina Šumberová

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

*datum*

*podpis*

### *PODĚKOVÁNÍ*

*Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své rigorózní práce Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. a také konzultující PhDr. Zdeňce Kudláčkové, Ph. D. za cenné rady a čas věnovaný radám a úpravám této rigorózní práce.*

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Kateřina Šumberová

Konzultant: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Název rigorózní práce: Vliv sunitinibu na expresi P-selektinu u normotenzních a hypertenzních potkanů

**Cíl:** Cílem této práce bylo stanovení exprese P-selektinu jako možného prediktivního markeru probíhající endoteliální dysfunkce vedoucí k arteriální hypertenzi v aortě u SHR potkanů a současně u WKY potkanů po podávání léčiva sunitinibu.

**Metody:** Použili jsme inbrední samce SHR a WKY potkanů, každá ze skupin byla rozdělena na dvě podskupiny, z nichž jedné se podávalo léčivo sunitinib a druhé kontrolní skupině placebo - voda. Schéma podávání sunitinibu u skupiny SHR potkanů bylo 8 týdnů sunitinib - 5 dnů pauza - 8 týdnů podávání. Vzhledem k incidenci toxicity, byla u kmene WKY potkanů poslední fáze podávání sunitinibu zkrácena na 2 týdny. Byla použita imunohistochemická analýza odebraných aort metodou ABC s detekcí pomocí DAB jako chromogenu.

**Výsledky:** V rámci imunohistochemické analýzy nebyla prokázána očekávaná exprese P-selektinu ani u jedné ze 4 skupin zvířat. Nebyly nalezeny žádné významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami zvířat – exprese P-selektinu nebyla detekována ani u SHR kmene ani u WKY kmene.

**Závěr:** Neprokázali jsme expresi P-selektinu v endotelu aorty. U použitých potkanů pravděpodobně neprobíhaly zánětlivé aterosklerotické změny ani po podání sunitinibu ani po podání placebo. Zánětlivé změny cévního endotelu však nemůžeme na základě nepřítomnosti pozitivní reakce při použití této imunohistochemické metody vyloučit. Nicméně vaskulární toxicita sunitinibu musí být ověřena testováním dalších markerů endoteliální dysfunkce.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** Hypertenze, P-selektin, sunitinib

# Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Mgr. Kateřina Šumberová

Consultant: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Title of Thesis: Effect of sunitinib on the expression of P-selectin in normotensive and hypertensive rats

**Background:** The objective of this thesis was to prove the P-selectin expression as a potential predictive marker of ongoing endothelial dysfunction. The experiments based on the application of cytostatic sunitinib were carried out on the aorta of spontaneously hypertensive rats (SHR) as well as normotensive rats (WKY).

**Methods:** Two groups of rats were subject of testing in this experiment - male SHR and WKY rats – both groups were divided into two subgroups. While the first subgroup of rats was fed by sunitinib from the beginning of the experiment, the second subgroup (a control group) was fed by placebo. The scheme of application of sunitinib to the SHR strain consisted of 8 weeks of application - 5 days without application - 8 weeks of application. In the case of WKY rats, the last stage of the scheme was shortened due to toxicity, thus 8 weeks of application - 5 days without application - 2 weeks of application. We applied immunohistological analysis ABC of the aortic endothels using DAB as a chromogen.

**Results:** Expression of P-selectin was not proven in endothelium cells of both types of animals. There were no significant differences between these 2 groups of animals; P-selectin was detected neither in SHR nor in WKY strain.

**Conclusions:** The experiment did not prove any significant increase of P-selectin expression in aortic endothel of the rats as a reaction to application of sunitinib. Probably the inflammatory atherosclerotic changes did not occur in endothelium cells of tested rats neither after administration of sunitinib nor after administration of placebo. The occurrence of inflammatory atherosclerotic changes in vessels can not be excluded. Sunitinib certainly affects the vascular endothelium. Further experiments have to be carried out for proving its vascular toxicity by testing other markers of endothelial dysfunction.

**KEYWORDS:** Hypertension, P-selectin, sunitinib

# Obsah

1	Úvod.....	8
2	Cévní systém.....	9
2.1	Funkční morfologie cév .....	9
2.1.1	Artérie.....	10
2.1.2	Kapiláry .....	12
2.1.3	Vény .....	12
3	Hypertenze .....	14
3.1	Prevalence .....	15
3.2	Klasifikace.....	16
3.2.1	Etiopatogenetická klasifikace .....	16
3.2.2	Klasifikace dle funkčních a morfologických změn.....	16
3.2.3	Prognóza arteriální hypertenze .....	17
3.3	Etiologie a patogeneze .....	21
3.3.1	Genetický základ hypertenze.....	22
3.3.2	Exogenní faktory .....	23
3.3.3	Endogenní faktory .....	25
3.4	Kardiotoxicita - nežádoucí účinek onkologické léčby .....	26
3.5	Experimentální modely hypertenze.....	27
4	Endoteliální dysfunkce .....	29
4.1	Funkční význam endotelu cév.....	30
4.1.1	Vazoregulace .....	31
4.1.2	Angiogeneze a reparační procesy .....	32
4.1.3	Zánět a aterogeneze .....	33
5	Adhezivní molekuly.....	34
5.1	Funkce .....	34
5.1.1	Integriny .....	34
5.1.2	Nadrodina imunoglobulinů.....	36
5.1.3	Cadheriny .....	37
5.1.4	Selektiny .....	38
5.1.5	VCAM-1.....	40
5.1.6	Význam adhezivních molekul u kardiovaskulárních onemocnění ....	40

6	Sunitinib.....	42
6.1	Struktura.....	42
6.2	Mechanismus účinku.....	42
6.2.1	Ovlivnění angiogeneze .....	45
6.3	Schválené indikace.....	46
6.4	Nežádoucí účinky.....	47
6.4.1	Hypertenze a kardiovaskulární příhody.....	48
7	Experimentální část.....	51
7.1	Materiál a metody .....	51
7.1.1	Experimentální kmeny zvířat .....	51
7.1.2	Imunohistochemie .....	51
7.1.3	Pomůcky a přístroje.....	52
7.1.4	Roztoky a činidla.....	52
7.1.5	Experimentální model .....	53
7.1.6	Pracovní postup – Metodika ABC.....	53
7.2	Výsledky .....	56
8	Diskuze .....	64
9	Závěr .....	66
10	Literatura.....	67
11	Seznam použitých zkratk .....	72

# 1 Úvod

Sunitinib je cytotoxická látka, multikinázový inhibitor používaný k léčbě metastatického renálního adenokarcinomu, gastrointestinálního stromálního tumoru (GIST) a neuroendokrinního nádoru pankreatu (*Brančíková, Adámková Krákorová, 2008*). Kardiotoxicita se po podávání sunitinibu projevuje především poklesem ejekční frakce levé komory se známkami levostranného srdečního selhání, prodloužením QT intervalu. Vzhledem k nepatrné regenerační schopnosti myokardu, patří jeho poškození k nejobávanějším nežádoucím účinkům onkologické léčby (*Kollmannsberger, Soulieres, 2007*).

Předmětem naší práce bylo prokázání toxicity sunitinibu projevující se poškozením cévního endotelu. Tuto otázku jsme řešili na modelu spontánně hypertenzních potkanů (SHR kmen) a na modelu Wistar Kyoto potkanů (WKY). Za marker endoteliální dysfunkce jsme zvolili P-selektin. K detekci předpokládané zvýšené exprese P-selektinu jsme použili nepřímé imunohistochemické metody (imunoperoxidázovou techniku za použití diaminobenzidinu jako chromogenu).

P-selektin patří mezi adhezivní molekuly, které jsou velmi důležité pro optimální vývoj kardiovaskulárního systému. Zároveň se jeho vyšší sérové hladiny nacházejí v ateroskleroticky změněných cévách (*Blankenberg, 2003; Krieglstein, Granger, 2001; Merten, Thiagarajan, 2004*).



## 2 Cévní systém

Cévy jsou součástí kardiovaskulárního a lymfatického systému. Krevní cévy zabezpečují dostatečné zásobení tkání kyslíkem a živinami, zajišťují průtok krve organismem. Krevní cévy podle struktury a funkce rozlišujeme artérie, vény a kapiláry (Paulsen, 2004).

### 2.1 Funkční morfologie cév

Složení cévní stěny bývá přizpůsobeno její funkci a mezi jednotlivými typy jsou značné rozdíly. Poměr jednotlivých složek cévní stěny se pak liší podle typu. Obecně rozeznáváme 3 vrstvy cévní stěny:

*Tunica externa (adventitia)* tvoří zevní vrstvu cévy, je tvořena adventicií a zevní elastickou membránou oddělující adventicii od tunica media. Je tvořena fibroblasty a kolagenním vazivem (typ I), elastickými vlákny. Tato vrstva také obsahuje vasa vasorum (drobné cévy zajišťující výživu velkých tepen, které potřebují pro svou stěnu, obsahující mimo jiné značné množství svaloviny, speciální přísun krve). Tyto cévy vyživují kromě adventicie také tunicu medii. Inervaci zajišťují autonomní nervová vlákna (Konrádová, Uhlík, 2000).

*Tunica media* je střední vrstva, formována je hladkosvalovými buňkami, kolagenními a elastickými vlákny. Mezibuněčná hmota je zde tvořena glykosaminoglykany, chondroitin sulfátem a proteoglykany. Kontrakce hladkosvalových buněk jsou tonického charakteru. Aktivovány jsou kalciumem. Výsledkem bývá vazokonstrikce. Elastická vlákna tvoří fenestrovanou síť, což umožňuje pronikání živin hlouběji do cévní stěny. Elastické struktury se mohou koncentrovat na rozhraní tunica media, kde vytvářejí membrana elastica interna a membrana elastica externa, které oddělují střední vrstvu od adventicie (Konrádová, Uhlík, 2000).

*Tunica interna* je tvořena vrstvou endoteliálních buněk a subendotelovou vazivovou tkání. Ta je tvořena řídkým kolagenním vazivem a může obsahovat i hladkosvalové buňky. Endotel tvoří bariéru mezi krví a vnitřním povrchem cévy, je tvořen jednovrstevným dlaždicovým epitelem. Epitel se liší podle typu tkáně – od

těsných spojů v mozku až po rozsáhlé fenestrace v kapilárách glomerulu. Z plochého povrchu prominuje do lumén cévy jen buněčné jádro. Mechanickou odolnost endoteliální výstelky vzhledem k jejímu napínání zabezpečují těsné mezibuněčné spoje typu zonulae occludentes a desmozomy. Mezibuněčné spoje endotelu jsou více vyvinuty v arteriích než ve vénách, nejtěsnější jsou v arteriolách. Charakteristickou strukturou endoteliálních buněk jsou inkluze tyčinkovitého tvaru, tzv. Weibel-Paladeho tělíška, obsahující von Willebrandův faktor - glykoprotein, aktivující agregaci destiček při poranění cévní stěny. Nápadným rysem cytoplazmatické membrány je přítomnost tzv. caveolae při povrchu. Uvnitř cytoplazmy nalézáme velké množství váčků. Většina těchto vkleslin – caveolae a váčků slouží k transendotelovému transportu látek. Počet těchto vezikul je odrazem intenzity transportu makromolekul endotelovou buňkou. Mohou zaujímat až třetinu buněčného objemu, jsou schopny spojovat se v kanálky procházející napříč buňkou, zprostředkovávají komunikaci mezi lumenálním a ablumenálním povrchem endotelu (*Konrádová, Uhlík, 2000*).

### 2.1.1 Artérie

V artériích je tunica intima od tunica media oddělená fenestrovanou vrstvou elastinu (tzv. membrana elastica interna).

Artérie a vény se liší jak svojí funkcí, tak stavbou (*viz. obrázek 1*). Artérie mají oproti vénám odpovídajícího rozměru silnější vrstvu tunica media. Svalovina artérie obsahuje navíc elastická vlákna a elastickou pojivovou tkáň. Tepny dělíme na základě jejich průměru a histologického uspořádání cévní stěny na arterioly, artérie svalového typu (a. malého a středního průměru) a artérie elastického typu (a. velkého průměru) (*3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy: Histologie pro bakalářské studium*). Nejsilnější částí arteriální stěny je tunica media, která se skládá z hladké svaloviny ohraničené směrem k intimě membrána elastica interna. Membrana elastica externa ji ohraničuje zevně směrem k tunica externa. Toto uspořádání je typické pro svalové artérie. Arterie elastického typu mají v tunica media systém koncentricky uspořádaných elastických membrán oddělených hladkými svalovými buňkami (*Konrádová, Uhlík, 2000; Mescher, 2010; Trojan, 1994*).

### **2.1.1.1 Arterioly**

Arterioly jsou cévy s průměrem menším než 0,5 mm. Mají velmi tlustou stěnu. Tunica intima je tvořena vrstvou endotelových buněk, tenkou vrstvou subendotelových buněk, membrána elastica interna v menších arteriolách chybí. Tunica media se skládá z 1 - 5 vrstev hladkých svalových buněk, které obkružují cévní lumen. Tunica adventitia je velmi tenká, skládá se z kolagenních vláken (Konrádová, Uhlík, 2000; Martínek, Vacek, 2009; Mescher, 2010).

### **2.1.1.2 Artérie svalového typu**

Artérie svalového typu mají poměrně silnou stěnu (v poměru k velikosti průsvitu). Zajišťují distribuci krve k jednotlivým orgánům, jsou opatřeny koncentrickou vrstvou svaloviny tak, aby mohly změnou průsvitu reagovat na aktuální potřebu přívodu krve. Tunica intima je tvořena endotelem, subendotelovou vrstvou a dobře vyvinuté membrána elastica interna. Tunica media je silná, v závislosti na průměru cévy může obsahovat až 40 vrstev hladkých svalových buněk. Mezi buňkami hladké svaloviny se nachází různé množství elastických a kolagenních vláken a proteoglykany. Membrana elastica externa je vyvinuta pouze ve větších artériích svalového typu. Tunica adventitia je tvořena kolagenními a elastickými vlákny.

### **2.1.1.3 Artérie elastického typu**

Artérie elastického typu mají v poměru k velikosti průsvitu poměrně tenkou stěnu a zajišťují kontinuální tok krve v průběhu diastoly srdce (např. v aortě). Pro fungování krevního oběhu je nezbytné, aby se tlaková vlna vznikající systolou komor přenášela aortou a jejími hlavními větvemi do periferie beze ztrát, proto je jejich stěna enormně pružná (Martínek, Vacek, 2009). Tunica intima je vzhledem k artériím svalového typu tlustší a skládá se z vrstvy endotelových buněk a silné vrstvy subendotelu. Membrana elastica interna se nedá odlišit od ostatních elastických blanek, které se vyskytují v tunica media. Tunica media tvoří nejsilnější vrstvu stěny a vyskytují se v ní kromě elastických vláken, také hladké svalové buňky, retikulární vlákna a proteoglykany. Membrana elastica externa u artérií elastického typu vyvinuta není. Tunica adventitia je tenká, obsahuje elastická vlákna (Konrádová, Uhlík, 2000; Mescher, 2010).

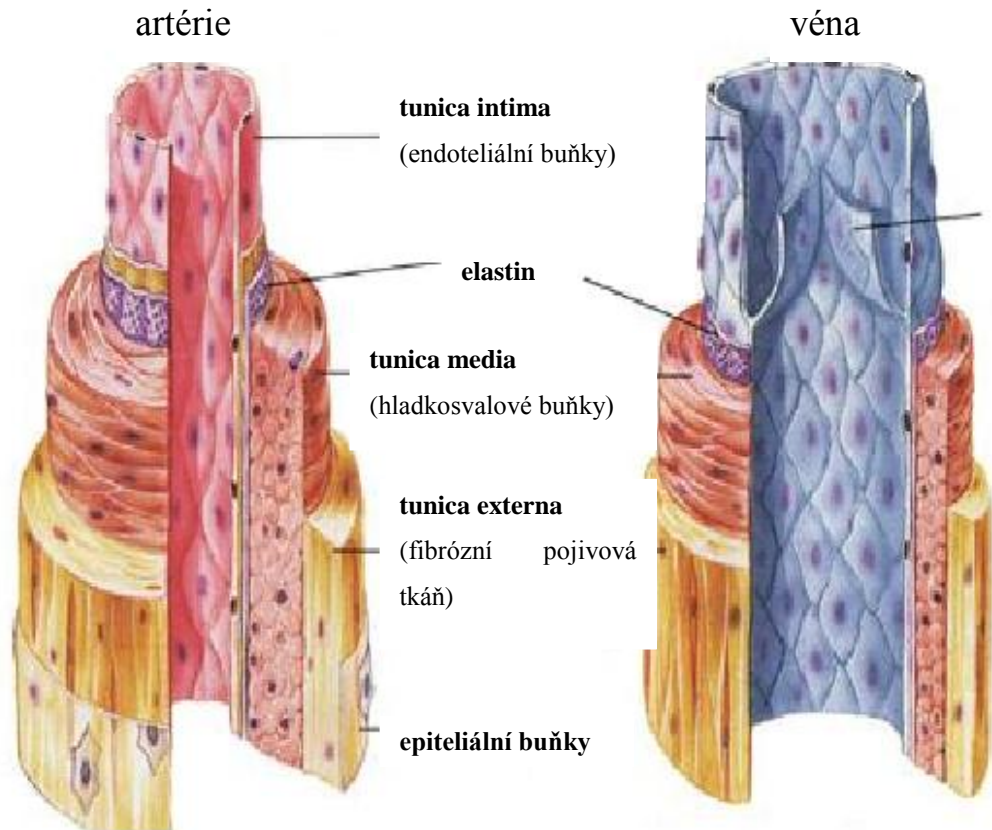
## 2.1.2 Kapiláry

Kapiláry jsou nejmenší a nejpočetnější cévy, tvoří spojnice mezi arteriální a venózní krví. Jsou dlouhé přibližně 1 mm a v průměru mají 0,01 mm. Jsou složeny pouze z ploché endotelové vrstvy. Buňky jsou navzájem spojeny mezibuněčnými spoji, které zahrnují zonulae occludentes a nexy. K dalším důležitým buňkám kapilár patří pericyty - buňky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky, kterými částečně obklopují endotelové buňky a tím přiléhají k povrchu kapiláry. Každý pericyt je obklopen svou vlastní bazální laminou. Tyto buňky představují první známku vývoje tunica media, protože ve své cytoplazmě obsahují aktin, myozin a tropomyozin, které způsobují schopnost kontrakce pericytu (*Konrádová, Uhlík, 2000; Mescher, 2010; Trojan, 1994*).

## 2.1.3 Vény

U vén je stavba stěny variabilnější. Obecně záleží na její lokalizaci. Vény hlavy jsou tenkostěnné, zatímco vény dolních končetin mají stěnu tlustou (vzhledem k nutnosti zachování odporu vůči hydrostatickému tlaku). Elastické membrány ve vénách nenajdeme, přechod mezi vrstvami není ostře ohraničený. Ve stěně bývá mnohem více vaziva a méně svaloviny. Průsvit vén bývá větší, než je tomu u odpovídajících arterií. Venózní intima vytváří chlopně, které zabraňují zpětnému toku krve (*Konrádová, Uhlík, 2000; Martínek, Vacek, 2009; Trojan, 1994*).

**Obrázek 1: Rozdílná vnitřní stavba artérie a vény**



*(<http://www.kardiosystem.websnadno.cz/cevy.html>)*

### 3 Hypertenze

Hypertenze je podle kritérií WHO/ISH (World Health Organisation/ International Society of Hypertension) z roku 1999 definována opakovaným zvýšením krevního tlaku hodnotami tlaku na hodnoty  $\geq 140/90$  mm Hg a/nebo diastolického tlaku na hodnoty  $\geq 90$  mm Hg, které jsou zjištěny opakovaně, při alespoň ve dvou ze tří na sobě časově nezávislých měřeních (Tkáčová, Repková, 2011; Vidimský, 2008). Podle Evropské kardiologické společnosti rozlišujeme na základě hodnot krevního tlaku normální tlak, optimální tlak, vyšší normální tlak, mírnou hypertenzi, středně závažnou hypertenzi, těžkou hypertenzi a izolovanou systolickou hypertenzi (viz. tabulka 1).

