

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

Vliv Sunitinibu na endoteliální expresi hemooxygenázy I u hypertenzních potkanů.

Sunitinib effects on endothelial expression of heme oxygenase I in hypertensive rats.

(Bakalářská práce)

Vedoucí práce: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD

Veronika Mazáčová

Hradec Králové 2012

„Prohlašuji, že tuto práci jsem vypracovala samostatně a je mým původním autorským dílem. Veškeré zdroje informací, ze kterých jsem čerpala při zpracování, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

Datum:

Podpis:

Ráda bych poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za příjemnou spolupráci, drahocenné rady a odborné vedení, při sepisování této bakalářské práce.

Další slova díky patří rodinným příslušníkům a přátelům, kteří mě jakýmkoliv způsobem podporují.

Abstrakt

Veronika Mazáčová

Vliv Sunitinibu na endoteliální expresi hemoxygenázy I u hypertenzních potkanů.

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotnický laborant

Cíl práce: Sledovali jsme expresi enzymu hemoxygenázy v aortě u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) s ohledem na podávání sunitinibu.

Metody: Použili jsme samce SHR potkanů. Tito potkani byli rozděleni na dvě skupiny, v nich jedné skupině byl podáván sunitinib a druhé, kontrolní skupině, pouze voda. SHR potkanům byl sunitinib podáván ve schématu: 8 týdnů podávání/5 týdnů pauza/8 týdnů podávání. Následně byla provedena imunohistochemická analýza odebraných aort. Detekce exprese hemoxygenázy byla provedena pomocí metodiky En Vision s detekcí pomocí DAB.

Výsledky: Imunohistochemické barvení hemoxygenázy jsme provedli u 60 preparátů. Imunohistochemická analýza prokázala expresi HO-1 pouze v buňkách cévního endotelu u obou skupin zvířat. Exprese byla detekována u všech zvířat v obou skupinách avšak exprese HO-1 byla výrazně silnější u skupiny potkanů, kterým byl podáván sunitinib. Stereologická analýza prokázala statisticky významný nárůst exprese HO-1 u potkanů, kterým byl podáván sunitinib ve srovnání s neléčenou skupinou.

Závěr: Imunohistochemická analýza ukázala expresi HO-1 pouze u endotelových buněk aorty. Podávání sunitinibu vedlo k signifikantnímu nárůstu exprese HO-1 ve srovnání s neléčenou skupinou, což bylo prokázáno pomocí imunohistochemických a stereologických metod. Podávání Sunitinibu ovlivňuje cévní endotel, takže je potřeba brát v úvahu jeho potenciální toxické účinky v cévním řečišti.

Abstract

Veronika Mazáčová

Sunitinib effects on endothelial expression of heme oxygenase I in hypertensive rats.

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Medical laboratory technician

Background: We observed the expression of heme oxygenase 1 in the aorta of spontaneously hypertensive rats (SHR) treated with sunitinib.

Methods: We used the male of Spontaneous hypertensive rats (SHR). This rats was divided into two groups. One of group received sunitinib and the second, control group, which received only water. SHR were treated by sunitinib in the following treatment scheme: 8 weeks treatment/5 weeks pause/8weeks treatment. After that immunohistochemical analysis of segments aorts were executed. Detection of expression of heme oxygenase was performed using the method of En Vision with detection using DAB.

Results: We performed the immunohistochemical staining of heme oxygenase in 60 slides. Immunohistochemical analysis showed expression of HO-1 only in aortic endothelium in both groups of animals. Expression was detected in all animals in both groups, but the expression of HO-1 was significantly stronger rats treated with sunitinib. Stereological analysis showed significant increase of HO-1 expressio in rats treated with sunitinib.

Conclusions: Imunohistochemical analysis revealed expression of HO-1 only in the endothelial cells of the aorta. Submission of sunitinib led to the significant increase in the expression of HO-1 in comparison with an untreated group, which was confirmed by imuhistochemical and stereological methods. Sunitinib treatment affects the vascular endothelium, suggesting its potential toxic effects in cardiovascular system.

Obsah

1 ÚVOD	8
2 CÉVY	9
2.1 CHARAKTERISTIKA OBĚHOVÉHO SYSTÉMU	9
2.2 OBECNÁ STAVBA CÉV:	10
2.3 ARTERIE	10
2.4 KAPILÁRY	12
2.5 VÉNY	16
3 HYPERTENZE	18
3.1 DEFINICE A KLASIFIKACE	18
3.2 REGULACE KREVNÍHO TLAKU	18
3.3 ETIOPATOGENEZE A PATOFYZIOLOGIE HYPERTENZE	19
3.4 KLINICKÉ NÁSLEDKY	24
4 LABORATORNÍ ZVÍŘATA	26
4.1 HISTORIE A VÝBĚR DRUHU ZVÍŘETE	26
4.2 SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍ POTKANI (SHR)	27
5 SUNITINIB	29
5.1 POPIS	29
5.2 INDIKACE, LÉČBA	29
5.3 MECHANISMUS ÚČINKU	30
5.4 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY	30
5.4.1 Únava.....	31
5.4.2 Gastrointestinální potíže	31
5.4.3 Hypertenze	31
5.5 VYUŽITÍ	32
6 HEMOXYGENÁZA 1 (HO-1)	33
6.1 ENZYMY	33
6.2 ÚČINEK	34
6.3 PRODUKTY	34
6.4 AKTIVACE A VYUŽITÍ	35

7. ZADÁNÍ PRÁCE	37
8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	38
8.1 SUNITINIB – DESIGN EXPERIMENTU	38
8.2 IMUNOHISTOCHEMIE	38
8.2.1 METODA EN VISION.....	38
8.2.2 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE.....	40
9. VÝSLEDKY	41
9.1 IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE HO-1 V AORTĚ.....	41
9.2 STEREOLOGICKÁ ANALÝZA EXPRESE HO-1 V AORTĚ	44
10 DISKUSE.....	45
11 ZÁVĚR	47
12 SEZNAM ZKRATEK	48
13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	50

Úvod

Kardiovaskulární systém se skládá ze srdce a cév, jejich úlohou je rozvod živin, plynů, tepla, iontů do různých orgánů a tkání v těle a odvodu odpadových látek metabolismu prostřednictvím vylučovacího systému pryč z organismu. Také hraje důležitou úlohu v transportu hormonů k cílovým tkáním, reguluje hemostázu a má mnoho dalších významných funkcí. Poškození funkce tohoto systému má pro organismus závažné až fatální následky.

K onemocněním kardiovaskulárního systému patří hypertenze neboli zvýšený krevní tlak. Je jedním z celosvětově nejčastějších nemocí u lidí. Díky lepší informovanosti a léčbě bylo dosaženo podstatné zlepšení, ale i přes to přibližně 30% dospělých o své hypertenzi stále neví. Na rozvoji vysokého krevního tlaku se podílí genetické faktory, životní styl a u sekundárních hypertenzí i ostatní onemocnění, která předchází jejímu vzniku. Účastní se také na vzniku závažného onemocnění pojmenovaném metabolický syndrom společně s obezitou, dyslipoproteinemií a diabetem mellitem. Hypertenze je nejvýznamnějším modifikovatelným rizikovým faktorem pro ischemickou chorobu srdeční (IČS), cévní mozkovou příhodu, městnavé srdeční selhání, v konečném stadiu onemocnění ledvin a periferní cévní onemocnění. Proto je důležité její včasné rozpoznání a léčba, ale také podpora zdravého životního stylu.