**Tabulka 1: Klasifikace hypertenze podle Evropské kardiologické společnosti**

<b>Normální tlak:</b> systolický tlak 120 - 129 mm Hg a diastolický tlak 80 - 84 mm Hg.
<b>Optimální tlak:</b> systolický tlak < 120 mm Hg a diastolický tlak < 80 mm Hg.
<b>Vyšší normální tlak:</b> systolický tlak 130 - 139 mm Hg / diastolický tlak 80-89 mm Hg
<b>Mírná hypertenze:</b> systolický tlak 140 – 159 mm Hg / diastolický tlak 90 – 99 mm Hg
<b>Středně závažná hypertenze:</b> systolický tlak 160-179 mm Hg/ diastolický tlak 100 – 109 mm Hg
<b>Těžká hypertenze:</b> systolický tlak $\geq 180$ mm Hg / diastolický tlak $\geq 110$ mm Hg
<b>Izolovaná systolická hypertenze:</b> systolický tlak $\geq 140$ mm Hg / diastolický tlak < 90 mm Hg

(Špinar, Vítovec, 2012)

## 3.1 Prevalence

Systémová arteriální hypertenze patří k nejčastějším onemocněním kardiovaskulárního systému. Její prevalence se pohybuje okolo 20 – 30% (průmyslově vyspělé země). Systolický tlak stoupá s věkem, diastolický pak naopak mírně klesá u mužů po 60. roce a u žen po 70. roce věku (*Vidimský, 2008*).

## 3.2 Klasifikace

### 3.2.1 Etiopatogenetická klasifikace

Z etiopatogenetického hlediska rozlišujeme hypertenzi primární a sekundární.

**Primární hypertenze (esenciální)** tvoří 90% všech onemocnění. Neznáme vyvolávající příčinu onemocnění. Původ esenciální arteriální hypertenze bývá multifaktoriální, zprostředkovaná genetickou výbavou jedince, endogenními a exogenními faktory (*Carretero, Oparil, 2000; Tkáčová, Repková, 2011*).

**Sekundární hypertenze** tvoří zbývajících 10% případů arteriální hypertenze, kdy zvýšení krevního tlaku bývá způsobeno jiným patologickým stavem. Říká se jí také hypertenze symptomatická. Sekundární hypertenze vyžaduje specifickou terapii, samotná antihypertenziva bývají málo účinná a působí efektivně jen omezenou dobu. K nejčastějším příčinám vzniku sekundární hypertenze patří renální, hormonální (feochromocytom, Cushingův syndrom, hypertyreóza, akromegalie, aj.) či neurologická onemocnění. Může se také jednat o těhotenskou hypertenzi či stav navozený iatrogeně – medikací (při podávání sympatomimetik, glukokortikoidů, antiangiogenních léčiv). Do skupiny symptomatických hypertenzí řadíme i hypertenzi navozenou mechanickou příčinou, nejčastěji koarktací aorty, či atrio-ventrikulární píštělí (*Tkáčová, Repková, 2011*).

### 3.2.2 Klasifikace dle funkčních a morfologických změn

Onemocnění je nutné hodnotit podle hodnoty krevního tlaku, ale současně také nesmíme zapomenout na průvodní komplikace odrážející funkční a morfologické změny organismu.

**Lehká hypertenze** se manifestuje prostým zvýšením tlaku krve bez orgánových změn.

U **středně těžké hypertenze** bývá přítomna alespoň jedna z následujících orgánových změn: hypertrofie levé komory srdeční, proteinurie nebo lehké zvýšení



kreatininu v plazmě v důsledku benigní nefrosklerózy, angiopatie až angiosclerosis hypertonica. Funkce postižených orgánů však stále zůstává významně nezměněna.

Při **těžké hypertenzi** dochází již k závažným morfologickým změnám orgánů a výraznému poškození jejich funkce. Projevuje se změnami očního pozadí III. a IV. stupně (retinopatie až neuroretinopatie), kardiální či renální insuficiencí. Mezi typické projevy patří krvácení do CNS či tranzitorní ischemické ataky, hypertenzní encefalopatie, disekující aneurysma.

**Hypertenzní krize** je těžkou akutní formou arteriální hypertenze s prudkým vzestupem krevního tlaku. Častěji se vyskytuje u pacientů se sekundární hypertenzí. Nemocný je vystaven bezprostřednímu nebezpečí např. akutnímu srdečnímu selhání či mozkové příhodě s neuroretinopatií a dalšími těžkými orgánovými poruchami (Tkáčová, Repková, 2011; Vidimský, 2008).

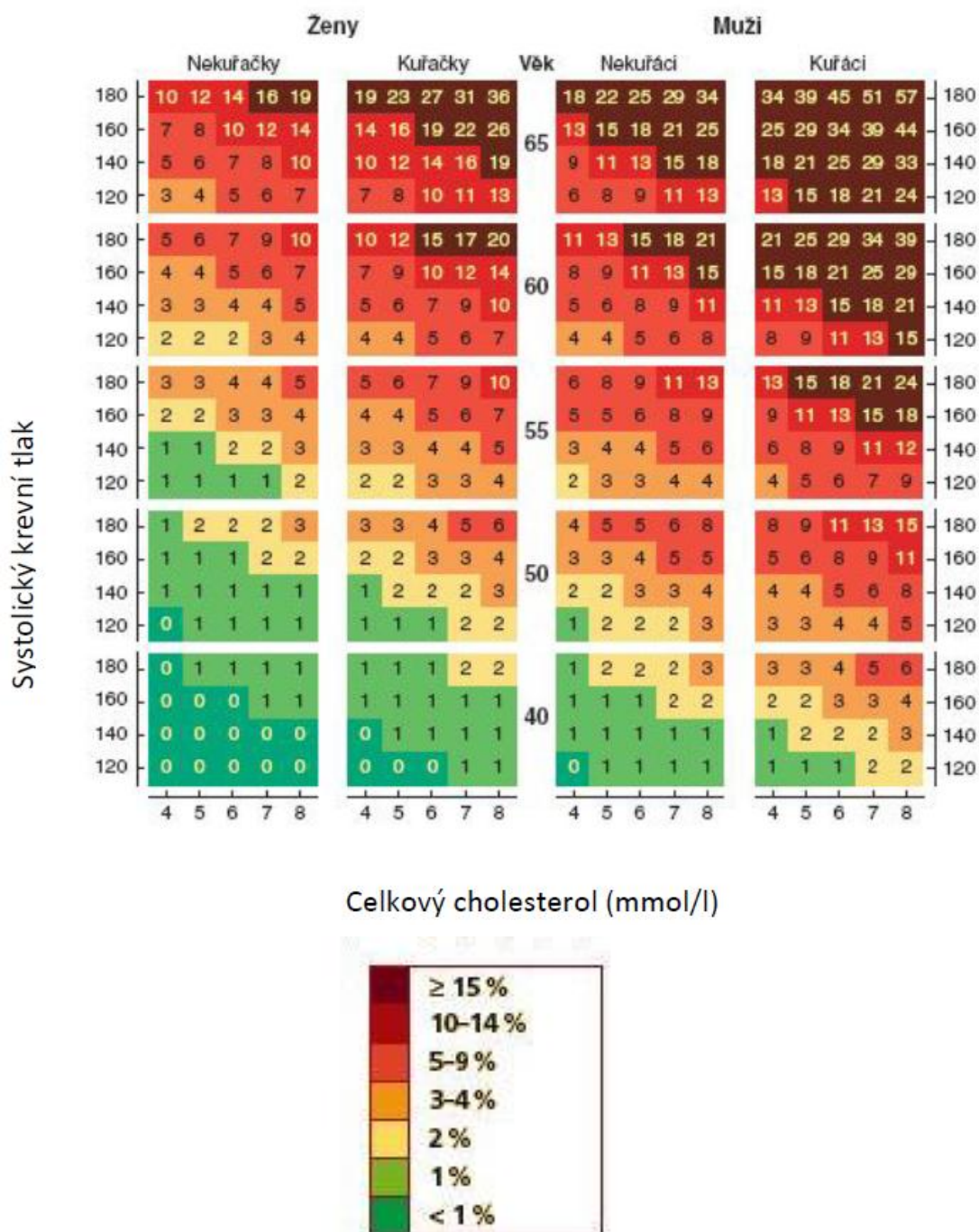
### 3.2.3 Prognóza arteriální hypertenze

Odhad vývoje hypertenze závisí na výši krevního tlaku, přítomnosti dalších rizikových faktorů (celkovém kardiovaskulárním riziku), poškození cílových orgánů a na přítomnosti přidružených onemocnění. Pro predikci vývoje onemocnění nejsou rozhodující výchozí hodnoty krevního tlaku před zahájením léčby, ale jeho výše dosažená v průběhu léčby.

Při určování celkového kardiovaskulárního rizika postupujeme podle barevných nomogramů vycházejících z projektu SCORE (viz. obrázek 2a, 2b), který poskytuje odhad rizika fatálních kardiovaskulárních příhod v následujících 10 letech. Za značné riziko pokládáme hodnotu  $\geq 5\%$  (tzn. pravděpodobnost úmrtí na KVO v následujících 10 letech  $\geq 5\%$ ). Tyto barevné nomogramy vycházejí z mortalitních údajů České republiky a z hodnot základních rizikových faktorů KVO reprezentativního vzorku české populace. Osoby s již manifestním kardiovaskulárním nebo renálním onemocněním mají vysoké ( $\geq 5\%$ ) nebo velmi vysoké ( $> 10\%$ ) riziko úmrtí na KVO v příštích 10 letech. K asymptomatickým pacientům se přistupuje na základě odhadu celkového kardiovaskulárního rizika. Tato predikce úmrtí na kardiovaskulární onemocnění je závislá na věku, pohlaví, kuřáckých zvyklostech, hodnotách systolického TK a celkového cholesterolu (případně poměru celkového a HDL-cholesterolu) (viz. tabulka 2). Diabetici 1. typu s mikroalbuminurií a všichni diabetici 2. typu jsou

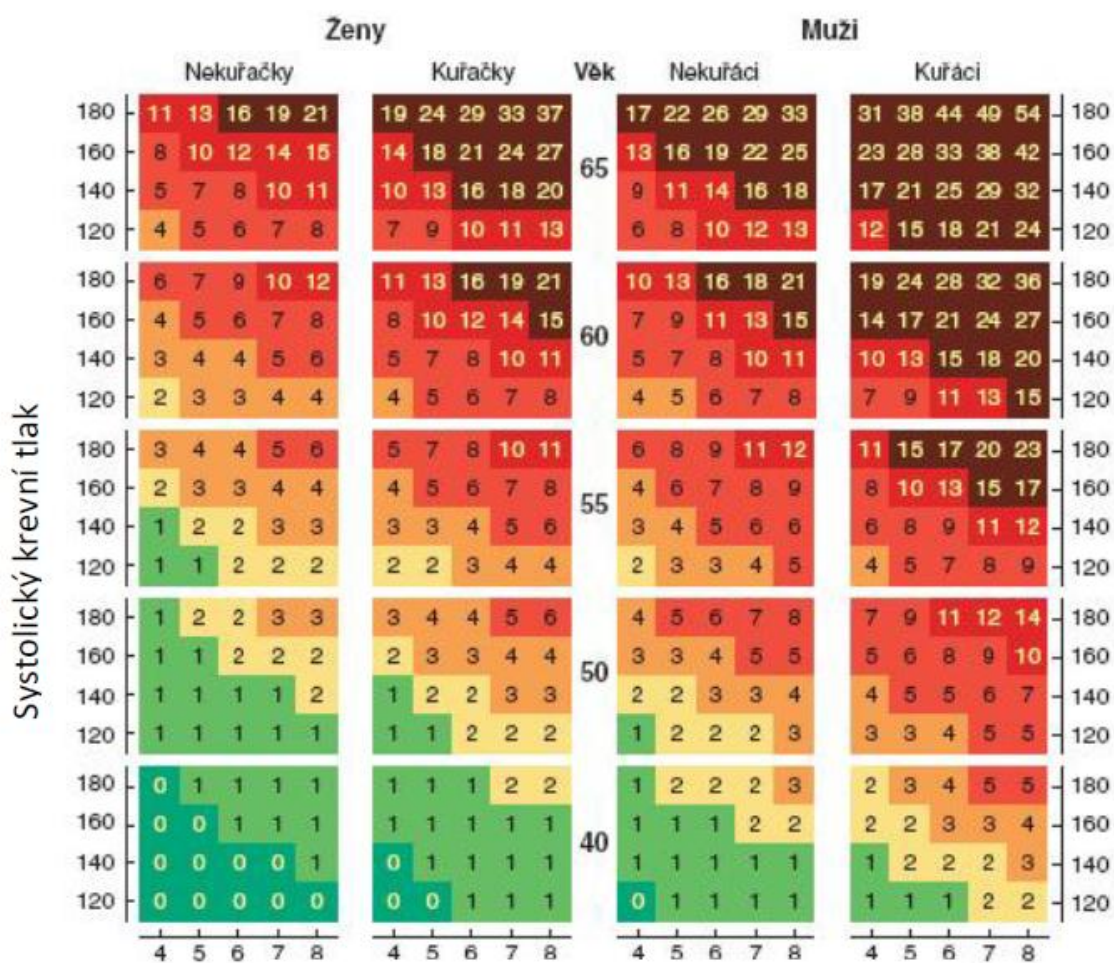
automaticky klasifikováni jako nemocní s vysokým kardiovaskulárním rizikem ( $\geq 5\%$ )  
(<http://www.vasesrdce.cz/kardiovaskularni-rizika/prevence-kardiovaskularnich-onemocneni-v-dospelim-veku>).

**Obrázek 2a: Projekt SCORE - Odhad rizika mortality na kardiovaskulární onemocnění ve výhledu 10 let při zohlednění celkového cholesterolu**

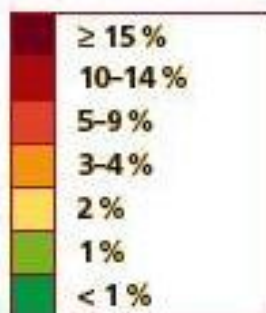


(Conroy, Pyorala, 2003; <http://www.vasesrdce.cz/kardiovaskularni-rizika/prevence-kardiovaskularnich-onemocneni-v-dospelim-veku>)

**Obrázek 2b: Projekt SCORE - Odhad rizika mortality na kardiovaskulární onemocnění ve výhledu 10 let při zohlednění celkového cholesterolu**



poměr celkového a HDL cholesterolu



(Conroy, Pyorala, 2003; <http://www.vasesrdce.cz/kardiovaskularni-rizika/prevence-kardiovaskularnich-onemocneni-v-dospelim-veku>)

**Tabulka 2: Rizikové skupiny osob pro rozvoj KVO**

Hodnoty absolutního rizika KVO jsou vyšší než hodnoty odečtené z tabulky SCORE:

- U osob, které se věkem přibližují vyšší věkové kategorii
- U asymptomatických osob s preklinickými známkami aterosklerózy (zjištěnými při sonografickém vyšetření nebo při nálezů kalcifikací v tepnách či při stanovení kalciového skóre pomocí CT)
- U osob s pozitivní rodinnou anamnézou KVO (prvostupňoví příbuzní ve věku do 55let u mužů; do 65 let u žen)
- U osob s nízkou koncentrací HDL-cholesterolu (< 1,0mmol/l u mužů; <1,2mmol/l u žen), zvýšenou koncentrací triglyceridů (>1,7mmol/l)
- U osob s porušenou glukózovou tolerancí (glykémie v žilní plazmě nalačno < 7,0 mmol/l a při orálním glukózovém tolerančním testu za 2 hod. 7,8 – 11 mmol/l)
- U osob s mírně zvýšenou koncentrací C-reaktivního proteinu (stanoveného vysoce senzitivní metodou), fibrinogenu, homocysteinu, apolipoproteinu B nebo Lp(a)
- U obézních nebo fyzicky inaktivních osob

(<http://www.vasesrdce.cz/kardiovaskularni-rizika/prevence-kardiovaskularnich-onemocneni-v-dospelim-veku>)

### 3.3 Etiologie a patogeneze

Arteriální hypertenze je patologický stav organismu, kdy je chronicky zvýšen krevní tlak v cévním řečišti. Díky trvalému zvýšení tlaku krve dochází k poškození cévní stěny a k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění – např. infarktu myokardu, HŽT (hluboké žilní trombóze), CMP (cévní mozkové příhodě). Hodnota krevního tlaku je

závislá na síle srdečního stahu, rezistenci cévního řečiště a jeho aktuální náplni (objemu cirkulující krve). Na regulaci tlaku krve se podílí centrální nervový systém, baroreceptory, sympatický nervový systém, cévní stěna, ledviny a nadledvinky. Esenciální arteriální hypertenze je multifaktoriální onemocnění – částečně zprostředkováno geneticky, exogenními a endogenními faktory (*Tkáčová, Repková, 2011; Carretero, Oparil, 2000*)

### 3.3.1 Genetický základ hypertenze

Velmi dobře je znám rodinný výskyt hypertenze, vazba na určitou populaci a etnikum. Častěji se hypertenze objevuje u pacientů, u nichž alespoň jeden z rodičů byl hypertonik. Riziko rozvoje vysokého krevního tlaku je 4x vyšší u mladých lidí s pozitivní rodinnou anamnézou než u osob bez rodinné zátěže. Děti hypertenzních rodičů, které mají hodnoty tlaku krve v normě, mívají ho přesto vyšší než stejně staré děti normotenzních rodičů. Dokonce i zvýšená senzitivita cév na vazokonstriktory, jako jsou např. noradrenalin a angiotensin, může být podmíněna geneticky. Předpokládá se také možná porucha adaptace na stres, který následně může hypertenzi vyvolat.

Mnoho studií se zabývalo polymorfismem genů podmiňujících hypertenzi. Mezi geny hypertenze patří např. geny pro systém renin-angiotenzin a adrenergní nervový systém, geny účastníci se solné regulace, lipidového metabolismu, inzulínové rezistence a membránového transportu elektrolytů. U esenciální hypertenze jde nejčastěji o polygenní a heterogenní typ dědičnosti. Zatím bylo identifikováno asi 10 rizikových genotypů.

Nejvíce studií se koncentrovalo na systém renin-angiotenzin (renin, angiotenzin konvertující enzym, angiotenzinogen a receptory angiotenzinu II). U genu pro angiotenzin konvertující enzym byl nejvíce studován polymorfismus daný buď insercí - I, nebo delecí - D řetězce DNA o délce 287 párů bází v 6. intronu lidského genu. Hladina imunoreaktivního angiotenzin konvertujícího enzymu je téměř dvakrát vyšší u pacientů homozygotních pro deleční typ alely než u pacientů homozygotních pro I alelu. Bylo prokázáno, že deleční alela představuje zvýšené riziko pro infarkt myokardu, ischemickou chorobu srdeční a hypertrofii levé komory.

Z dalších kandidátních genů byl studován gen pro syntézu oxidu dusnatého, SA gen, gen pro alfa alducin, gen pro receptor glukokortikoidů, geny pro receptor inzulinu a glukagonu (*Carretero, Oparil, 2000; Padmanabhan, Newton-Cheh, 2012*).

### 3.3.2 Exogenní faktory

Z hlediska exogenních faktorů bývá patogeneze esenciální arteriální hypertenze nejčastěji ovlivněna jedním z následujících faktorů - nadměrným přívodem NaCl, nedostatkem draslíku, vápníku a magnézia, obezitou a s ní spojeným nadbytečným příjmem potravy, kouřením tabáku, přílišnou konzumací alkoholu a chronickým stresem.

Senzitivita na přívod NaCl a jeho vliv na vývoj hypertenze je interindividuální - někteří jedinci jsou na příjem kuchyňské soli nezvykle citliví, naopak jiní pacienti jsou na konzumaci soli rezistentní (množství soli v potravě neovlivní jejich krevní tlak). Pravděpodobně se zde uplatňuje genetické poškození schopnosti ledvin vylučovat sůl, které je markantnější při vyšší spotřebě soli. Tito hypertoničtí pacienti reagující dobře na terapii diuretiky, reagují také na dietu s nízkým obsahem soli. Omezení příjmu NaCl je součástí nefarmakologické léčby hypertenze. Nízký příjem kuchyňské soli patří k primární prevenci arteriální hypertenze. Výhodné je současně při sníženém přívodu sodíku zvýšit přísun draslíku (*Filipiak, 1999*).

Existuje velmi úzký vztah mezi výškou krevního tlaku a tělesnou hmotností. Hypertenzí trpí 28-35% nadměrně obézních pacientů a 15-17% pacientů se střední obezitou. U osob s normální tělesnou hmotností se hypertenze vyskytuje jen u 8-10% případů. Náhlý přírůstek hmotnosti v dospělosti provází hypertenze mnohem častěji než celoživotně (od dětství) trvající obezitu. Riziková je zejména abdominální obezita, zvláště pro rozvoj ICHS a CMP. Snížení hmotnosti bývá obvykle následováno také poklesem krevního tlaku. U obézních pacientů nalezneme současně velmi často inzulinovou rezistenci, která se manifestuje zvýšenou hladinou inzulinu, porušenou glukózovou tolerancí a poruchami lipidového metabolismu (hypertriglyceridémie, snížení hladiny HDL cholesterolu)

(Tkáčová, Repková, 2011; <http://www.vasesrdce.cz/kardiovaskularni-rizika/prevence-kradiovaskularnich-onemocneni-v-dospelem-veku>).

Významně negativní vliv na kardiovaskulární systém a na rozvoj všech kardiovaskulárních onemocnění má kouření tabáku. V souvislosti s kouřením cigaret patří mezi nejčastější onemocnění v globálním měřítku nejružnější onemocnění respiračního traktu (rakovina plic je z 90% způsobena kouřením). Většina kuřáků však umírá obecně na nádorová onemocnění a kardiovaskulární choroby. Kouření tabáku bezprostředně ovlivňuje rozvoj aterosklerózy a tedy i ICHS, AIM, cerebrovaskulárních onemocnění. Po vykouření cigarety navíc přechodně dochází k okamžitému vzestupu tlaku krve (*Vožeh, 2005*).

Pravidelná konzumace alkoholu v množství větším než 30g denně u mužů a 20g denně u žen zvyšuje riziko rozvoje arteriální hypertenze. Pravděpodobně se jedná o nejčastější příčinu sekundární hypertenze. Alkoholem indukované zvýšení krevního tlaku bývá reverzibilní (*Luther, 2012*). Pacienti, kteří pravidelně a nadměrně konzumují alkoholické nápoje, mívají obvykle vyšší hodnoty systolického než diastolického krevního tlaku. Mezi možné mechanismy alkoholem indukované hypertenze patří vyšší aktivace sympatiku (*Russ, R., Abdel-Rahman, 1991*), který hraje zásadní roli v regulaci kardiovaskulárního systému – ovlivňuje vazokonstrikci a vzrůstající sílu srdečního stahu. Uplatňují se zde zvýšené hladiny katecholaminů v krvi, snížená citlivost baroreceptorů arteriální stěny a snížené hladiny iontů magnézia v krvi (*El-Mas, Abdel-Rahman, 1993*).

Důležitým faktorem pro patogenezi arteriální hypertenze bývá chronicky působící stres, který stimuluje sympatický nervový systém. Zvláště významný je chronický stres u osob, které jsou k tomu geneticky a zevním prostředím predisponované (tzn. predisponovaní k reaktivitě na zevní podněty a stres zvýšením hladiny katecholaminů). Senzitivita baroreceptorů (v karotidách, aortě i v srdečních síních) se rychle přizpůsobuje nové změně a snížení senzitivity u hypertoniků predisponuje ke zvýšení hladiny krevního tlaku. Katecholaminy zprostředkovaná vazokonstrikce může přispět změnami v eferentních arteriolách. Nárůst  $\alpha$ -sympatické aktivity hraje roli při zvýšení krevního tlaku především v ranních hodinách. Vyšší krevní tlak a vyšší tepová frekvence zvyšuje riziko kardiovaskulární příhody. Znamky zvýšené aktivace sympatoadrenergního systému lze nalézt také u juvenilní hypertenze. Trvá-li hypertenze léta, bývá tendence ke snížení sympatického nervového tonu (*Filipiak, 1999*).

Spánkový režim značně ovlivňuje funkci kardiovaskulárního systému. Nespavost - zkrácení délky a snížení kvality spánku předchází často vzniku



kardiovaskulárních onemocnění. Objevuje se stále více dokladů o hypertenzi rezistentní na farmakologickou léčbu právě u pacientů s nedostatkem kvalitního spánku. S nespavostí je asociován oxidativní stres, endoteliální dysfunkce a systémové zvýšení krevního tlaku (*Levy, Tamisier, 2012*).

### 3.3.3 Endogenní faktory

Mezi endogenní faktory ovlivňující hypertenzi vedle centrálního a vegetativního nervového systému patří řada humorálních působků s vazokonstrikčním či vazodilatačním účinkem. Hypertenze se může rozvinout na základě nadbytku (absolutního nebo relativního) vazopresorických nebo z nedostatku vazorelaxačních působků. K vazokonstriktorům patří katecholaminy - adrenalin a noradrenalin, systém renin-angiotenzin, aldosteron, arginin-vazopresin a další látky uvolňované cévním endotelem (např. endotelin 1, tromboxan TXA<sub>2</sub>, aj.). K depresorickým působkům patří kalikrein-kininový systém, dopamin, vazodilatační prostaglandiny (PGE<sub>2</sub>), prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), atriální natriuretický faktor (ANF), NO (neboli EDRF - endoteliální relaxační faktor). Systémové a humorální působky ovlivňují hemodynamiku, průtok krve tkáněmi a periferní cévní rezistenci. V oblasti cévního endotelu ovlivňují agregabilitu a adhezivitu trombocytů, migraci monocytů subendotelově. Abluminálně pak ovlivňují kontraktilitu hladkého svalstva cév, jeho případnou hypertrofii, hyperplazii a remodelaci. Působení humorálních působků vyvolávajících dysfunkci endotelu může být spojovacím článkem mezi hypertenzí, urychleným rozvojem aterosklerózy a ICHS u hypertoniků (*Carretero, Oparil, 2000; Tkáčová, Repková, 2011*)

Na patogenezi hypertenze mohou participovat také anomálie transportu elektrolytů přes buněčnou membránu. Jedná se např. o poruchy sodíkové pumpy (Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPáza), Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>kotransportu, Na<sup>+</sup>Li<sup>+</sup>antitransportu. Důsledkem vrozené nebo získané odchylky některého z těchto mechanismů dochází k intracelulárnímu navýšení Na<sup>+</sup> iontů a druhotně i Ca<sup>2+</sup> iontů. Následkem je zvýšená senzitivita hladkosvalových cévních buněk na presorické podněty, větší náchylnost k vazokonstrikci a zvýšení krevního tlaku (*Filipiak, 1999*).

### 3.4 Kardiotoxicita - nežádoucí účinek onkologické léčby

Cytostatická léčba přináší mnoho rizik, mezi nimi i kardiotoxicitu. Setkáváme se s ní u klasických cytostatik, tak i u léčby novější, biologické. Kardiotoxicita patří vzhledem k nízké regenerační schopnosti myokardu a zásadní vitální funkci tohoto orgánu k nejobávanějším nežádoucím účinkům. Klasické nežádoucí účinky cytostatik vyplývají z neselektivního zásahu do buněčné proliferace (nauzea, emeze, hematotoxicita) se do jisté míry dají zvládnout pomocí podpůrné léčby. Závažným problémem však zůstává výskyt ireverzibilní orgánové toxicity. U onkologických pacientů dochází k poškození kardiovaskulárního systému několika mechanismy: poruchou koagulace (nejčastěji hyperkoagulační stav), anémií, exhaustací organismu (malnutrice, přidružená onemocnění), uvolňováním kardiodepresivních cytokinů, maligní či paramaligní perikarditidou, přímým vlivem nádoru na srdce či vaskulární systém a právě také léčbou maligního onemocnění - chemoterapií a radioterapií. Klinicky nejvýznamnější a také nejčastější je kardiotoxicita u antracyklinových cytostatik. V současné době je stále větší pozornost věnována také kardiotoxicitě nových cytostatik – především látek s antiangiogenním mechanismem účinku (*Elbl, 2001; Štěrba, Popelová, 2005*).

Rozšíření léčby multikinázovými inhibitory vedlo v posledních letech ke zjištění, že při podávání mnohých těchto léčiv může dojít k srdečnímu poškození. Mechanismus poškození zatím není zcela znám, u každého z léčiv skupiny multikinázových inhibitorů se předpokládá jiný způsob poškození myokardu. Výskyt kardiotoxicity u sunitinibu se manifestuje především poklesem ejekční frakce levé komory se známkami levostranného srdečního selhání, prodloužením QT intervalu. Při podávání myšim, došlo k poškození mitochondrií kardiomyocytů. Specifická léčba ani jednoznačné doporučení nejsou známy, zkouší se ACE inhibitory a betablokátory (*Marek, Linhart, 2011*).

### 3.5 Experimentální modely hypertenze

Hypertenze je multifaktoriální onemocnění, bývá ovlivněno polygenně. Vzniká současně spolupůsobením genetických vnějších faktorů. Výzkum vysokého krevního tlaku je tedy mimořádně složitý – experimentální věda navíc naráží na mnohé etické a praktické komplikace (relativně pomalý rozvoj nemoci u člověka, dlouhověkost, nemožná aplikace genetických metod) při testování na lidech. Proto se pro pokusné práce velmi často využívají experimentální zvířecí modely. Mezi nejčastěji používaná experimentální zvířata patří laboratorní potkani. V porovnání s lidskou populací zahrnuje použití experimentálních modelů celou řadu výhod. Většinu přesně definovaných modelů tvoří tzv. inbrední kmeny laboratorních potkanů. Zvířata z inbredních kmenů jsou isogenetická, fenotypově uniformní, poskytují homogenní soubor s nízkou variabilitou reaktivity při laboratorních pokusech a měřeních. Inbrední kmeny laboratorních zvířat tak umožňují porovnávání výsledků z různých výzkumných center (*Havlenová, 2007*).

Principy uplatňující se v patogenezi hypertenze jsou si u lidí a potkanů velmi podobné. Jako modely hypertenze se používají především dva inbrední kmeny: kmen SHR (spontánně hypertenzní potkan) a Dahlův kmen SS (salt-sensitive), který citlivě reaguje na sůl v potravě zvýšením krevního tlaku. Použití těchto kmenů umožňuje rovněž křížení hypertenzních a normotenzních jedinců pro studium genetického základu hypertenze. Žádný z modelů sice neodpovídá přesně situaci u člověka, přesto však lze mezi klinickými a experimentálními formami hypertenze nalézt podobnost (*Havlenová, 2007*).

Většina modelů experimentální hypertenze byla vyvinuta v poměrně nedávné minulosti a podle způsobu vzniku onemocnění je lze rozdělit do dvou základních skupin - indukované a genetické modely. Jednotlivé modely můžeme charakterizovat na základě účasti genetických faktorů, změn hemodynamiky a objemu tělních tekutin, aktivity, vazokonstrikčních a vazodilatačních systémů, transportu iontů apod. Všechny základní experimentální modely byly vyvinuty za účelem studia jednotlivých patogenetických mechanismů hypertenze. Výrazně se rozšířilo především použití 2 modelových hypertenzních kmenů a to na základě podobnosti s principy odpovědnými za vznik esenciální hypertenze u lidí. Kmeny laboratorních potkanů byly vyšlechtěny z geneticky nehomogenních populací potkanů díky systematické selekci

potkanů s nejvyšším krevním tlakem. Řízenou příbuzenskou plemenitbou se dosáhlo ustáleného vysokého krevního tlaku a po 20 a více generací sourozeneckého páření se kmeny staly inbredními. Zvířata z inbredních kmenů jsou isogenetická, fenotypově uniformní, poskytují homogenní soubor s nízkou variabilitou reaktivity při laboratorních pokusech a měřeních (*Sheila, Doggrella, 1998*).

Jako normotenzní kontrola se často používá Wistar Kyoto potkan (WKY). SHR potkani jsou potomci samce Wistar – spontánně hypertenzního potkana (145 - 175 mm Hg) a samice se zvýšeným krevním tlakem (130 - 140 mm Hg). Jejich SHR potomci se pak nechávají křížit bratr X sestra a vzniká inbrední kmen SHR potkanů (TK > 180 mm Hg).

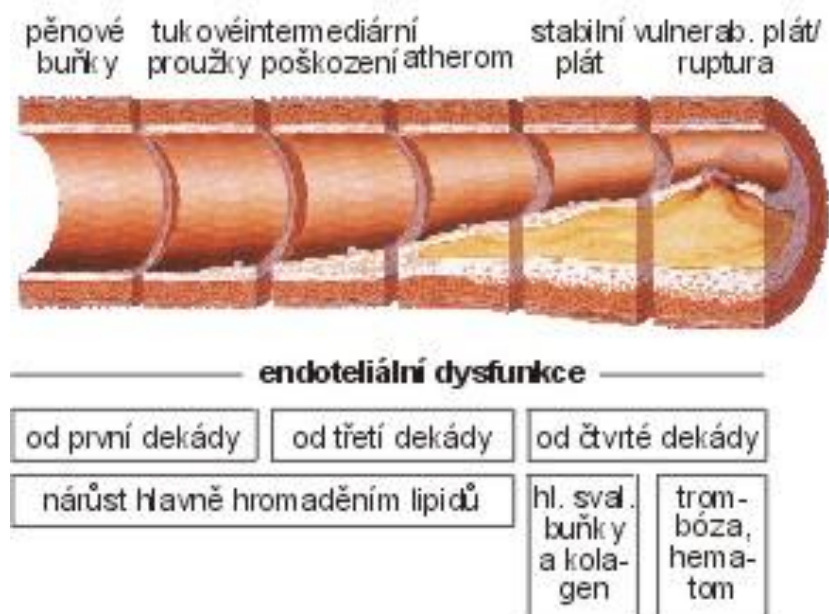
Hlavní výhodou experimentálních modelů je jejich dostupnost, možnost standardizace podmínek a genetických vlastností použitých zvířat, dále také rychlost a reprodukovatelnost rozvoje hypertenze a jejích komplikací (*Sheila, Doggrella, 1998*). Stejně jako u lidí se hypertenze i u SHR potkanů vyvíjí rychleji u mužů než u žen (*Kuneš, Zicha, 2002*).

## 4 Endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkce je definována jako funkční postižení endotelu, projevující se především zvýšenou propustností cévní stěny se vznikem nerovnováhy mezi vazoaktivními mechanizmy a hemokoagulačními působky. V cévách začnou postupně převažovat mechanizmy vazokonstrikční, protrombotické a aterogenní. K nejčastějším příčinám vzniku dysfunkčního endotelu patří dyslipidémie, arteriální hypertenze, inzulinová rezistence, hyperglykémie a kouření - tedy velmi dobře známé rizikové faktory všech kardiovaskulárních onemocnění (*Daignon, Ganz, 2004; Karásek, Vaverková, 2002*)

Endoteliální dysfunkce je považována za první stádium aterosklerózy. Předpokládá se, že dysfunkční endotel navodí zánět a následně fibroproliferaci cévy. Cirkulující monocyty přestupují do intimy, kde pohlcují cholesterol a mění se v pěnové buňky. Tyto makrofágy vytvářejí množství působků, z nichž některé mohou endotel poškozovat, některé působí jako růstové faktory a stimulují hladké svalové buňky k proliferaci. Ateroskleróza může postihovat tepny mozku, srdce, ledvin, dalších orgánů a také končetin (*Daignon, Ganz, 2004*).

**Obrázek 3: Endoteliální dysfunkce – vývoj aterosklerotických změn**



(*Stary, Chandler, 1995*)

## 4.1 Funkční význam endotelu cév

Endotel je největším orgánem lidského těla, tvoří ho jednovrstevný epitel, vystýlající vnitřní povrch krevních i lymfatických cév, kryje srdeční chlopně a dutiny (Hlubocká, 2002). Tvoří ho ploché, vzájemně pevně propojené buňky. Endotel je významný orgán, u člověka o hmotnosti 70 kg pokrývá téměř 700 m<sup>2</sup> a váží až 1,5 kg (Karetová, 2002).

Zdravý endotel má mnoho fyziologických funkcí. Vykonává regulaci cévní homeostázy. Podílí se na udržování cévní permeability, vazoregulace - udržuje rovnováhu mezi vazodilatací a vazokonstrikcí. Účastní se imunitních a zánětlivých dějů organismu, podílí se na oxidaci LDL, reparačních mechanismech a neoangiogenezi. Endotel ovlivňuje migraci a proliferaci hladkosvalových buněk, trombogenezi a fibrinolýzu. Tvoří selektivní bariéru pro různé molekuly a buňky. Některé z jeho produktů působí antagonisticky - za fyziologických podmínek je udržována rovnováha mezi těmito látkami. Pokud dojde k posunu směrem k aterogenezi, dojde k destabilizaci rovnováhy. Zvýší se permeabilita cévní stěny pro řadu látek, včetně adhezních molekul - dochází ke stavu, který se nazývá endoteliální dysfunkce. Ta následně vyústí k poškození cévní stěny (Daignon, Ganz, 2004).

Endotel je v bezprostředním kontaktu s krví a tedy i s látkami jako jsou např. hormony, lipoproteiny, cytokiny, bílkoviny krevního srážení. Endotel se nachází na rozhraní krve a ostatních vrstev cévní stěny, jeho permeabilita je řízena oběma směry. Semipermeabilní membrána využívá k přenosu paracelulární i transcelulární transportní mechanismy. Vazoadhezivní molekuly (ICAM, VCAM) a selektiny umožňují transfer monocytů a lymfocytů, vody, elektrolytů, živin a aktivních substancí léčiva z makromolekul zejména proteinů a lipoproteinů. K transcelulárnímu přenosu přes mezibuněčné spoje může docházet vlivem krevního tlaku a vazoaktivních látek (např. histamin při zánětu) (Daignon, Ganz, 2004; Karásek, Vaverková, 2002).

Dysfunkční endotel bývá především v místech s nízkým smykovým napětím prvním krokem k rozvoji aterosklerotického plátu. Současně vznikají zcela nové aterosklerotické pláty a již vzniklé pláty progredují. Kontrolou arteriální hypertenze lze zajistit zlepšení funkce endotelu (Karásek, Vaverková, 2002).

### 4.1.1 Vazoregulace

Vazoregulace je zprostředkována syntézou, aktivací a degradací vazoaktivních působků. Dále udržení rovnováhy napomáhá uspořádání endotelu ve směru toku krve. Endotel zajišťuje optimální krevní průtok tkáněmi, čímž reguluje vazodilataci a vazokonstrikci. Na povrch endotelu se váží různé substráty. Pokud není endotel dysfunkční, vede uvolnění serotoninu či acetylcholinu k tvorbě NO (oxidu dusnatého) nebo prostacyklinu a následné vazodilataci. Vazodilataci také zajišťuje průtok krve a to jako adaptační mechanismus na fyzickou zátěž. Při postižení endotelu dochází vlivem těchto podnětů k vazokonstrikci a snadněji se spouští koagulační krevní kaskáda (*Daignon, Ganz, 2004; Karásek, Vaverková, 2002*).

#### 4.1.1.1 Vazoaktivní látky uvolňované endotelem

Díky vlastní produkci působků - vazoaktivních látek si endotel zajišťuje regulaci cévního tonu. Hlavní vazodilatační látkou uvolňovanou endotelem je oxid dusnatý - NO, původně označovaný jako EDRF (endothelium-derived relaxing factor; endotelem uvolňovaný relaxační faktor). K dalším vazodilatačním působkům endotelu patří také prostacyklin a bradykinin. Prostacyklin působí synergicky s NO – tlumí trombocytární agregaci. Bradykinin stimuluje uvolňování NO, prostacyklinu a EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor; endotelem uvolňovaný hyperpolarizační faktor). Bradykinin také stimuluje produkci t-PA (tissue plasminogen activator; tkáňový aktivátor plazminogenu), který hraje důležitou roli v procesu fibrinolýzy. Endotel vytváří ale i vazokonstrikční látky, jako např. endotelin (nejmohutnější endogenní vazokonstrikční působek) a angiotensin II. Angiotensin II účinkuje jako vazokonstriktor, podporuje tvorbu endotelinu a současně funguje také jako prooxidant. Endotelin a angiotensin II ovlivňují proliferaci buněk hladké svaloviny cév, čímž se podílejí na vzniku aterosklerotických lézí. Aktivované makrofágy a hladkosvalové buňky, charakteristické buněčné komponenty aterosklerotických lézí, produkují velké množství endotelinu (*Daignon, Ganz, 2004; Karásek, Vaverková, 2002*).