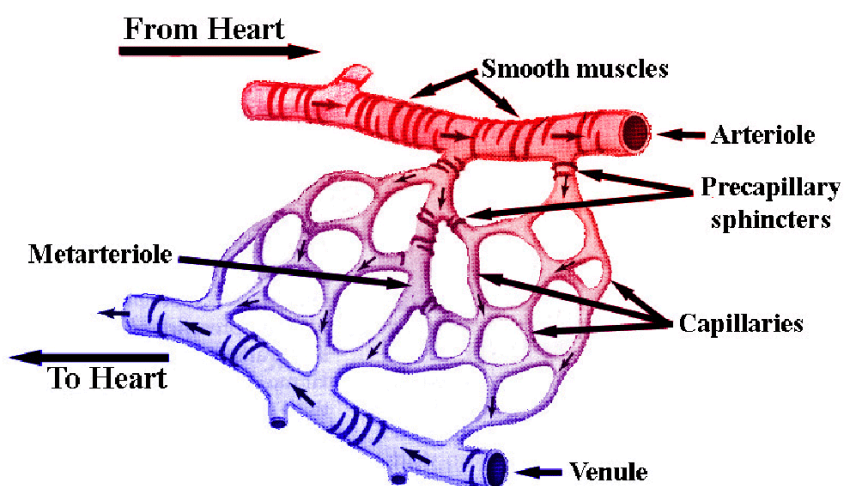
Hypertenzi způsobují i některé léky, proto je významné tento vliv na organismus dopředu testovat. Z testů se dozvíme mnoho užitečných informací například vhodnou dobu pro zahájení antihypertenzní léčby. K těmto účelům se využívají laboratorní zvířata, kterým tento lék podáváme. K diagnostice možných patologických pochodů se využívají různé biochemické i speciální laboratorní metody. Často používané jsou metody imunohistochemické, jejich základ je na specifické reakci antigenu s protilátkou na řezu histologického preparátu. U známých specifických markerů určitého patologického děje, lze s vhodně zvolenou metodou poměrně spolehlivě zjistit, zda tento patologický děj ve zkoumané tkáni probíhá, nebo neprobíhá.

2 Cévy

2.1 Charakteristika oběhového systému

Krevní a lymfatické cévy tvoří oběhový systém. Ke krevním cévám dále řadíme srdce, jehož úkolem je pumpovat krev nejprve do tzv. malého krevního oběhu, kde dochází k jejímu okysličení a následně eferentní arterií do tzv. velkého krevního oběhu (do celého těla). Krevní cévy rozlišujeme podle stavby stěny a krve, která jimi protéká. Okysličená krev protéká arteriemi, arterioly a kapilárami a odkysličená venulami a vénami.

Eferentní arterie se postupně větví na menší a menší arterioly, jejich funkcí je přívod krve obohacené o kyslík a živiny do jednotlivých tkání. Před sítí kapilár se nachází prekapiláry s prekapilárním sfinkterem a až poté následují kapiláry jako nejmenší krevní cévy, které spolu anastomozují a prostřednictvím průchodu přes jejich stěnu je umožněna výměna látek mezi tkáněmi a krví. Z kapilár se krev dostává do tzv. postkapilárních venul až velkých vén, které odvádí produkty metabolismu zpět k srdci (viz. Obr. č.1.). Ve slepě zakončených kanálcích zvaných lymfatické kapiláry vzniká systém lymfatických cév. Tyto kapiláry anastomozují a tvoří stále větší cévy, které se opět vracejí do systému krevních cév přesněji do velké žíly blízko srdce. Funkce tohoto systému je navrácení tkáňového moku z tkáňových prostor zpět do krve [1.].



Obr. č. 1.: Mikrocirkulace – popsána v předchozím odstavci [23.], smooth muscles-hladká svalovina, arteriole-arteriola, precapillary sphincters- prekapilární sfinkter, capillaries-kapiláry, metarteriole-metarterioly, venule-venula, from heart-ze srdce, to heart-do srdce

2.2 Obecná stavba cév:

- Tunica intima – Nejvnitřnější vrstva tkáně, která přiléhá k cévnímu lumen. Skládá se z endotelu a jeho bazální membrány z řídkého kolagenního vaziva, která může občas obsahovat i hladké svalstvo. Endotel nasedá na zmíněnou bazální membránu a jedná se o jednovrstevný dlaždicový epitel lemující celý kardiiovaskulární systém. V srdci se tunica intima nazývá endokard.
- Tunica media – Představuje střední vrstvu tkáně, skládající se z elastických vláken, kalageních vláken, hladkých svalových buněk a některých ostatních buněk pojivové tkáně. Tunica media srdce se liší od cév tím, že obsahuje místo hladké svaloviny svalovinu srdeční a je nazývána myokard.
- Tunica adventitia – Vnější vrstva tkáně a je tvořena podélně orientovanými kolagenními a elastickými vlákny, může také obsahovat tukovou tkáň. Pomocí ostatních prvků pojivové tkáně je adventitia připojována ke tkáni, kterou céva probíhá. Srdce má samostatné vnější hranici, leží v perikardiální dutině, která je lemovaná mezotelem a obklopená viscerální vrstvou pojmenovanou osrdečník (perikard) [2.].

2.3 Arterie

Jsou děleny podle jejich průměru na velké, střední, malé arterie a arterioly.

Velké arterie

Jsou řazeny mezi arterie elastického typu s poměrně tenkou stěnou, jako jsou: aorta, její velké větve a truncus pulmonalis. Během diastoly zajišťují plynulý tok krve.

- Tunica intima – Je tlustší než u svalového typu arterií a má i širší subendotelovou vrstvu. Membrána elastica interna nelze rozpoznat, jelikož v tunice medií jsou další elastické blanky.
- Tunica media – Obsahuje koncentricky uspořádané elastické blanky nazývané membranae fenestratae, které s věkem početně přibývají. Dále je přítomna základní amorfní hmota a proteoglykany, ale membrána elastica externa vyvinutá není.
- Tunica adventitia – Je tenká.

Malé a střední arterie

Patří nejčastěji mezi arterie svalového typu s poměrně tlustou stěnou.

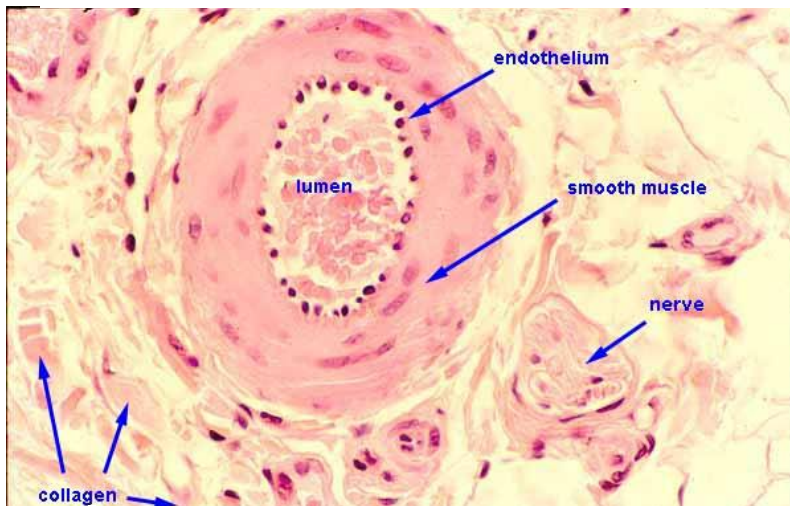
- Tunica intima – V této vrstvičce se mohou objevit hladké svalové buňky a dobře vyvinutá membrána elastica interna.
- Tunica media – Obsahuje až 40 vrstev hladkých svalových buněk, které jsou uspořádané do svazků. Mezi těmito buňkami jsou přítomny elastická vlákna, která někdy tvoří elastické lamely. Dále jsou přítomna retikulární vlákna (kolagen typu III) a proteoglykany. Ve větších arteriích se nachází i vyvinutá membrána elastica externa.
- Tunica adventitia – Od obecné stavby jsou zde navíc fibroblasty, vasa vasorum neboli cévy cév, lymfatické kapiláry a nervová vlákna.

(Obr. č. 3)

Arterioly

Jejich průměr je menší než 0,5mm.