### 4.1.2 Angiogeneze a reparační procesy

Důležitou roli v procesu aterogeneze hraje proliferace hladké svaloviny. Podnětem pro proliferaci bývají TGF- $\beta$ , fibroblastový a destičkový růstový faktor, interleukin-1 a endotelin-1. Buňky hladké svaloviny migrují do subendoteliálního prostoru, čímž dochází k hyperplazii intimy a hypertrofii cévní stěny. Významným inhibitorem tohoto děje je vazodilatátor NO (*Daignon, Ganz, 2004; Karásek, Vaverková, 2002*).

Novotvorba kapilár či větších cév probíhá na základě impulzů k vytvoření kolaterály a jeho zachycení endotelem větší tepny. Jedním z podnětů pro angioneogenezi bývá ischemie. Při bujení vzniká endotelový pupen, který díky enzymové sekreci rozrušuje okolní extracelulární matrix a prodírá si tak cestu k dané cévě. U cév většího průměru se vytváří lumen.

V reparačních pochodech je kontrola zajišťována řadou cytokinů uvolňovaných endotelem, makrofágy, trombocyty a myocyty (*Daignon, Ganz, 2004; Karásek, Vaverková, 2002*).



### 4.1.3 Zánět a aterogeneze

Rozvoj aterosklerózy má několik fází od endotelové dysfunkce až po stádium nestabilního aterosklerotického plátu, které jsou provázeny přítomností zánětu (*viz. obrázek 3*). Endotel, makrofágy i tuková tkáň jsou místem vzniku cytoadhezivních molekul a prozánětlivých cytokinů (*Štulc, 2006*). CRP (C reactive protein; C reaktivní protein) je ukazatelem mírného systémového zánětu - odráží nejen aktivitu zánětu v aterosklerotickém plátu, ale souvisí i s expresí adhezivních molekul a chemokinů v buňkách cévního endotelu. Koncentrace CRP v plazmě se při ateroskleróze pohybuje v rozmezí 0,5 – 10 mg/l (*Daignon, Ganz, 2004*). Infiltrace subendoteliálního prostoru leukocyty hraje v procesu aterogeneze důležitou úlohu. Leukocyty jsou podkladem pro vznik pěnových buněk, zhoršují endoteliální dysfunkci, vytvářejí a udržují zánětlivou infiltraci plátu, ovlivňují myointimální proliferaci (*Štulc, 2006*). Podílejí se také na vzniku akutních aterotrombotických komplikací produkcí proteolytických enzymů, které narušují stabilitu plátu a zvyšují riziko jeho ruptury. Aterogenní lipoproteiny a četné mediátory parakrinně i apokrinně působící ovlivňují leukocytární migraci endotelem (*Karetová 2002; Ateroskleróza: Nové pohledy na C - reaktivní protein, 2002*).

## 5 Adhezivní molekuly

### 5.1 Funkce

Adhezivní molekuly neboli CAM (cell adhesion molecules) jsou látky bílkovinné povahy. Jedná se o transmembránové proteiny typu I, vyskytují se na povrchu buněk, kde zprostředkovávají interakce mezi extracelulární hmotou nebo se sousedními buňkami. Jedná se o různorodé skupiny glykoproteinů, podle struktury se dělí na selektiny, integriny a adhezivní molekuly z imunoglobulinové rodiny. Na povrchu buněk vytvářejí specifické receptory, které jsou důležité pro uspořádání extracelulární matrix, regulují mezibuněčné interakce, ovlivňují migraci a utvářejí buněčný tvar. Významně se zapojují do imunitních dějů organismu. Základní strukturní rysy adhezivních molekul jsou společné, obsahují několik specializovaných domén - doménu napojující se na buněčný povrch, doménu interagující s kolagenem a další doménu vázající se na proteoglykany. Obsahují tzv. RGD sekvenci (arginin-glycin-aspartát) nezbytnou pro adhezi buněk k extracelulární matrix (*Masopust, Průša, 2003; Blankenberg, Barboux, 2003; Vytášek, 2010*).

Působí duálně – současně jako signální molekuly a zároveň se účastní morfogeneze. Svou nezastupitelnou roli mají v patologických i fyziologických dějích organismu. Účastní se fertilizace, embryogeneze, morfogeneze, udržení a regulace homeostázy. Mají svůj význam při imunitních a zánětlivých reakcích. Podílejí se na migraci leukocytů při zánětu, hojení ran ale i při metastazování nádorů. Díky buněčné adhezi je možné přesné zacílení buněčných elementů do konkrétního místa.

Podle struktury a funkce dělíme adhezivní molekuly do několika rodin. Mezi nejvýznamnější z nich patří integriny, selektiny, imunoglobulinová rodina, cadheriny, aj. (*Masopust, Průša, 2003; Blankenberg, Barboux, 2003*).

#### 5.1.1 Integriny

Jedná se o transmembránové proteiny tvořící receptory pro adhezivní sekvence extracelulární matrix – ECM. Zprostředkují přichycení buňky k ECM nebo k jiné buňce a umožňují tak přenos signálu (informace) mezi ECM a buňkou. Signalizace probíhá jak

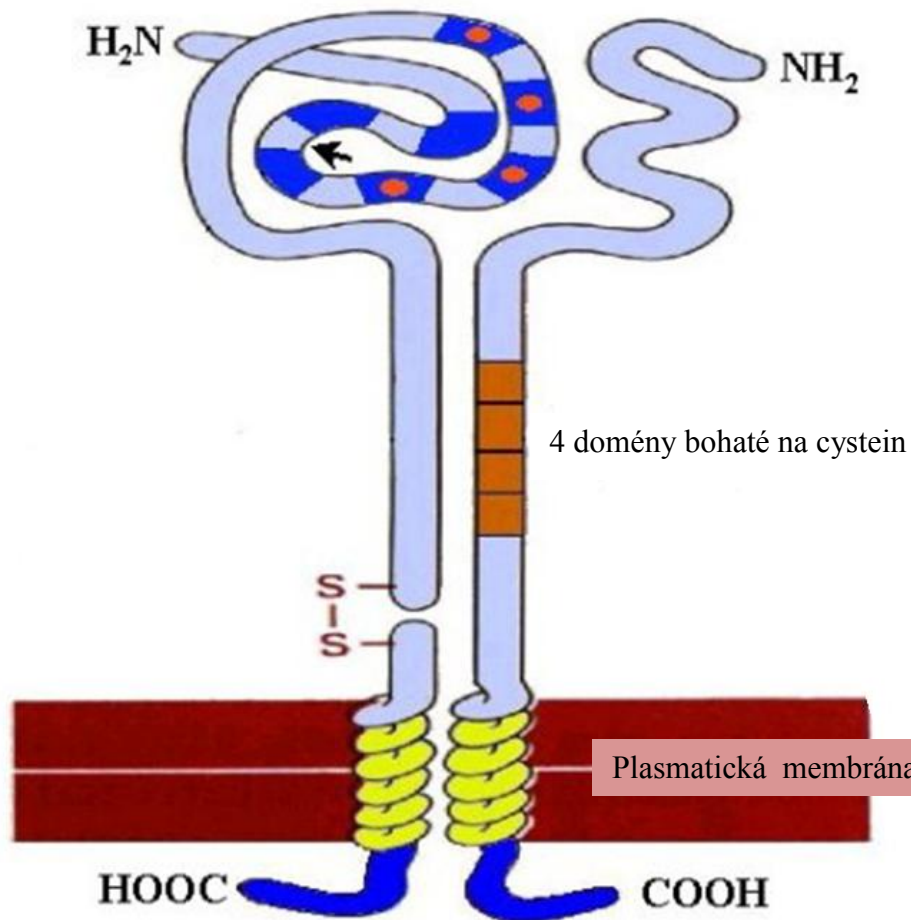
z ECM do buňky (outside-in signaling), tak z buňky do extracelulárního prostoru (inside-out signaling). Integriny „integrují“ intracelulární cytoskelet s extracelulární matrix.

Při outside-in signalizaci integriny vytváří díky vazbě se specifickými sekvencemi ECM konformační změny i v cytoplazmatické části molekuly. Změna konformace integrinu následně vyvolá soubor interakcí. Dochází tak k regulaci procesů, které regulují intracelulární buněčnou signalizaci (např. fosforylaci proteinů, proliferaci, diferenciaci a apoptózu). Konformační změny mohou vést také k tzv. *clusteringu* - shlukování molekul integrinu v membráně, což ovlivní interakce cytoplasmatických domén integrinu. Integriny slouží pro buňky jako mechanická čidla přenášející informaci o ECM do buňky. Buňka této informaci následně přizpůsobí svůj cytoskelet (Vytášek, 2010).

Inside-out signalizace je umožněna změnou afinity vazebního místa pro ligand extracelulární matrix. Tak se děje díky alosterické přestavbě, která následuje asociaci intracelulární části integrinu s intracelulárním integrin aktivujícím komplexem. Příkladem této signalizace je aktivace trombocytů (Blankenberg, Barboux, 2003).

Integriny jsou heterodimerní molekuly. Jsou tvořeny 2 nekovalentně vázanými podjednotkami ( $\alpha$  a  $\beta$ ) (viz. obrázek 4). Každý z integrinů se může vázat na více ligandů a zároveň jednotlivé molekuly matrix jsou schopny vázat více integrinů. Pro vazbu příslušného ligandu je potřebná jeho aktivace. Integriny mívají ke svým ligandům relativně nízkou afinitu, která je však kompenzována velkým množstvím integrinových molekul (stovek až tisíců na jedné buňce) (Krieglstein, Granger, 2001). Adheze je zprostředkována vazebním místem na  $\beta$  subjednotce (k jeho modulaci dochází vazbou na  $\alpha$  subjednotce nebo jako následek vazby selektinů) (Vytášek, 2010).

Obrázek 4: Heterodimerní molekula integrinu – složená z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotky



(Vytášek, 2010)

### 5.1.2 Nadrodina imunoglobulinů

Má více jak 70 členů, jedná se o receptory T-buněk, imunoglobuliny, MHC-molekuly, CD2, CD3, CD4, CD8, NCAM, ICAM1-5, VCAM-1, PECAM-1. Jedná se o evolučně staré molekuly, které se exprimují na různých buňkách. Ve své struktuře mají tyto adhezní molekuly jednu nebo více Ig-domén jako základní motiv aminokyselinové sekvence. Členové imunoglobulinové rodiny se mohou vázat sami mezi sebou, kupř. MHC-molekuly se vážou na receptory T-buněk, nebo s integriny jako je ICAM-1 se váže na LFA-1 a Mac-1, případně s různými přídatnými receptory (interakce ICAM-1 a CD43). Vyskytují se převážně v nervové tkáni. Skládají se obvykle z 1 nebo z více imunoglobulinových domén (60 – 100 aminokyselin), které formují adhezní místa. Často se v jejich struktuře vyskytují 2 základní

domény - opakující se klička strukturně homologní s imunoglobuliny provázaná disulfidickou vazbou a opakující se sekvence (asi 100 aminokyselin), která je homologní s fibronektinem (*Masopust, Průša, 2003*).

Mezi nejznámější imunoglobuliny patří N-CAM (nerve-cell adhesion molecule). Vykytují se na povrchu neuronů, gliových buněk, kosterního svalstva a NK buněk. Existuje mnoho izoform N-CAM; 3 hlavní izoformy se liší pouze ve své cytoplasmatické doméně. N-CAM mají velký význam na začátku morfogeneze, kdy jsou stejnoměrně rozmístěné kolem neurální trubice. Začnou-li nervové buňky migrovat, N-CAM zaniká. Opět se objeví, až když přemísťování neuronů ustane a začínají vznikat ganglia. Adhezní vlastnosti N-CAM jsou řízeny dlouhým řetězcem sialové kyseliny, postupnou sialinizací přicházejí o svoji homofilii (*Krieglstein, Granger, 2001; Masopust, Průša, 2003*).

### 5.1.3 Cadheriny

Cadheriny jsou adhezivní molekuly umožňující především adhezi na úrovni buňka – buňka; patří mezi tzv. homofilní adhezivní molekuly. Většinou se každý cadherin váže na stejný druh cadherinu na sousední buňce. Mohou být zároveň jak ligandem, tak receptorem. U živočichů známe více jak 100 druhů cadherinů. Rozlišujeme např. klasické cadheriny (E-cadherin neboli *uvomorulin*, R-cadherin, N-cadherin, P-cadherin, aj.), dezmozomální cadheriny, embryonální cadheriny, protocadheriny. Jejich adhezní schopnost bývá závislá na aktuální koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$  iontů v okolí. Odpovídají za selektivní mezibuněčnou adhezi, za udržení integrity multicelulárních organismů, diferenciaci buněk a vytváření nových struktur. Jsou rozšířeny prakticky ve všech tkáních. V mozku je největší počet různých typů; dochází zde k tvorbě mnoha velmi specifických mezibuněčných kontaktů. Jsou tvořeny jako prekurzory polypeptidů, jsou posttranslačně modifikovány glykosylací, fosforylací či proteolytickým štěpením. Více jak polovinu aminokyselinové sekvence mají cadheriny identickou, skládají se z pěti podobných extracelulárních domén (3 z nich jsou schopné vázat okolní  $\text{Ca}^{2+}$ ) a jedné intracelulární domény, která adheruje obvykle na cytoskelet buňky. Jsou velmi důležitým faktorem buněčné diferenciaci a tkáňové morfogeneze. Má-li buňka migrovat, musí ztratit všechny cadheriny (*Blankenberg, Barbaux, 2003; Masopust, Průša, 2003*).

## 5.1.4 Selektiny

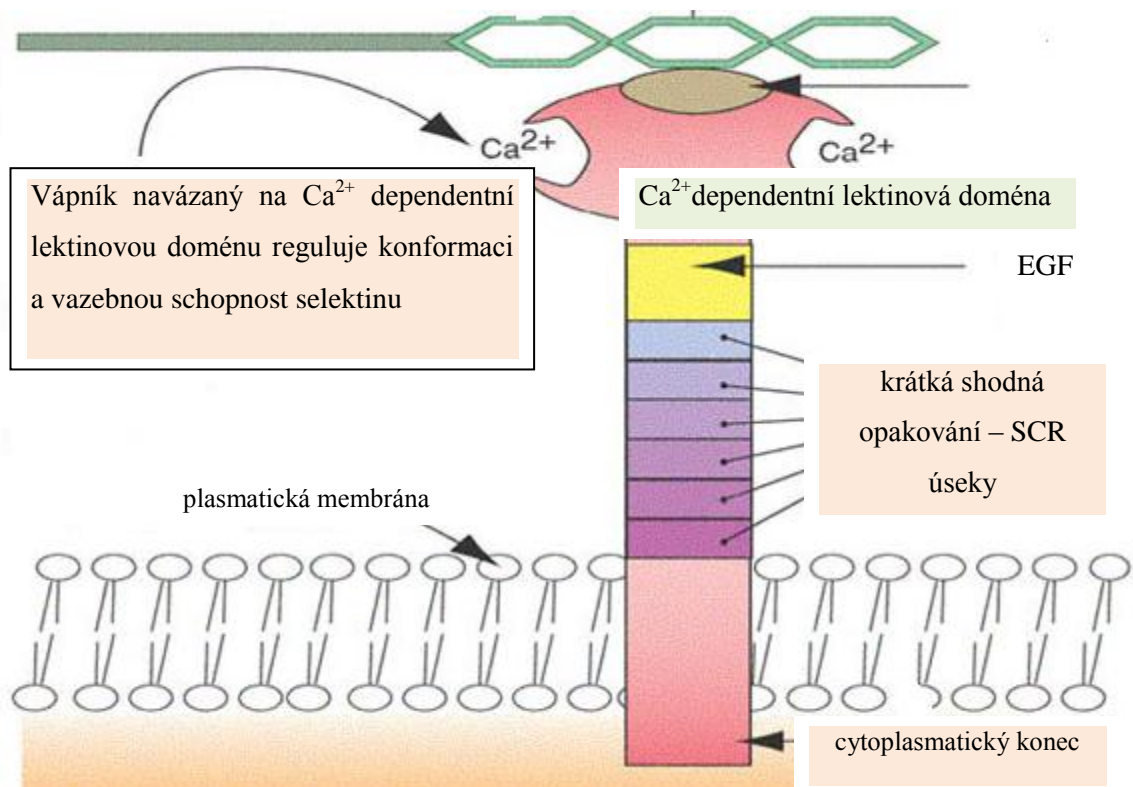
### 5.1.4.1 Struktura

Selektiny jsou membránové glykoproteiny - strukturně se jedná o velmi podobné látky. Každá z nich nese na svém N-konci doménu podobnou lektinu C-typu, kterou se váže na specifické sacharidové struktury jiných buněk. Na ní navazuje struktura podobná faktoru epidermálního růstu a další analogické domény. Selektiny mají zásadní význam na počátku adheze leukocytů k endotelu. Strukturně jsou složeny z (viz. obrázek 5):

- N-terminální  $\text{Ca}^{2+}$ - dependentní lektinové domény
- tzv. EGF domény - domény podobné epidermálnímu růstovému faktoru, napojené na několik opakujících se úseků
- transmembránové oblasti cytoplasmatického konce

(Blankenberg, Barbaux, 2003; Vytášek, 2010)

Obrázek 5: Struktura selektinů



(<http://classes.kumc.edu/som/cellbiology/connections/gapjunctions/index.html>)

### 5.1.4.2 Funkce

Selektiny jsou produkovány jako součást zánětlivé odpovědi organismu, tedy přirozené imunity. Jejich hlavní rolí je interakce mezi leukocyty a endoteliálními buňkami, vzájemná komunikace a adheze. Jedná se o relativně slabé adhezní síly - toto spojení bývá přechodné a umožňuje opakované odpojení se leukocytů od cévní stěny. Následně je umožněno zapojení dalších molekul, jejichž vazba je pevná – např. integrinů. (*Blankenberg, Barboux, 2003; Merten, Thiagarajan, 2004; Vytášek, 2010*).

### 5.1.4.3 P-selektin

P-selektin neboli CD62P je glykoprotein o molekulové hmotnosti 140 000 daltonů. Je nejrozměrnějším ze všech selektinů, dosahuje až 40 nm od endoteliálního povrchu. Nachází se v zásobních  $\alpha$ -granulách trombocytů a Weibel-Paladeho tělískách endoteliálních buněk. Po aktivaci migruje P-selektin na povrch destiček, kde setrvává nejméně jednu hodinu. CD62P byl poprvé definován na povrchu aktivovaných trombocytů. Tam také bývá exprimován v množství až 10x větším než v jakém se nachází běžně na endotelu buněk. Na aktivovaných trombocytech bývá zvýšená exprese P-selektinu zaznamenána především při trombotických stavech – jako je např. ICHS, AIM, CMP či trombóza periferního řečiště. Vyšší hladiny tohoto glykoproteinu nacházíme také u pacientů, kteří trpí chronickým srdečním selháním. P-selektin se podílí na vzájemné interakci trombocytů a leukocytů stejně tak jako na jejich komunikaci s aktivovaným endotelem (*Merten, Thiagarajan, 2004*). Vysoké hladiny solubilního P-selektinu korelují se závažností a stupněm zhoršení progresivní cévní mozkové příhody (*Wang, Zhao, 2013*).

Ligandem pro P-selektin je několik membránových molekul, které obsahují oligosacharidovou strukturu označovanou jako sialyl-Lewis-x antigen ( $sLe^x$ ). Tato sekvence se velmi často vyskytuje právě na povrchu leukocytů. Vazba na  $sLe^x$  má nízkou afinitu. Sialyl-Lewis antigen tvoří 4 specificky navzájem provázané sacharidy: sialová kyselina; galaktosa–N-acetylglukosamin (a fukosa); zbytek oligosacharidového řetězce (*Krieglstein, Granger, 2001*). P-selektin se váže i s molekulou PSGL-1 (P-Selektin Glycoprotein Ligand-1) na leukocytech, kde formuje agregáty. Právě tato interakce P-selektinu s PSGL-1 přispívá k protrombotickému stavu (díky indukované expresi tkáňového faktoru a několika cytokinů). P-selektin se účastní také vzájemného

shlukování trombocytů – tedy hlavnímu faktoru tkáňové trombózy (*Kriegelstein, Granger, 2001; Merten, Thiagarajan, 2004*).