- Tunica intima – Obsahuje stejné složky, které byly popsány v odstavci: Obecná stavba cév. Navíc se nacházejí v endotelových buňkách (u cév větších než



Obr. č. 2.: Arteriola [24.], endothelium-endotel, smooth muscle-hladká svalovina, nerve-nerv, collagen-kolagen

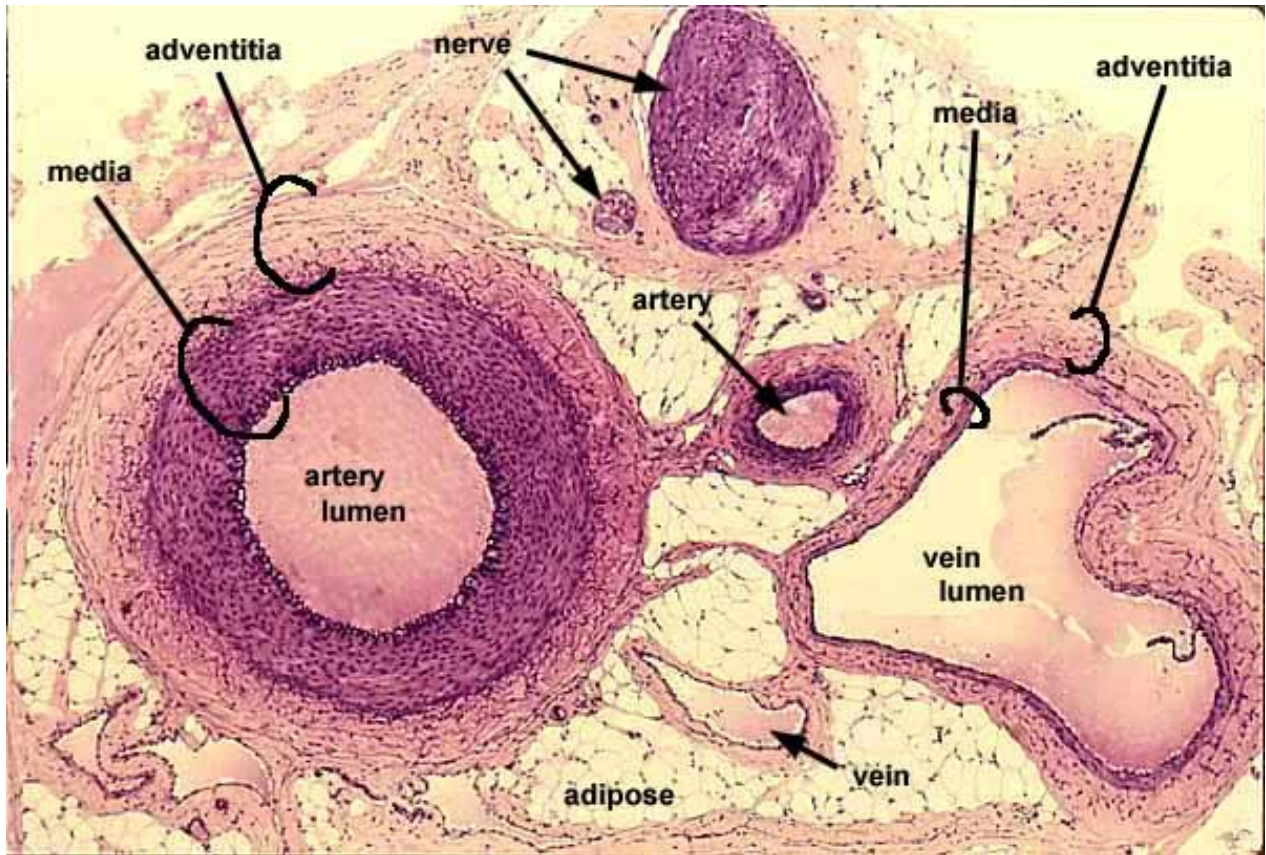
kapiláry) tyčinkovitá granula nazývající se Weibel-Paladeho zrna. V nich je obsažen protein důležitý pro koagulaci krve neboli Willebrandův faktor, při jeho chybění dochází k poruchám

srážení krve. V menších arteriolách většinou chybí membrána elastica interna.

- Tunica media – Zde se nachází jedna až pět vrstev hladkých svalových buněk, které mohou tvořit výběžky pronikající bazální laminou a jsou tedy kryté endotelovými buňkami. Kontakt mezi endotelovými a hladkými svalovými buňkami umožňuje působení polypeptidů, které cirkulují v krvi a účastní se

regulace krevního tlaku, přenést k hladkým svalovým buňkám. Membrána elastica externa není vyvinuta.

- Tunica adventitia – stejná s obecnou stavbou [3].



Obr. č. 3.: Porovnání tloušťky stěn arterií a vén [24.], artery-arterie, vein-véna, adipose-tukové buňky

2.4 Kapiláry

Než se krev dostane do kapilár, protýká v prekapilárách, jejichž lumen má průměr až 40 mikrometrů. Jako všechny cévy jsou také vystlány endotelovými buňkami a v jejich stěně můžeme dosud nalézt velmi malé množství hladkých svalových buněk. Před rozvětvením do jednotlivých kapilár narazíme na prekapilární sfinkter. Jedná se o prstenec z hladkých svalových buněk, který pomocí jejich kontrakce, reguluje tok krve kapilárami.

Kapiláry jsou nejtenčí součástí krevního oběhu a lumen o průměru 5-10 mikrometrů, z čehož vyplývá, že mohou být užší, než je tloušťka erythrocytu. Proto se v těchto místech musí erythrocyty plasticky deformovat. Větvením kapilár vzniká hustá síť, která je přítomná ve všech orgánech.

Ve světelném mikroskopu vidíme tyto cévy že, jsou tvořené vrstvou plochých, polygonálních endotelových buněk nasedající na bazální membránu. Endotel se kromě krycí funkce také podílí na transportu různých látek pomocí pinocytotických vezikul v jeho tenkých laterálních výběžcích.

Na různých místech v průběhu kapilár jsou umístěné ploché buňky, pojmenované pericyty s bohatě se větvícími cytoplazmatickými výběžky okolo obvodu kapilár. Tyto buňky jsou schopné vytvořit vlastní bazální membránu, u které může dojít ke spojení s membránou endotelu. Dále se mohou podílet na určité kontrakci (podobně jako tunica media), o čemž svědčí přítomnost aktinu, myozinu a tropomyozinu v jejich cytoplazmě.

Okolo těchto cév se nachází tenká vrstva longitudinálně uspořádaných kolageních vláken připomínající tunicu adventitií.

V elektronovém mikroskopu můžeme rozlišit 3 typy kapilár podle jejich struktury endotelových buněk a charakteru bazální laminy.