### 5.1.5 VCAM-1

Vaskulární buněčná adhezní molekula 1 neboli CD106 je protein kódovaný genem VCAM-1. Patří k imunoglobulinové nadrodině adhezních molekul a je exprimován na aktivovaných endoteliích. Jedná se o sialoglykoprotein, membránový protein typu I. Zprostředkovává adhezi lymfocytů, monocytů, eozinofilů a bazofilů na cévní endotel. Účastní se také leukocytární-endoteliální transdukce signálů. Předpokládá se, že hraje roli v rozvoji aterosklerózy a revmatoidní artritidy. Při zvýšené genové transkripci VCAM-1 genu (např. jako reakce na TNF- $\alpha$  a IL-1) vzrůstají i hladiny VCAM-1, které jsou typické pro ateroskleroticky změněné cévy. Z počátku aterogeneze pronikají do cévní stěny makrofágy a T-lymfocyty právě pomocí adhezních molekul. Cévní endotel může být aktivován k indukci adhezních molekul stimulací cytokiny, ale také lipopolysacharidy gramnegativních bakterií a hlavně oxidačně modifikovanými částicemi fosfolipidů či hemodynamických stresem. Hypercholesterolemie urychluje nejen oxidaci lipoproteinů a jejich ukládání v arteriální intimě, ale také endoteliální expresi VCAM-1, což dokládá přímý vztah mezi hladinou lipidů v plazmě a intenzitou zánětlivého procesu ve stěně cévy (*Weis, 2002*).

### 5.1.6 Význam adhezivních molekul u kardiovaskulárních onemocnění

Adhezivní molekuly jsou životně důležité pro normální vývoj a funkci srdce a cév, jsou však zapojeny také do patologií kardiovaskulárního systému. Význam při onemocnění kardiovaskulární soustavy mají 3 skupiny adhezivních molekul – integriny, selektiny a nadrodina imunoglobulinů. Účastní se trombotických a aterosklerotických dějů - napomáhají leukocytární infiltraci, hladkosvalové proliferaci i buněčné migraci (*Hillis, Flapan, 1998*).

Počáteční stádia aterogeneze (pronikání monocytů a T-lymfocytů) jsou zprostředkována právě adhezivními molekulami. Po prostupu leukocytů cévní stěnou, dochází k uvolnění různých cytokinů a bioaktivních molekul. Dochází k proliferaci a



migraci hladkosvalových buněk a následné akumulaci pojiva do cévní stěny. Primárně se těchto procesů účastní integriny, dále také molekuly VCAM-1 na povrchu hladkosvalových buněk, kde pomáhají akumulaci leukocytů v ateroskleroticky změněných cévách (*Krieglstein, Granger, 2001*).

Přítomnost integrinů byla prokázána v aterosklerotických plátech a zdá se, že by mohly představovat (při zablokování jejich vlivu) také jeden z možných cílů terapie aterosklerózy. Zablokování funkce integrinů zabraňuje angiogenezi, snižuje růst plaku a tlumí migraci buněk hladkého svalstva do intimy cévní stěny. Naopak někdy může být angiogeneze prospěšná a přispívat k revaskularizaci ischemické tkáně. Adhezivní molekuly se účastní také transplantáční vaskulopatie a restenózy. Integriny se podílejí na akumulaci leukocytů v intimě cév a na patogenezi nestabilní anginy pectoris. Některé molekuly buněčné adheze se nacházejí v solubilní formě v séru. Zvýšené množství solubilních molekul ICAM-1 a E-selektinu byly nalezeny u pacientů s aterosklerózou. U nestabilních koronárních syndromů se zvyšují hladiny P-selektinu (*Wang, Zhao, 2013*) a pravděpodobně tak odráží aktivaci krevních destiček a endotelových buněk. Aktivace endoteliálních buněk zároveň koreluje z vyšší hladinou solubilního E-selektinu. Takto lze předvídat restenózy po periferní angioplastice - blokáda receptorů adheze může být užitečným terapeutickým přístupem k tomuto problému.

Vznik trombu je důležitým rysem chronických cévních onemocnění, je zásadní pro akutní koronární syndromy (*Hillis, Flapan, 1998; Merten, Thiagarajan, 2004*)

Blokáda adhezivních molekul se používá k prevenci a léčbě rejekce různých štěpů. U primátů se odmítnutí transplantovaného srdce se sníží po aplikaci anti-ICAM-1 a anti-VCAM-1 protilátky. Adhezivní molekuly se účastní také infarktu myokardu, virové myokarditidy a kardiomyopatie, kde jejich přítomnost koreluje s infiltrací zánětlivých buněk.

Existují klinické studie využívající protilátky schopné blokovat leukocytární integriny, ICAM-1, nebo selektiny, aby se zabránilo reperfučnímu poškození na zvířecích modelech (infarktu myokardu) a naznačují tak terapeutický potenciál (*Kappers, Sleijfer, 2009; Cuzzocrea, Impellizzeri, 2013*).

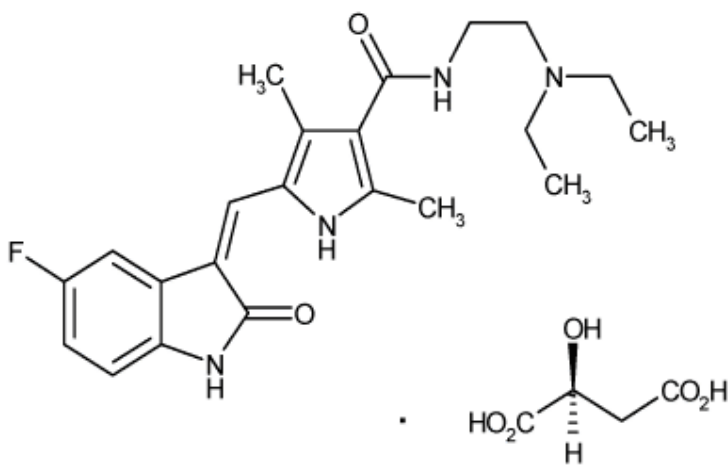
## 6 Sunitinib

Sunitinib, dříve označovaný SU11248, je cytotoxická látka, patří mezi tzv. malé molekuly, multikinázové inhibitory. Tento tyrosinkinázový inhibitor slouží k léčbě generalizovaného světlobuněčného karcinomu ledviny, gastrointestinálního stromálního tumoru (GIST) a neuroendokrinního nádoru pankreatu (*Ostřížková, Brančíková, 2011*).

### 6.1 Struktura

Chemicky se jedná o N-[2-(diethylamino)ethyl]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidyl)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxamid. Používá se ve formě žluté soli jako sunitinib malát.

**Obrázek 6: Strukturní vzorec sunitinibu**



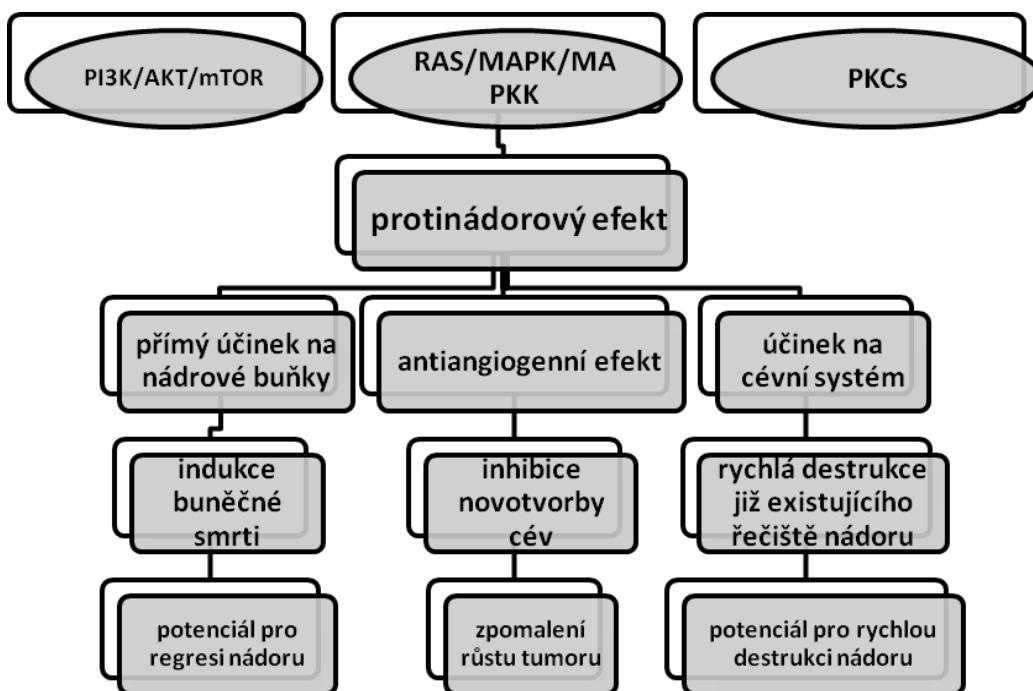
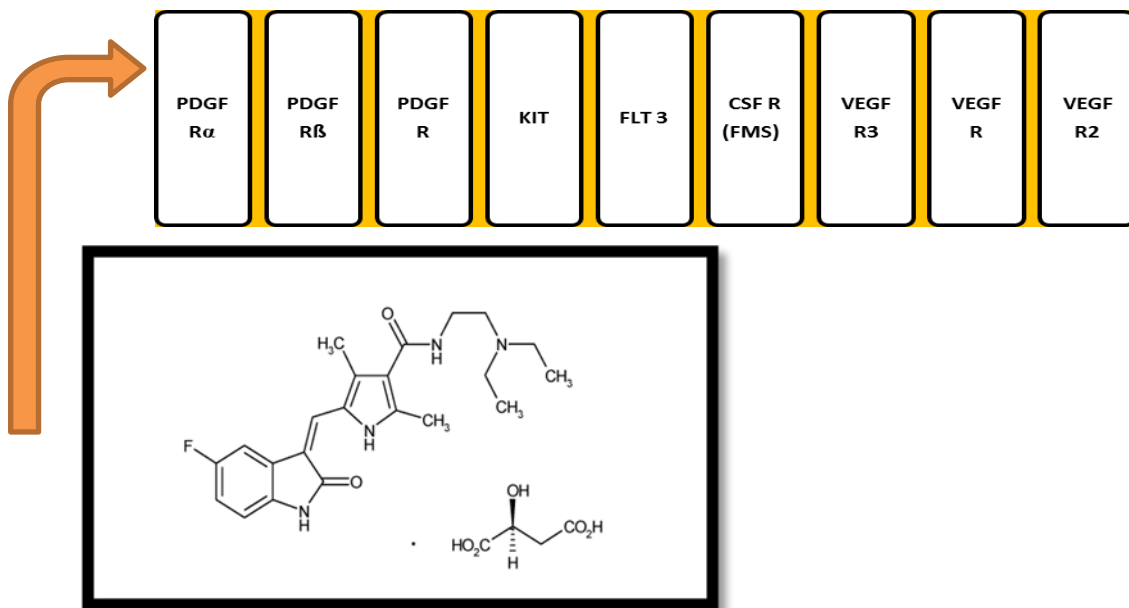
(*Brančíková, Adámková Krákorová, 2008*)

### 6.2 Mechanismus účinku

Sunitinib patří mezi tyrosinkinázové inhibitory. Působí cíleně na specifické – receptory (RTKs) nádorových buněk. Váže se na tyrosinkinázové domény nádorových receptorů a znemožňuje vazbu ATP (adenosintrifosfát – slouží jako zdroj fosfátu),

fosforylaci aminokyseliny tyrosinu a blokuje aktivaci intracelulárních signálních drah. Tlumí tak neoangiogenezi, snižuje krevní zásobení buněk tumoru, inhibuje buněčný růst a proliferaci, podporuje apoptózu. Mezi cílové struktury sunitinibu patří receptorové i nereceptorové tyrosinkinázy VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR, PDGFR, KIT, RET a FLT3 (viz. obrázek 7). Nadměrná aktivita signálních drah některého z těchto receptorů je základním prediktorem účinnosti léčby sunitinibem (Brančíková, Adámková Krákorová, 2008).

Obrázek 7: Mechanismus účinku sunitinibu



(Brančíková, Adámková Krákorová, 2008)

## 6.2.1 Ovlivnění angiogeneze

Angiogeneze představuje klíčový krok k proliferaci tumoru, jeho expanzi a metastazování. Bez cévního zásobení nemůže nádor dosáhnout rozměru většího než 1–2 mm<sup>3</sup>. Nejdříve je nádor vyživován kyslíkem a živinami prostřednictvím difuze, jakmile však jeho velikost přesáhne 0,5 mm, přestává difuze stačit (*Lowery, Han, 2011*)

Hypoxický nádor se chová geneticky nestabilně, dochází k mutacím genů, vzniká nový genotyp se zvýšenou tvorbou angiogenních faktorů. Tomuto proces bývá označován jako angiogenní „switch“, který zahajuje neoangiogenezi. K nádorovému ložisku migrují endotelie, dochází k poškození bazální membrány a migraci nádorových buněk, které následně mohou metastazovat. Dochází k vaskularizaci nádoru, které umožní jeho perfuzi a růst. Nádorové buňky a endotelie na sebe vzájemně parakrinně působí. V průběhu vaskulárního stadia nádorové angiogeneze dochází ke změnám v poměru angiogenních a antiangiogenních faktorů, k morfologickým změnám buněk endotelu, k uvolnění proteolytických enzymů, k migraci endotelií a kapilární morfogenezi k reprodukci endotelií a k mikrovaskulární diferenciaci (*Lowery, Han, 2011; Lorenzo, Autorino, 2009*).

Maligní buňky mohou exprimovat proangiogenní i antiangiogenní faktory. Za fyziologických okolností je angiogeneze regulována rovnováhou těchto faktorů, u nádorově změněných tkání však dochází k narušení rovnováhy ve prospěch angiogeneze. Nadměrná tvorba angiogenních faktorů je způsobena především nedostatkem živin a hypoxií, která vede ke zvýšené expresi VEGF i dalších angiogenních faktorů. Nejlépe prozkoumána je transdukční signální kaskáda VEGF-VEGFR, a proto je také nejčastějším cílem protinádorových léčiv (*Lorenzo, Autorino, 2009*).

Nízkomolekulární inhibitory VEGFR, ke kterým patří např. sunitinib, u některých pacientů mohou vyvolat krátkodobé zvýšení koncentrace VEGF, což je příznivým prognostickým faktorem a zároveň prediktorem léčebné odpovědi. Antiangiogenně působí tyto látky pouze omezenou dobu. Po několika týdnech až měsících dochází ke vzniku rezistence a k opětovnému nádorovému růstu (*Lowery, Han, 2011; Lorenzo, Autorino, 2009*).

## 6.3 Schválené indikace

Sunitinib slouží k léčbě metastatického renálního adenokarcinomu, k léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru u nemocných rezistentních k léčbě imatinibem a k léčbě neuroendokrinních nádorů pankreatu. V případě renálního karcinomu je účinný jak v I. linii léčby metastatického a recidivujícího onemocnění, tak po selhání imunoterapie. V léčbě GIST (gastrointestinálního stromálního tumoru) se sunitinib používá jako léčba II. linie inoperabilního onemocnění rezistentního na imatinib mesylát (*SUTENT: souhrn údajů o přípravku, AISLP, 2013*).

### 6.3.1.1 Renální karcinom

Primární léčbou a zároveň jedinou kurativní modalitou u karcinomu ledviny je léčba chirurgická. Radioterapie se uplatňuje především v paliativní léčbě rozsáhlých nádorů ledviny nebo u kostních či mozkových metastáz.

Na základě výsledků klinické studie fáze III, byl již v roce 2007 na kongresu ASCO sunitinib označen jako standard v I. linii léčby metastatického renálního karcinomu, převážně světlouněčného typu. Pacienti, kteří užívali sunitinib měli signifikantně delší dobu přežití v porovnání s pacienty léčenými interferonem. Sunitinib může být též podáván jako léčba II. linie generalizovaného karcinomu ledvin po selhání terapie cytokiny (*SUTENT: souhrn údajů o přípravku, AISLP, 2013*).

### 6.3.1.2 GIST – Gastrointestinální stromální tumor

Sunitinib slouží k léčbě neresekabilního a/nebo metastatického maligního gastrointestinálního stromálního tumoru po selhání léčby imatinib mesylátem. Základní léčbou GIST je radikální chirurgická intervence. U 44–80% nemocných dojde k lokálnímu relapsu onemocnění, často provázeným výskytem jaterních metastáz. Imatinib mesylát je určen k léčbě Kit-positivního neresekabilního nebo metastatického gastrointestinálního stromálního tumoru. Kompletní remise dosáhlo 5% pacientů, parciální remise 47% pacientů a stabilizace onemocnění 32% nemocných. Přibližně 5% nemocných ale léčbu imatinib mesylátem netoleruje, 15% onkologických pacientů je na tuto léčbu rezistentní. Všem těmto je možné poskytnout sunitinib jako II. linii biologické léčby GIST.

Sunitinib působí cíleně na receptory nádorových buněk; váže se na aktivní místo proteinkinázy, čímž brání fosforylaci proteinů a přenosu signálu do buňky. Sunitinib se váže na více různých proteinkináz a má mnohem vyšší afinitu k c-Kit (u pacientů s GIST deregulována) než imatinib mesylát. Většinou reagují pacienti na léčbu imatinibem 18 - 24 měsíců, kdy nastává rezistence k této léčbě. Sunitinib má odlišnou strukturu, může se tedy stále vázat na kinázové domény a zablokovat buněčnou proliferaci u pacientů rezistentních k léčbě imatinibem (*SUTENT: souhrn údajů o přípravku, AISLP, 2013*).

### **6.3.1.3 Neuroendokrinní nádory pankreatu (pNET)**

Neuroendokrinní tumory (NET) trávicího traktu jsou relativně vzácné nádory, které se svojí histologií, strukturou i biologickým chováním liší od běžných epitelových nádorů.

Radikální chirurgické nebo endoskopické metody odstranění nádoru jsou prakticky jedinou možnou kurativní léčbou. Léčba sunitinibem patří mezi paliativní léčbu u pokročilých stádií NET dosažením cytoredukce. Je indikována hlavně u rychle progredujících NET. Na ASCO (Clinical Oncology Annual Meeting – Kongres klinické onkologie) 2010 v Chicagu byla publikována studie III. fáze, která prokázala prodloužení mediánu doby do progresu onemocnění u pacientů s NET léčených sunitinibem oproti placebu. Na základě této registrační studie byla terapie schválena EMA pro indikaci pNET – neresekovatelných či metastatických dobře diferencovaných a progredujících pankreatických neuroendokrinních nádorů (*Ostřížková, Brančíková, 2011*).

## **6.4 Nežádoucí účinky**

Mezi závažné nežádoucí účinky, které se projevily při podávání sunitinibu patří plicní embolie (1%), trombocytopenie (1%), krvácení do tumoru (0,9%), febrilní neutropenie (0,4%) a hypertenze (0,4%). Hepatitida a jaterní selhání se objevily u < 1% pacientů a prodloužení intervalu QT u < 0,1% nemocných. V klinických studiích bylo pozorováno snížení ejekční frakce levé komory (LVEF) o  $\geq 20\%$  a pod dolní hranici normálních hodnot u 2–4% pacientů užívajících sunitinib a u 2% pacientů dostávajících placebo.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky, které se projevily nejméně u 20 % pacientů při léčbě sunitinibem patří gastrointestinální obtíže (diarhoe, nauzea, stomatitida, dyspepsie a zvracení), únava, změna pigmentace kůže, anorexie a poruchy chuti (*SUTENT: souhrn údajů o přípravku, AISLP, 2013*).

### 6.4.1 Hypertenze a kardiovaskulární příhody

Hypertenze patří mezi základní nežádoucí účinky vyvolané inhibitory angiogeneze. K antiangiogenním lékům patří velká skupina molekul s různým mechanismem účinku.