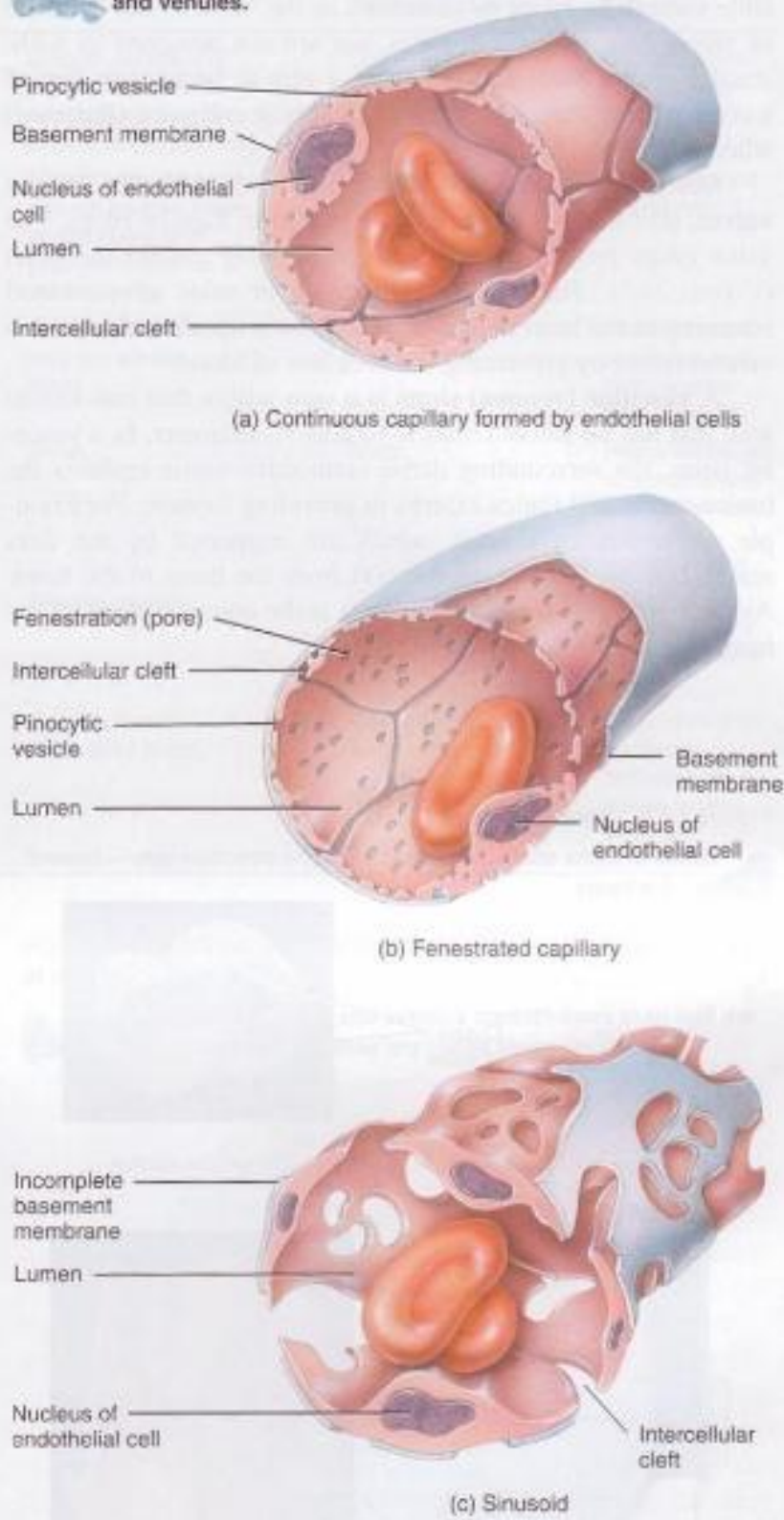
- 1. Kapiláry se souvislou výstelkou: celý obvod je olemován endotelovými buňkami bez existence póru či fenestrace. Povrch membrán dvou sousedních buněk se v místě kontaktu spojuje prostřednictvím zonulae occludentes. Zde zpravidla nacházíme marginální záhyby vyčnívající do lumina tvořené cytoplazmou. U tohoto typu je častější výskyt pericytů někdy i kolem celého obvodu kapiláry. Nacházejí se v centrální nervové soustavě (CNS), vazivu, plicích a svalové tkáni.
- 2. Kapiláry fenestrované: U nich endotelové buňky tvoří v oblastech mimo jádro velmi tenké lamely. V těchto výběžcích jsou vytvořeny fenestrace neboli otvory o průměru zhruba 30-100 mikrometrů, které jsou překryty diafragmou. Tato struktura nemá typickou trilaminární stavbu a je tenčí než biologické membrány. Endotelové buňky jsou opět umístěné na bazální lamině probíhající kontinuálně, ale pericyty se u tohoto typu vyskytují zřídka. Nalézt je můžeme v endokrinních žlázách, střevě a ledvinných glomerulech.
- 3. Atypické kapiláry s póry – kapilární sinusoidy: sinusoidy mají nepravidelné a širší lumen o průměru 30-40 mikrometrů. Podobně jako u fenestrovaných kapilár nacházíme četné póry a fenestrace ve výběžcích endotelových buněk, ale

bazální lamina zde není kontinuální, ani se zde nenachází diafragma. Může docházet k modifikaci sinusoid do fagocytu například do Kupfferových buněk jater. Vyskytují se tedy v játrech, kostní dřeni a slezině.