Rozlišujeme dvě základní skupiny - přímé a nepřímé inhibitory angiogeneze. Přímé inhibitory angiogeneze blokují cestu angiogeneze, zatímco nepřímé inhibitory většinou potlačují biologickou aktivitu angiogenních faktorů zásahem do jejich tvorby či biologické aktivity, nebo interferencí s jejich receptory. Sunitinib patří mezi nepřímé inhibitory angiogeneze. Prevalence hypertenze je u pacientů s nádorovým onemocněním, před zahájením léčby tyrozinkinázovými inhibitory, podobná jako u zbytku populace.

Sunitinib pravděpodobně omezuje funkci receptorů pro vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) a destičkový růstový faktor (PDGF) - VEGFR a PDGFR, které se nacházejí ve značné míře na pericytech a endoteliích. Dochází tak k poškození cévního endotelu. Snížené hladiny cirkulujícího VEGF pravděpodobně hrají důležitou roli v rozvoji hypertenze.

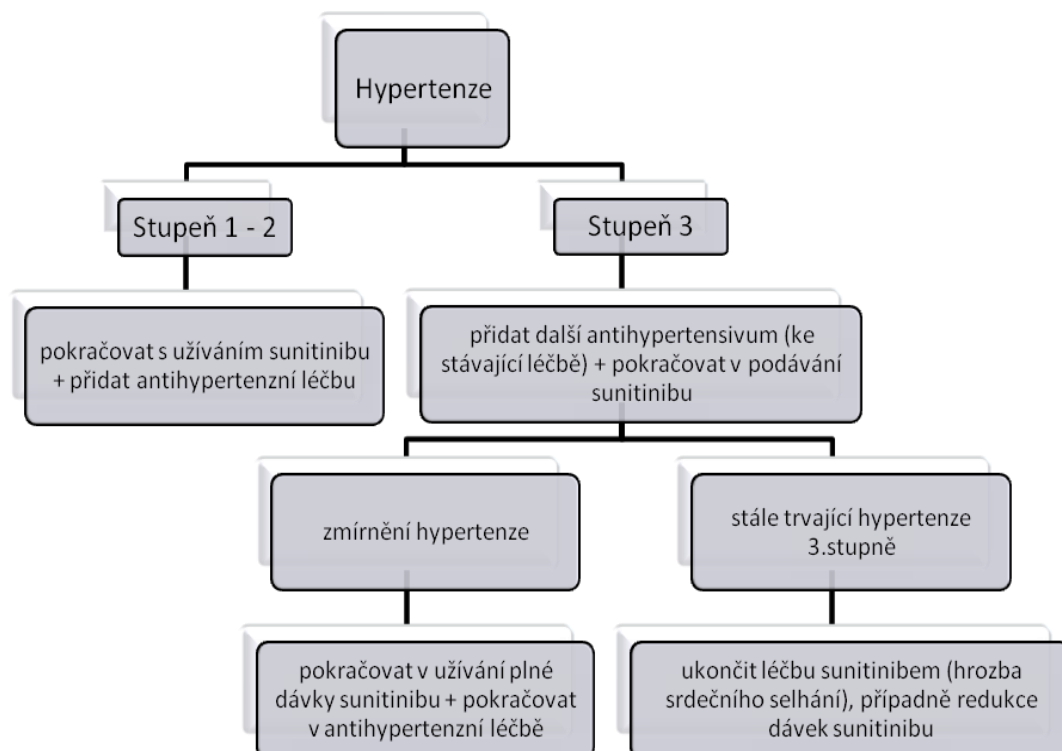
Není – li hypertenze léčena, může tento nežádoucí účinek vést k infarktu myokardu, krvácení či cévní mozkové příhodě. Management hypertenze pacienta léčeného sunitinibem znázorňuje obrázek 8. Při hypertenzi vzniklé či progredující na základě užívání sunitinibu není žádoucí onkologickou terapii přerušovat. Obvykle optimalizujeme antihypertenzní léčbu – navyšujeme dávky antihypertenziv, případně přidáváme další antihypertenzivum do kombinace a snažíme se v podávání sunitinibu pokračovat (*Lorenzo, Autorino, 2009*).

Analýzy studií však ukazují, že hypertenze vyvolaná podáváním sunitinibu obvykle koreluje s účinností onkologické léčby (*Bono, Rautiola, 2011; Rixe, Billefont, 2007*). Po farmakologické korekci této iatrogenní hypertenze, zůstává původní účinnost léčby sunitinibem pro pacienta zachována. Pro antihypertenzní léčbu pacientů léčených



sunitinibem jsou nejvhodnějšími léčivy lisinopril (nejméně interferuje s metabolismem P450) a amlodipin, který je vhodný k rychlé úpravě krevního tlaku. Bohužel zatím není možné výběr chemoterapeutika řídit podle výskytu hypertenze. Není totiž předem jasné, u kterého z pacientů se nakonec hypertenze projeví (Sheila, Doggrella, 1998).

**Obrázek 8: Management hypertenze u pacienta léčeného sunitinibem**



(Lorenzo, Autorino, 2009)

#### 6.4.1.1 Antiangiogenní působení

Novotvorba krevních kapilár neboli angiogeneze vede k remodelaci či novotvorbě kapilární sítě v poškozené, traumatem či nekrózou změněné tkáni. Angiogeneze je nezbytnou součástí hojení ran (např. infarktu myokardu). Angiogeneze je přítomna také při zánětlivých procesech a při vzniku a vývoji nádorů.

Angiogeneze má klíčový význam pro nádorový růst a metastazování, což je regulováno několika růstovými (angiogenními) faktory a jejich receptory. Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a jeho receptory zde hrají zásadní roli. Inhibice angiogeneze jakožto strategie protinádorové léčby byla poprvé popsána v r. 1971 Folkmanem (Folkman, 1971).

Potlačení angiogeneze je bohužel provázeno vedlejšími nežádoucími účinky, zvláště pak hypertenzí, která byla zaznamenána až u 60% pacientů léčených sunitinibem (*Stary, Chandler, 1995*).

Pravděpodobně je tento fenomén způsoben poklesem hladiny NO. Hypertenze se objevuje u pacientů i u zvířat již po prvním dnu podávání sunitinibu. Užívání sunitinibu také koreluje s rostoucími hladinami endotelinu (ET-1). Endotelin-1 je ve velké míře produkován endoteliálními buňkami, přesto se předpokládá, že nárůst plazmatických hladin po podání sunitinibu není endoteliálního původu (*Kappers, Sleijfer, 2009; Rixe, Billemont, 2007*).

VEGF zvyšuje hladinu endoteliální NO syntázy a tedy i produkci vazodilatátoru – oxidu dusnatého. Inhibice VEGF signalizace vede k nižší produkci NO, snížené vazodilataci a následně i k hypertenzi (*Bono, Rautiola, 2011*).

Expozice sunitinibu je asociována s generalizovaným poškozením funkce hladkosvalových buněk cév. Během léčby sunitinibem byla kromě hypertenze zaznamenána také hypertrofie kardiomyocytů a strukturální změny na mitochondriích. Poškozením mitochondriálních funkcí, dojde sekundárně ke snížení produkce ATP a postupnému vzniku kardiální dysfunkce. V klinických studiích bylo prokázáno, že sunitinib na rozdíl od sorafenibu, ovlivňuje funkci mitochondrií až při užívání v supraterapeutických dávkách (*Bono, Rautiola, 2011; Rixe, Billemont, 2007; Sheila, Doggrella, 1998*).

## **7 Experimentální část**

### **7.1 Materiál a metody**

#### **7.1.1 Experimentální kmeny zvířat**

K experimentu byly použity dva kmeny potkanů - inbrední kmen SHR spontánně hypertenzních potkanů a inbrední kmen WKY normotenzních potkanů. SHR i WKY potkani byli rozděleni na 4 pokusné skupiny, v každé z nich bylo 6 zvířat – celkem jsme tedy pro pokus použili 24 potkanů. Polovina zvířat dostávala sunitinib (10 mg/kg za den v pitné vodě), polovina pouze vodu (kontrolní placebo). Iniciální fáze studie - podávání sunitinibu nebo placebo – trvala 8 týdnů, následovala 5 denní pauza a opětovné podávání léku či placebo po dobu 8 týdnů (schéma aplikace: 8 týdnů/5 dnů pauza/8 týdnů). Potkani byli ve věku 2 - 3 měsíců. Počáteční hmotnost normotenzních potkanů typu WKY byla 310,14 g u kontrolní skupiny a 294,33 g u stejných zvířat kmene WKY dostávajících sunitinib (10 mg/kg za den v pitné vodě). Průměrná hmotnost zvířat SHR kmene byla u potkanů kontrolní skupiny 238,56 g. U stejné skupiny zvířat, které byl však podáván od počátku sunitinib byla průměrná hmotnost 250,78 g.

#### **7.1.2 Imunohistochemie**

Tkáně byly ponořeny do zmrazovacího média, následně zmrazeny v tekutém dusíku. Preparáty jsme nakrájeli na mikrotomu a dále byly uskladněny při -80°C.

Pro detekci exprese P-selektinu v endotelu aort potkanů byla použita metodika ABC (avidin-biotin complex) s detekcí pomocí DAB (diaminobenzidin – 10µl DAB v 500µl pufru), který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci. Samotná vazba antigen - protilátka ve tkáni probíhá bez viditelné reakce. Pro možné pozorování preparátu je nezbytné k detekci lokalizace antigenu a na něj navázaných molekul protilátky v preparátu použít chromogenů, např. DAB. Pro značení imunochemických metod se používají stabilní enzymy. Vizualizace probíhá metodou katalytické histochemie. V našem případě byla použita imunoperoxidázová technika.

Principem této metody je označení místa, kde došlo ke specifické reakci. Zviditelnili jsme ji pomocí peroxidázy, kdy vznikl hnědý nerozpustný pigment. (používá se zejména křenová peroxidáza). Oxidací původně rozpustného DAB, který se této reakce (peroxidáza + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) účastní jako donor elektronů, vzniká stabilní hnědý produkt, který je nerozpustný v alkoholu a proto se během dehydratace před montováním řezů nevyplaví (*Beranová, Tonar, 2002*).

### 7.1.3 Pomůcky a přístroje

- zkumavky a špičky (Eppendorf®)
- podložní a krycí sklička
- mikropipeta (Eppendorf Research® Plus)
- váhy (Z5 BOECO, Germany)
- míchačka magnetická (BIOSAN MMS-3000)
- chirurgické nástroje – pinzeta anatomická, pinzeta chirurgická, nůžky oční zahnuté, 2 peany, pinzeta oční zahnutá
- digestoř
- vortex (MS2 Minishaker, IKA®)
- termostat (Biological thermostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha)
- mikrotom (LEICA CM 1850 UV)
- světelný mikroskop Olympus AX 70 s digitální firewire kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp. Ottawa, Kanada)
- PAP pen

### 7.1.4 Roztoky a činidla

- primární protilátka – goat P-selectin 1:50 (M-20)-SC6943 (Santa Cruz Biotechnology, USA)
- sekundární protilátka – horse-anti-goat 1:400 (DAKO, USA)
- aceton (Fagron a.s., Olomouc)
- anti – avidin (Vector Laboratories, Inc. Burlingame)
- anti – biotin (Vector Laboratories, Inc. Burlingame)
- PBS – fosfátový pufr (phosphate buffered saline)

- 10% horse serum (Sigma)
- 3% peroxid vodíku (Fagron a.s., Olomouc)
- DAB – diaminobenzidín (DAB substrát-chromogen, DAKO, USA)
- ABC komplex (avidin-biotin komplex); (Vector Laboratories, Inc. Burlingame)
- hematoxylin (Verkon s.r.o., Praha)
- xylen (Lach-Ner, s.r.o., Česká republika)
- aceton-xylen (10:1)
- aceton-xylen (1:10)
- Eukitt (Sigma Aldrich, Německo)

### 7.1.5 Experimentální model

Kmenu SHR potkanů byl podáván sunitinib. Jako kontrola sloužila skupina normotenzních WKY potkanů - dostávali pouze vodu. Podávání sunitinibu trvalo celkem 8 týdnů (dvojnásobek doporučené doby léčby u pacientů). Po uplynutí 8 týdnů potkani zůstali 5 dní bez léčby (podávání sunitinibu/placeba), následovalo další podávání sunitinibu – u kmene SHR potkanů 8 týdnů (vcelku 16 týdnů), u normotenzních WKY potkanů pouze 2 týdny (celkem 10 týdnů).

Zvířatům byla po usmrcení odebrána aorta a zamražena do OCT média. Po 7 - 10 dnech byly cévy nakrájeny na mikrotomu, za následujících 7 - 10 dní použity pro imunohistochemické metody.

Imunohistochemie nám umožnila pozorovat expresi P-selektinu v aortě a to jak u spontánně hypertenzních potkanů (SHR), tak u normotenzních potkanů (WKY) s ohledem na podávání cytostatika sunitinibu.

K detekci byla použita imunoperoxidázová technika za použití DAB (diaminobenzidinu) jako chromogenu – sledovali jsme vliv sunitinibu na expresi P-selektinu u normotenzních a hypertenzních potkanů.

### 7.1.6 Pracovní postup – Metodika ABC

Metoda avidin-biotin komplexu (ABC) je nepřímá trojstupňová imunohistochemická metoda. Je založena na pevné neimunologické a druhově nespecifické vazbě avidinu (vaječný glykoprotein bílku) s vitamínem biotinem. Avidin

má některá vazebná místa obsazena komplexem biotin-peroxidáza a některá jsou připravena k navázání s biotinylovanou molekulou protilátky (tzv. můstkem). Princip metody spočívá ve značení sekundární protilátky biotinem a jeho následné vazbě s ABC (avidin-biotinovým komplexem) značeným křenovou peroxidázou. Enzymatická aktivita tohoto katalyzátoru nám pak indikuje oblasti tkáňového preparátu, kde došlo k primární specifické reakci (*Beranová, Tonar, 2002*).

Nejdříve jsme nechali na vzduchu 30 minut sušit zmražené tkáňové řezy (na podložním sklíčku). Po rozmražení jsme tkáň vložili do roztoku acetonu uchovávaného v  $-20^{\circ}\text{C}$  a po 30 minutách jsme je vyjmuli a nechali sušit. Tímto postupem jsme docílili fixace řezů a zajistili jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Tkáňové řezy jsme pak obkreslili pomocí PAP pera – vytvořili jsme tak hydrofobní kruh na podložním sklíčku, což nám umožnilo použít co nejmenší množství drahých reagentů v průběhu celého experimentu. Preparát jsme poté vložili na 5 minut do kyvety s PBS pufrem (Phosphate Buffered Saline; fosfátový pufr).

Před nanesením primární protilátky bylo nutné nejprve zablokovat nespecifickou imunitní reakci inkubací s 10% roztokem horse séra v pufru PBS (po dobu 30 minut). Dále jsme preparát nechali inkubovat s anti-avidinem (po dobu 15 minut). Sklíčko jsme opláchli v PBS a vložili do roztoku s anti-biotinem (na dalších 15 minut). Pro oplach jsme preparát znovu vložili do kyvety s roztokem PBS.

Pro detekci exprese P-selektinu jsme použili primární protilátku - goat P-selectin 1:50 (v koncentraci 1  $\mu\text{l}$  protilátky + 50  $\mu\text{l}$  BSA). Inkubace s primární protilátkou trvala 60 minut. Následoval oplach tkáně v PBS (2 krát po 5 minutách). Pak přišla na řadu reakce se sekundární protilátkou horse-anti-goat (v koncentraci 1:400 – v BSA + 2% rat sérum). Tkáň jsme nechali inkubovat s roztokem sekundární protilátky 30 minut a posléze jsme sklíčka s tkáňovými řezy opět opláchli vložení do roztoku PBS pufru na 5 minut.

Endoperoxidázovou reakci jsme zablokovali ponořením preparátu (po dobu 15 minut) do 3% roztoku  $\text{H}_2\text{O}_2$  a PBS (roztok jsme připravili těsně před použitím). Peroxidázy se běžně vyskytují také ve zpracovávané tkáni potkanů a mohly by tak znehodnotit výsledky ve smyslu falešně pozitivní reakce. Po opětovném oplachu v PBS (2 krát po 5 minutách) jsme na tkáň aplikovali ABC komplex (sloužící k zesílení signálu) z detekční soupravy a nechali jsme probíhat reakci 30 minut při pokojové teplotě. ABC komplex jsme si předem připravili z 12  $\mu\text{l}$  roztoku Avidinu, 12  $\mu\text{l}$  roztoku

Biotinu a 600  $\mu$ l PBS a směs jsme nechali 30 minut před použitím ustálit. Po inkubaci s ABC komplexem, jsme sklíčka ponořili do PBS (2 krát po 5 minutách).

Pro vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu jsme použili jako chromogen diaminobenzidin. Tato vizualizace probíhala po dobu 45 sekund. Řezy jsme opláchli v roztoku PBS. Poté se dobarvila jádra v hematoxylinu po dobu 5 sekund s následným modráním pod tekoucí vodou z kohoutku (po dobu 1 minuty).

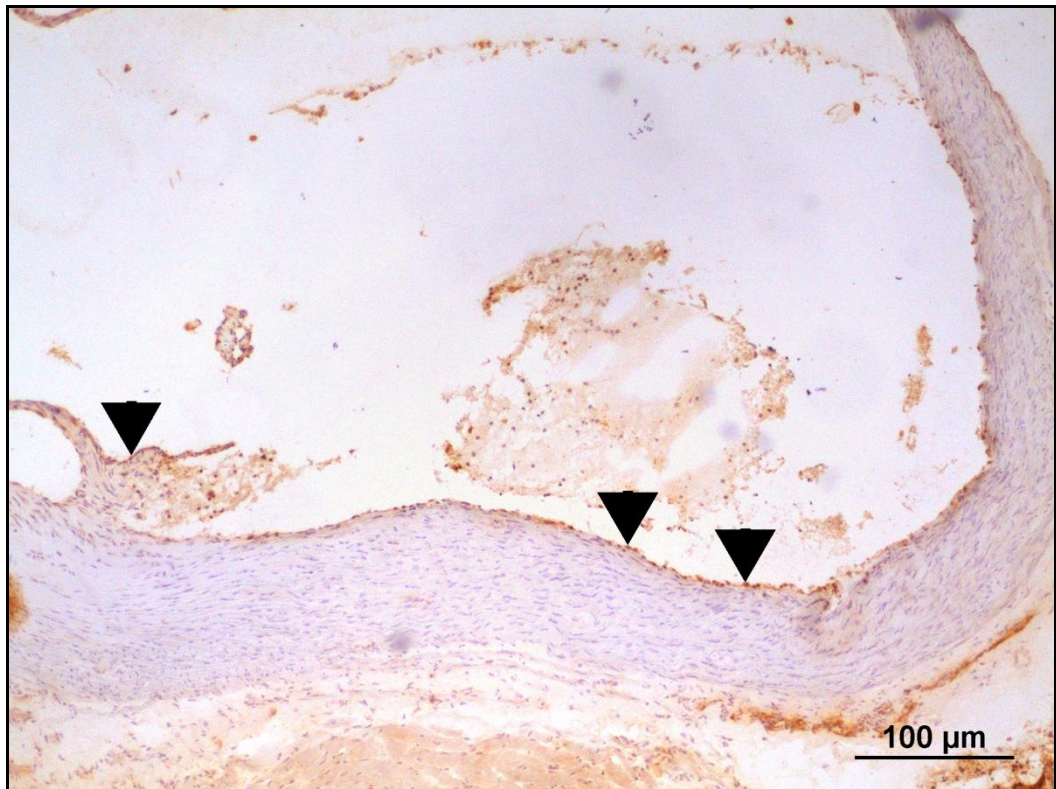
Pro následnou přípravu trvalých preparátů jsme sklíčka s řezy vypláchli v destilované vodě – vymyli jsme přebytečnou barvu a preparáty jsme odvodnili vzestupnou alkoholovou řadou: aceton  $\rightarrow$  aceton-xylen (10:1)  $\rightarrow$  aceton-xylen (1:10)  $\rightarrow$  xylen. Poté jsme vytvořili konečný preparát pomocí montážního média Eukit (pryskyřice) a to tak, že jsme umístili malou kapku média na místo řezů a přikryli ji krycím sklíčkem. Opatrně jsme vytlačili případné bubliny. Preparáty jsme sledovali pod světelným mikroskopem.

## 7.2 Výsledky

Neprokázáli jsme expresi P-selektinu v endotelu aorty u žádné ze čtyř experimentálních skupin zvířat – ani u SHR kmene ani u WKY kmene potkanů. Nebyla nalezena předpokládaná závislost mezi podáváním léčiva sunitinibu a navozením cévního poškození - endoteliální dysfunkce. Mezi endotelem cévní stěny potkanů, kterým byl podáván sunitinib a endotelem potkanů dostávajících placebo (pouze vodu) jsme nezaregistrovali významný rozdíl. Nikde nedocházelo k pozitivní reakci detekující expresi P-selektinu. Jako pozitivní kontrolu jsme použili potkany s isoprenalinem indukovaným poškozením cévní stěny. Pozitivní kontrola nám prokázala optimální nastavení podmínek experimentu, reaktivitu použitých protilátek. Expresie P-selektinu na endoteliálních buňkách je v těchto preparátech zbarvena hnědě díky DAB.

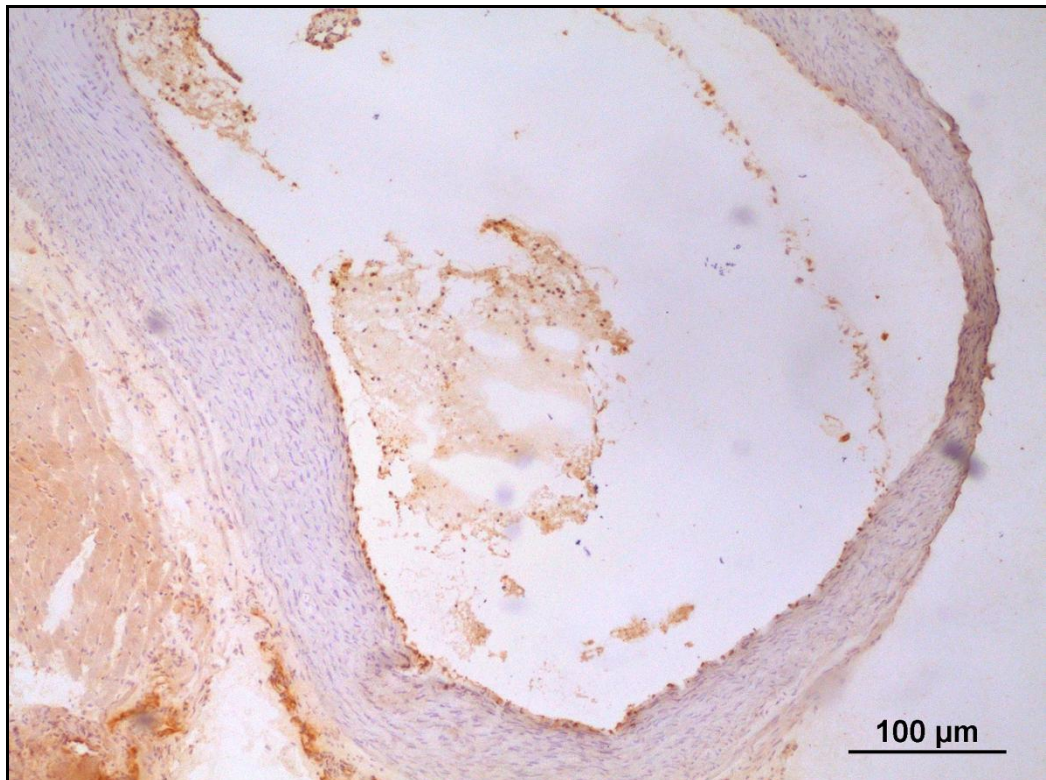


**Obrázek 9: Imunohistochemická detekce exprese P-selektinu**



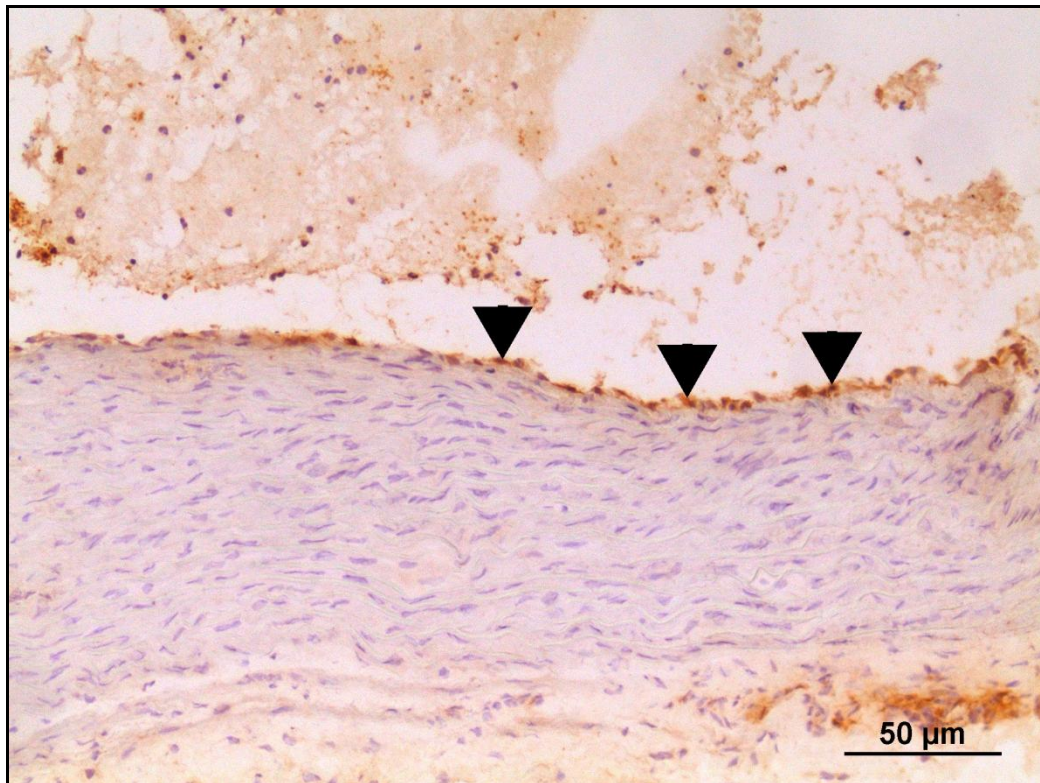
Pozitivní kontrola – potvrzuje reaktivitu použitých protilátek; jedná se o isoprenalinem indukované poškození cévy laboratorního potkana. Černé šipky značí indukovanou expresi P-selektinu na cévním endotelu. Zvětšení 40x

**Obrázek 10: Imunohistochemická detekce exprese P-selektinu**



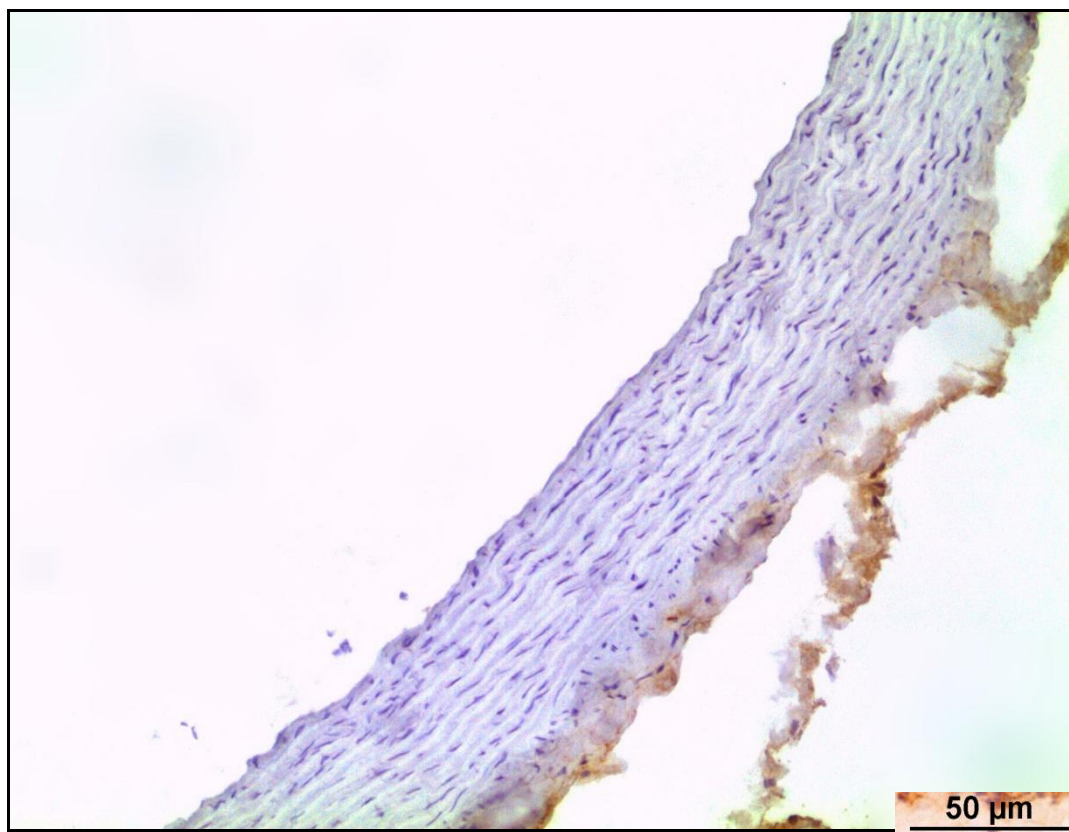
Pozitivní kontrola – potvrzuje reaktivitu použitých protilátek; jedná se o isoprenalinem indukované poškození cévy laboratorního potkana. Expese P-selektinu je znázorněna hnědým zbarvením cévního endotelu díky DAB. Preparát je dobarven hematoxylinem. Zvětšení 40x

**Obrázek 11: Imunohistochemická detekce exprese P-selektinu**



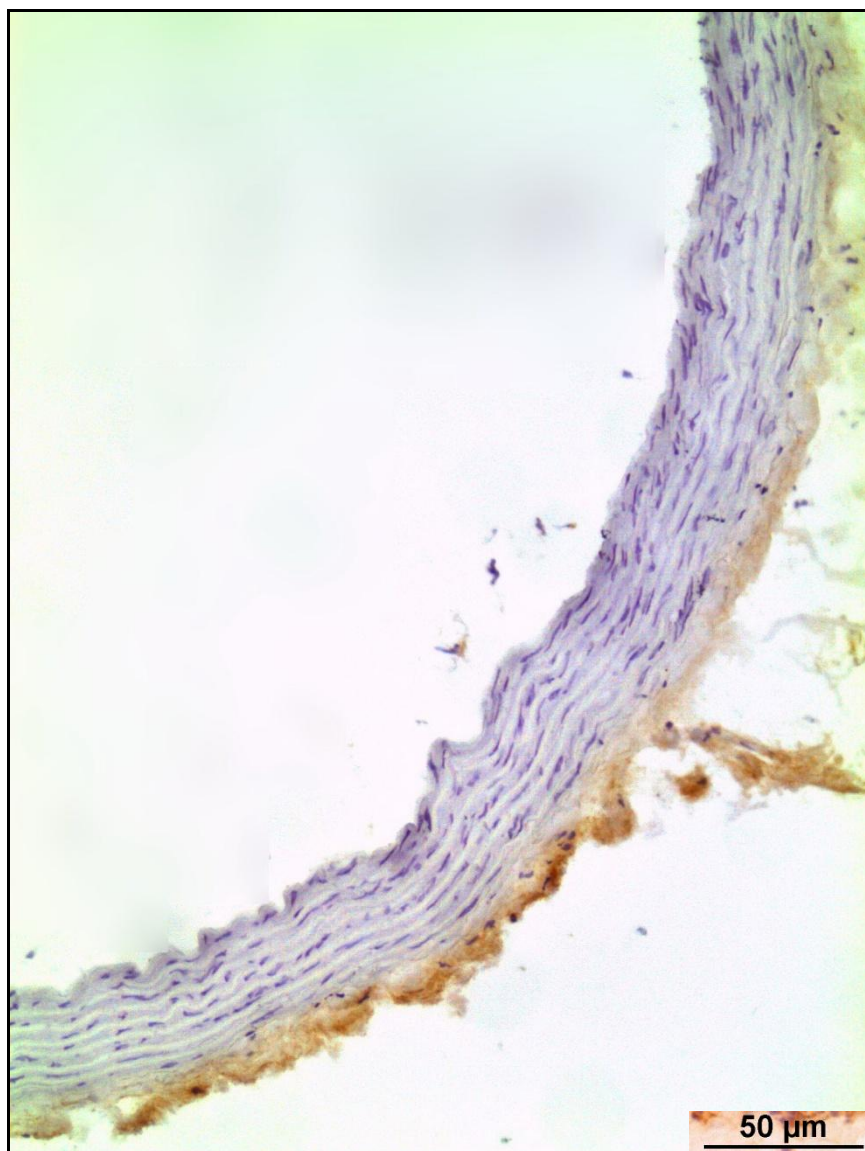
Pozitivní kontrola – potvrzuje reaktivitu použitých protilátek; jedná se o isoprenalinem indukované poškození cévy laboratorního potkana. Exprese P-selektinu je znázorněna hnědým zabarvením cévního endotelu díky DAB. Preparát je dobarven hematoxylinem. Zvětšení 100x

**Obrázek 12: Imunohistochemická detekce P-sektinu u kmene SHR potkanů, kterým byl podáván sunitinib - bez reakce**



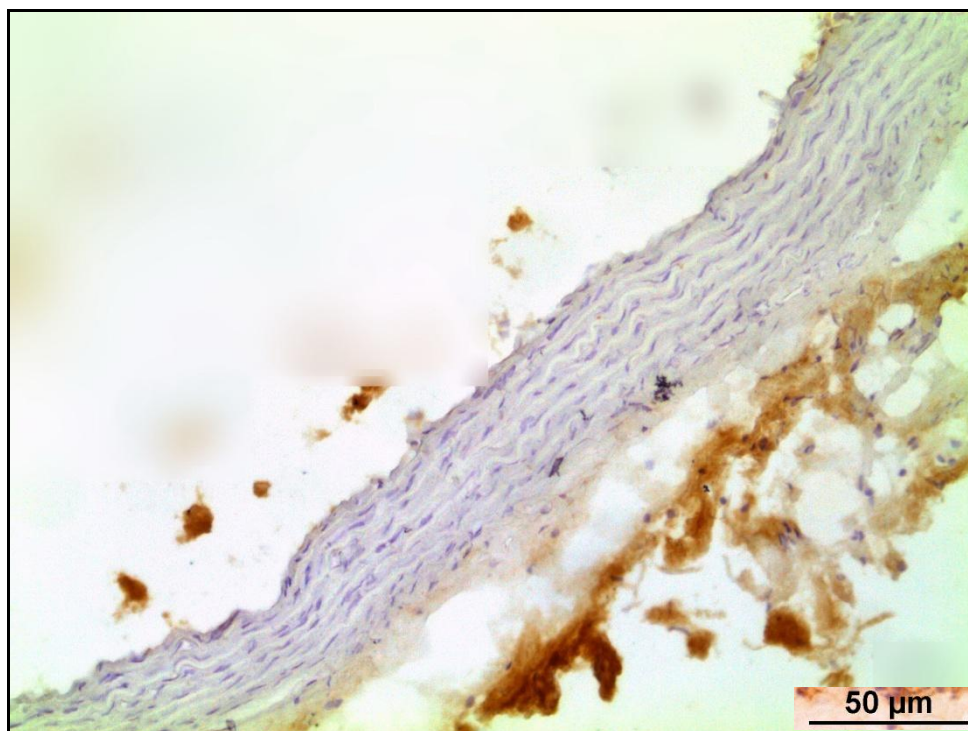
Expres P-sektinu u kmene SHR potkanů léčených sunitinibem nebyla prokazatelná jako v případě potkanů s isoprenalinem indukovaným poškozením cévní stěny. Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x

**Obrázek 13: Imunohistochemická detekce P-sektinu u kmene SHR potkanů, kterým byl podáván sunitinib - bez reakce**



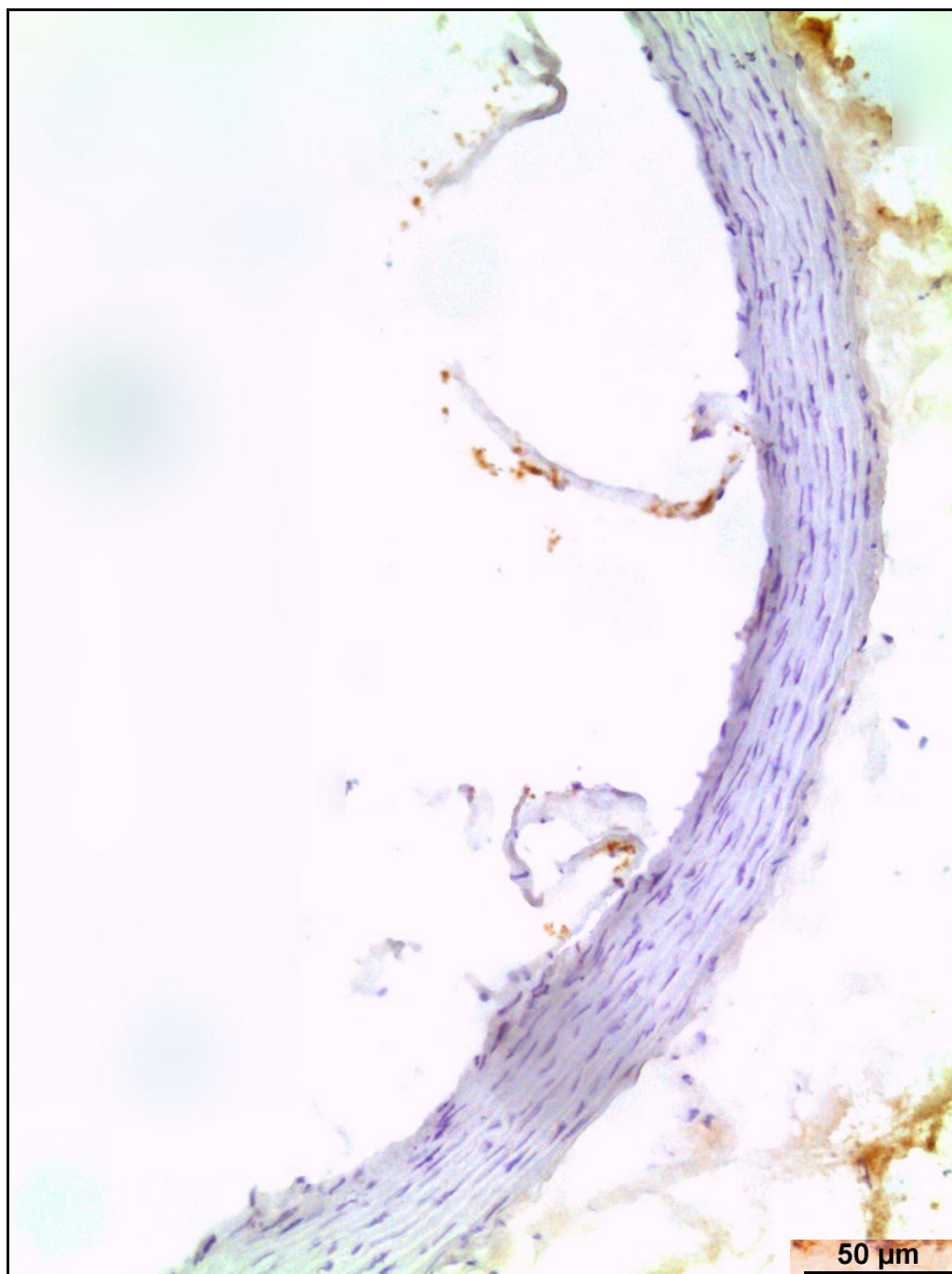
Expres P-sektinu u kmene SHR potkanů léčených sunitinibem nebyla prokazatelná jako v případě potkanů s isoprenalinem indukovaným poškozením cévní stěny. Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x

**Obrázek 14: Imunohistochemická detekce P-selektinu u kmene WKY potkanů, kterým byl podáván sunitinib - bez reakce**



Expres P-selektinu u kmene WKY potkanů léčených sunitinibem nebyla prokazatelná jako v případě potkanů s isoprenalinem indukovaným poškozením cévní stěny. Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x

**Obrázek 15: Imunohistochemická detekce P-selektinu u kmene WKY potkanů, kterým byl podáván sunitinib - bez reakce**



Expres P-selektinu u kmene WKY potkanů léčených sunitinibem nebyla prokazatelná jako v případě potkanů s isoprenalinem indukovaným poškozením cévní stěny. Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x

## 8 Diskuze

Sunitinib je cytotoxická látka, léčivo ze skupiny tzv. malých molekul, multikinázových inhibitorů. Používá se k léčbě metastatického adenokarcinomu ledviny, gastrointestinálního stromálního tumoru a k léčbě neuroendokrinních nádorů pankreatu. Jeho použití limitují jeho nežádoucí účinky a to především kardiotoxicita (*Štulc, 2006*). Na základě studií a klinických zkušeností předpokládáme, jak negativní vliv léčiva na myokard, tak jeho schopnost stimulovat patogenezi endoteliální dysfunkce – prvního stádia aterosklerózy – vedoucí k dalším kardiovaskulárním onemocněním (*Bono, Rautiola, 2011; Rixe, Billemont, 2007*).

Cílem této rigorózní práce bylo prokázat negativní účinky sunitinibu na kardiovaskulární systém nepřímo – laboratorní detekcí zvýšené exprese P-selektinu v endotelu aorty potkanů, kterým bylo léčivo podáváno. Použitá imunohistochemická analýza toto tvrzení však neprokázala. Nepřítomnost pozitivní reakce P-selektinu v cévním endotelu potkanů poukazuje na skutečnost, že se nám nepodařilo prokázat zánětlivé změny probíhající v cévním endotelu. Tento fakt podporuje také nepřítomnost pozitivní reakce VCAM-1 a pouze velmi slabá reakce ICAM-1 a to ve všech 4 sledovaných skupinách (nepublikované výsledky). Je nutno konstatovat, že použité chemikálie, roztoky a protilátky i podmínky experimentu byly nastaveny vhodně. Neboť imunohistochemická reakce proběhla velmi zřetelně u pozitivní kontroly, kterou byly cévy získané z potkanů, u nichž byl použit isoprenalin k indukci infarktu myokardu a endoteliální dysfunkci v aortě.

P-selektin stejně tak jako ICAM-1 a VCAM-1 patří mezi adhezivní molekuly, které jsou velmi důležité pro optimální vývoj kardiovaskulárního systému a současně se jejich zvýšené hladiny nacházejí v zánětlivě změněných aterosklerotických cévách (*Blankenberg, 2003; Krieglstein, Granger, 2001; Merten, Thiagarajan, 2004*). Jsou součástí trombotických a aterosklerotických procesů – napomáhají adhezi a akumulaci leukocytů k cévnímu endotelu i proliferaci hladkosvalových buněk, jsou významné především v prvních stádiích aterosklerózy při rozvoji endoteliální dysfunkce. Solubilní formy těchto adhezivních molekul se nacházejí v séru pacientů s aterosklerotickým postižením. Např. u nestabilních koronárních syndromů se zvyšují hladiny P-selektinu (*Krieglstein, Granger, 2001*).



P-selektin je adhezivní molekula ze skupiny selektinů, nachází se na povrchu aktivovaných trombocytů a na endoteliálních buňkách. Ligandem pro P-selektin jsou oligosacharidové struktury vyskytující se hojně na povrchu leukocytů - interakce mezi P-selektinem a těmito strukturami výrazně zpomalují a modifikují pohyb leukocytů v krevním řečišti (*Hillis, Flapan, 1998*). Nepřítomnost zvýšené exprese P-selektinu na těchto 4 skupinách experimentálních zvířat však nevyvrací možnost cévního poškození a pravděpodobného rozvoje kardiovaskulárního onemocnění. Pro kardiotoxické účinky a negativní ovlivnění vaskulárního systému při léčbě sunitinibem svědčí mnoho klinických studií i laboratorních experimentů. Je možné tedy předpokládat jiný mechanismus poškození endotelových buněk, než jakým je zvýšená exprese adhezivních molekul. Kromě možnosti indukce zánětu, může sunitinib indukovat také oxidační, či nitrační stres, případně ovlivňovat expresi některých vazodilatačních, či vazokonstrikčních působků, což je v současné době předmětem dalšího studia.

## 9 Závěr

Imunohistochemická analýza neprokázala expresi P-selektinu v endotelových buňkách aorty u žádné ze 4 zkoumaných skupin zvířat, ačkoliv na kontrolních snímcích (u isoprenalinem indukovaného poškození cévy laboratorního potkana) exprese P-selektinu jasně detekována byla. Nastavení podmínek, použití reagensů a protilátek tedy bylo použito vhodně.

Neprokázali jsme pozitivní reakci u skupiny SHR potkanů, kterým byl podáván sunitinib.

Neprokázali jsme pozitivní reakci u skupiny WKY potkanů, kterým byl podáván sunitinib.

Neprokázali jsme pozitivní reakci u skupiny SHR potkanů ani u skupiny WKY potkanů, kteří dostávali placebo.

Nebyla tedy potvrzena naše hypotéza exprese P-selektinu v cévním endotelu aorty potkanů dostávajících sunitinib. Přesto - vzhledem ke klinickým zkušenostem a mechanismu účinku sunitinibu - můžeme předpokládat vaskulární toxicitu léčiva a postižení srdečně-cévního systému u pozorovaných zvířat, což je předmětem dalšího zkoumání.

## 10 Literatura

Beranová, M., Tonar, Z.: Principy a příklady imunohistochemie. Příručka pro studenty. 2002. LF UK v Plzni. Ústav histologie a embryologie.[online] [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: <http://web.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/komplet.html>

Blankenberg, S., Barboux, S., Tiret, L.: Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003; 170(2):191-203.[online] [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: <http://europepmc.org/abstract/MED/14612198>

Bono, P., Rautiola, J., Utriainen, T., Joensuu, H.: Hypertension as predictor of sunitinib treatment outcome in metastatic renal cell carcinoma. *Acta Oncologica*. 2011; 50(4):569-73.

Brančíková, D., Adámková Krákorová, D.: Sunitinib. *Remedia* 2008; 18:187-193. [online] [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: <http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2008/3-2008/Sunitinib/e-9q-a3-jp.magarticle.aspx>

Carretero, O. A., Oparil, S.: Essential Hypertension: Part I: Definition and Etiology. *Circulation* 2000; (101):329-335. Print ISSN: 0009-7322. Online ISSN: 1524-4539.

Conroy, R. M., Pyörälä, K., Fitzgerald, A. P. et al: Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE Project. *European Heart Journal*. 2003; (11):987-1003.

Daignon, J., Ganz, P.: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109(3):27-32.

Daignon, J., Ganz, P.: Atherosclerosis: Evolving Vascular Biology and Clinical Implications. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109(3):27-32. doi:10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8

Elbl, L.: Kardiotoxicita protinádorové léčby. *ZDN. Postgraduální medicína* 07/2001. [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: <http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/kardiotoxicita-protinadorove-lecby-461264>

El-Mas, M. M., Abdel-Rahman, A. A.: Direct evidence for selective involvement of aortic baroreceptors in ethanol-induced impairment of baroreflex control of heart rate. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1993; 264(3):1198-1205.

Filipiak, M.: Etiologické faktory vzniku esenciálnej hypertenzie. 1999. Lékařská fakulta Univerzita Komenského v Bratislavě. [online] [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: [www.lfuk.sk/files/ref/eh.doc](http://www.lfuk.sk/files/ref/eh.doc)

- Folkman J.: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New English Journal of Medicine*. 1971; (285):1182–1186.
- Havlenová, T.: Zvýšený krevní tlak u lidí a experimentálních zvířat. *Středoškolská odborná činnost 2007/2008*. [online] [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: <http://soc.nidm.cz/archiv/getWork/hash/40A06TH210189A>
- Hillis, G. S., Flapan, A.D.: Cell adhesion molecules in cardiovascular disease: a clinical perspective, *Heart*. 1998; (79):429-431. doi: 10.1136/hrt.79.5.429 [online] [cit. 28. 1. 2012] Dostupné na: <http://heart.bmj.com/content/79/5/429.full.pdf>
- Hlubocká, Z.: Endoteliální dysfunkce. II. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha. *Practicus* 2002; (2):38-43.
- Impellizzeri, D., Cuzzocrea, S.: Targeting selectins for the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013. [online] [cit. 22. 10. 2013] Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24074033>
- Kappers, M. H., Sleijfer, S., Danser A. H.: Cardiovascular and renal toxicity during angiogenesis inhibition: clinical and mechanistic aspects. *Journal of hypertension*. 2009; (27):2297–2309.
- Karásek, D., Vaverková, H.: Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní medicína po praxi*. 2004; (9):450–453. [online] [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: <http://www.solen.cz/pdfs/int/2004/09/06.pdf>
- Karetová, D.: Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. *Interní medicína*. 2002; 3:119–122.
- Kollmannsberger, C; Soulieres, D.; Wong, R.: Sunitinib therapy for metastatic renal cell carcinoma: recommendations for management of side effects. *CUAJ*. 2007; (1): 41-54. [online] [cit. 25. 10. 2013] Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2422945/pdf/cuaj12SupplS41.pdf>
- Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L.: Funkční histologie. *Kardiovaskulární systém*. 2. vydání. Jinočany: H&H, 2000, s. 115 126. ISBN 80-86022-80-3.
- Kriegelstein, Ch. F., Granger, D. N.: Adhesion molecules and their role in vascular disease. *AJH*. 2001; (14):44–54.
- Kuneš, J., Zicha, J.: *Klinická patofyziologie hypertenze*. Praha: Grada Publishing, 2002; s. 28-36. ISBN 80-247-0227-4.
- Levy, P., Tamisier, R., Arnaut, C. et al.: Sleep deprivation, sleep apnea and cardiovascular diseases. *Frontiers in Bioscience*. 2012; 1(4):2007-2021. [online] [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: <http://europepmc.org/abstract/MED/22202016>

- Lorenzo, G., Autorino, R., Sternberg, C. N.: Metastatic Renal Cell Carcinoma: Recent Advances in the Targeted Therapy Era. *European urology* 2009; (56)6:959–971.
- Lowery, A., Han, Z.: Assessment of tumor response to tyrosine kinase inhibitors. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 2011; 16. ISSN: 1093-4715 [online] [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: <http://europepmc.org/abstract/MED/21622159>
- Luther, T. C.: Alcohol-Induced Hypertension: Mechanisms, Complications, and Clinical Implications. *National Medical Association*. 1985; 77(5):385–389. [online] [cit. 9. 1. 2012] Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2561877/>
- Marek, J., Linhart, A., Rucklová, Z., Haber, J., Kořínek, J.: Kardiotoxicita onkologické léčby. *Vnitřní lékařství*. 2011; 57(5):472-484. [online] [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: [http://www.vnitrnilekarstvi.cz/vnitri-lekarstvi-clanek/kardiotoxicita-onkologicke-lecby-35446?confirm\\_rules=1](http://www.vnitrnilekarstvi.cz/vnitri-lekarstvi-clanek/kardiotoxicita-onkologicke-lecby-35446?confirm_rules=1)
- Martínek, J., Vacek, Z.: *Histologický atlas*. 1. vydání. Praha: Grada, 2009, s. 11 17. ISBN 978-80-247-2393-8
- Masopust, J., Průša, R.: *Patobiochemie buňky*. 2003. [online] [cit. 29. 11. 2013] Dostupné na: <http://dotdiag.cz/img/prednasky/bunka.pdf>
- Merten, M., Thiagarajan, P.: P-selectin in arterial thrombosis. *Zeitschrift für Kardiologie*. 2004; 93(11):855-863. [online] [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: <http://classes.kumc.edu/som/cellbiology/connections/gapjunctions/index.html>
- Mescher, A. L.: *Junqueira's basic histology: text and atlas*. 12th ed. New York: McGraw-Hill Medical. 2010, s. 480. ISBN 978-007-1271-905.
- Ostřížková, L., Brančíková, D., Bednařík, O.: Sunitinib v léčbě neuroendokrinních tumorů trávicího traktu – první zkušenosti. 2011 XXXV. Brněnské onkologické dny a XXV. Konference pro sestry a laboranty. [online] [cit. 21. 9. 2012] Dostupné na: <http://www.linkos.cz/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/abstrakta/cislo/4349/>
- Padmanabhan, S.; Newton-Cheh, C.; Dominiczak, A.F.: Genetic basis of blood pressure and hypertension. *TIG*. 2012; 28(8):397-408.
- Paulsen, D. F.: *Histologie a buněčná biologie. Oběhový systém. Opakování a příprava ke zkouškám*. 1. vydání. Praha: H&H, 2004, s. 156 - 165. ISBN 80-731-9024-9.
- Rixe, O., Billefont, B., Izzedine, H.: Hypertension as a predictive factor of Sunitinib activity. *Annals of Oncology*. 2007; 18(6):1117. [online] [cit. 28. 1. 2012] Dostupné na: <http://annonc.oxfordjournals.org/content/18/6/1117.full>

- Russ, R., Abdel-Rahman, A. A.: Role of the sympathetic nervous system in ethanol-induced hypertension in rats. *Alcohol*. 1991; 8(4):301–307.
- Sheila, A., Doggrella, L.: Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and silure; *Cardiovascular Research*. 1998; 39: 89–105.
- SUTENT: souhrn údajů o přípravku, AISLP. 2013.
- Špinar, J.; Vítovec, J.: Kombinační léčba hypertenze v roce 2012. *Medicína pro praxi*. 2012; 9 (8, 9): 319-324. [online] [cit. 25. 10. 2012] Dostupné na: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2012/09/02.pdf>
- Štěrba, M., Popelová, O., Adamcová, M., Mazurová, Y., Geršl, V.: Kardiotoxicita protinádorové chemoterapie. Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Ústav farmakologie, Ústav fyziologie, Ústav histologie a embryologie. 2006. [online] [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/vyzkum/Kardiotoxicita%20protinadorove%20lecby.pdf>
- Štulc, T.: Aterogeneze a její patogenetické mechanismy. *Kardiologické fórum*. 2006; (4):3.
- Sary, H. C., Chandler A. B., Dinsmore R. E. et al.: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995; (15): 1512 – 1531. [cit. 25. 2. 2010]
- Tkáčová, L., Repková, J.: Arteriální hypertenze. *Sestra*. 12/2011. [online] [cit. 28. 1. 2012] Dostupné na: <http://www.zdn.cz/clanek/sestra/arterialni-hypertenze-462716>
- Trojan, S. et al.: *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 1994, 460s. ISBN 80-7169-036-8.
- Vidimský, J.: *Cor Vasa* 2008; 50(1): Kardio. Doporučení diagnostických a léčebných postupů u arteriální hypertenze – verze 2007. Doporučení České společnosti pro hypertenzi. [online] [cit. 28. 1. 2012] Dostupné na: [http://www.kardio-cz.cz/resources/upload/data/364\\_3930.pdf](http://www.kardio-cz.cz/resources/upload/data/364_3930.pdf)
- Vožeh, F.: Kouření očima patofyziologa. *ZDN. Příloha LL.44/2005*. [online] [cit. 9. 12. 2012] Dostupné na: <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/koureni-ocima-patofyziologa-169167>
- Vytášek, R.: Signalizace integriny. 2010. [online] [cit. 29. 1. 2012] Dostupné na: <http://mefanet-motol.cuni.cz/download.php?fid=897>

Wang, Q., Zhao, W. : Association between plasma soluble P-selectin elements and progressive ischemic stroke. *Experimental and therapeutic medicine*. 2013; 5(5):1427-1433. [online] [cit. 12. 11. 2013] Dostupné na:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3671870/>

Weis, M.: Ateroskleróza imunopatologické zánětlivé systémové onemocnění. *ZDN. Příloha LL 34/2002*. [online] [cit. 28. 1. 2012] Dostupné na:  
<http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/ateroskleroz-a-imunopatologicke-zanetlive-systemove-onemocneni-147502>

<http://classes.kumc.edu/som/cellbiology/connections/gapjunctions/index.html>  
[online] [cit. 29. 1. 2012]

<http://www.zdrava-rodina.cz/med/med0502/med0501.html> [online] [cit. 29. 1. 2012]  
Ateroskleróza: Nové pohledy na C - reaktivní protein. 2002; 9(5):1-2.

<http://www.vasesrdce.cz/kardiovaskularni-rizika/prevence-kardiovaskularnich-onemocneni-v-dospelim-veku> [online] [cit. 28. 1. 2012]  
Prevence kardiovaskulárních onemocnění v dospělém věku. Společné doporučení českých odborných společností. *Cor Vasa* 2005; 47(9):3-14.

<http://www.lf3.cuni.cz/opencms/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/histologie/vyuka/studijni-materialy/CPHAN1/studijni-materialy/histologie-pro-bakalare.pdf> 3.  
[online] [cit. 28. 1. 2012] Lékařská fakulta Univerzity Karlovy: Histologie pro bakalářské studium.

## Seznam použitých zkratek

ABC	avidin-biotin komplex
ACE	angiotensin konvertující enzym
ACEI	inhibitory ACE
AIM	akutní infarkt myokardu
ANF	atriální natriuretický faktor
Apo B	apolipoprotein B je strukturální protein chylomikronů, lipoproteinů s velmi nízkou hustotou (VLDL) a lipoproteinů s nízkou hustotou (LDL)
ASCO	Clinical Oncology Annual Meeting – Kongres klinické onkologie
BMI	body mass index
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD105	endoglin
CD62P	P-selektin
CMP	cévní mozková příhoda
CSFs	kolonie stimulující faktory
CRP	C reaktivní protein
CTLA	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen; inhibiční molekula
DAB	diaminobenzidín
DM	diabetes mellitus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ED	endoteliální dysfunkce
EDRF	endoteliální relaxační faktor
ET	esenciální trombocytopenie
ET-(1-3)	endotelin, silný vazokonstriktor
EtOH	ethanol
GIST	gastrointestinální stromální tumor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
ICAM	intercellular adhesion molecules – mezibuněčné vazoadhezivní molekuly
GF	insulin – like growth factor- inzulínu podobný růstový factor
ICHS	ischemická choroba srdeční



Ig	imunoglobulin (ový)
IL	interleukin
ISH	International Society of Hypertension
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LAK	lymphokine-activated killers
LAP	latency associated peptide
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
Lp (a)	lipoprotein A
LVEF	ejekční frakce levé komory srdeční
MCPO	monocyte chemotactic protein - monocytární chemotaktický protein
MPO	myeloperoxidáza
mm Hg	milimetrů rtuťového sloupce
NaCl	chlorid sodný; sůl kuchyňská
NADHP	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
NCAM	nerve-cell adhesion molecule
NET	neuroendokrinní tumor
NO	oxid dusnatý
NOS	NO syntáza
oxLDL	oxidované LDL
PBS	fosfátový pufr
PDGF	platelet derived growth factor - z destiček odvozený růstový faktor
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule - destičková adhezivní molekula
pNET	neuroendokrinní tumor pankreatu
PUFA	polyunsaturated fatty acids – polynenasycené mastné kyseliny
QT	interval na EKG křivce měřený od začátku kmitu Q do konce vlny T, odpovídá celé elektrické systole komorové svaloviny
RGD	sekvence aminokyselin agininu (R), glycinu (G) a aspartátu (D); zajišťuje vazbu na integrin
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku
SHR	spontánně hypertenzní potkani

TKI	tyrozinkinázové inhibitory
TNF	tumor necrosis factor – tumor nekrotizující faktor
VCAM-1	receptor pro vaskulární adhezivní buněčnou molekulu
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor
VLDL	lipoproteiny s velmi nízkou hustotou
VCAM	vascular cellular adhesion molecules intercellular adhesion molecules - vaskulární cytoadhezivní molekuly
WHO	World Health Organisation – Světová zdravotnická organizace
WKY	Wistar Kyoto potkan