V blízkosti kapilárního řečiště se mohou vytvářet tzv. bariéry, které jsou tvořené zonulae occludentes a specializovanými bazálními laminami. Jejich existence je důležitá pro správnou funkci některých orgánů. S jejich pomocí dochází k selektivní regulaci u transportu látek, které jsou pro daný orgán potřebné a bezpečné. Mezi krevní bariéry patří například hematoencefalitická, hematotestikulární a placentární bariera [4., 3.].

Figure 21.4 Types of capillaries.

Capillaries are microscopic blood vessels that connect arterioles and venules.



Obr. č. 4.: Typy kapilár [25.], a) se souvislou výstelkou, b) fenestrovaná, c) sinusoidní

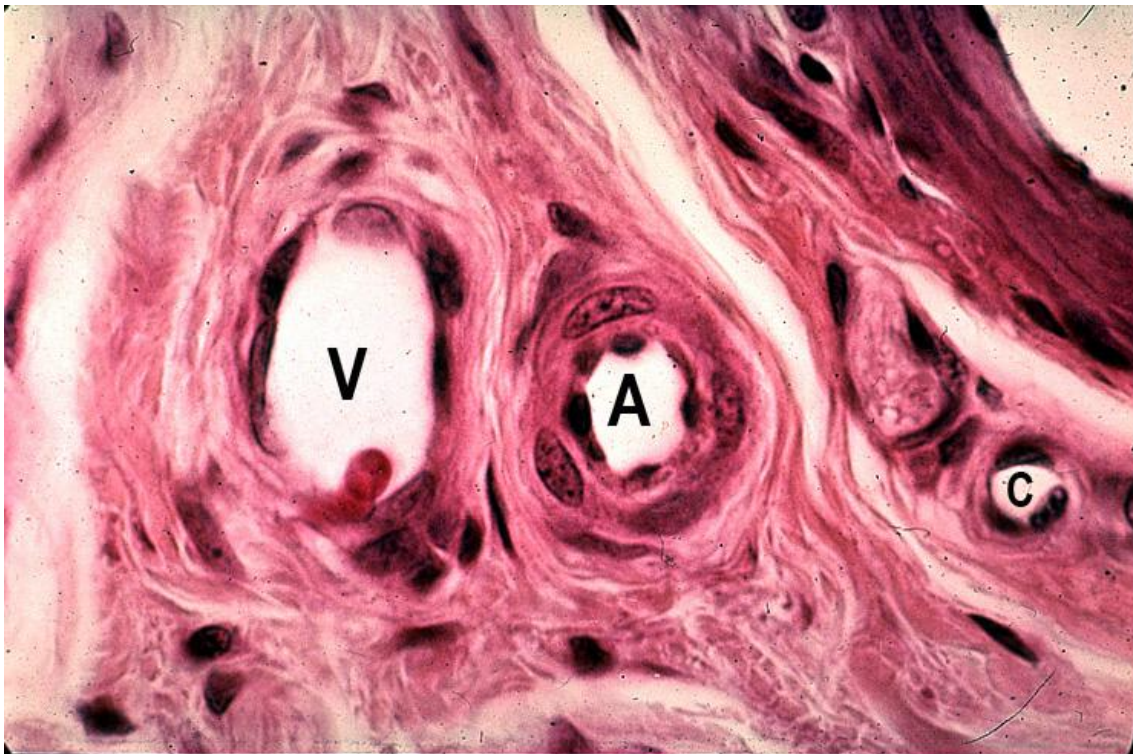
2.5 Vény

Které jsou podle velikosti děleny na venuly, střední vény a velké vény.

Venuly

Postkapilární venuly nasedají na kapiláry, z kterých sbírají krev. Stavba jejich stěny je obdobná jako u kapilár neboli z endotelových buněk s bazální laminou a pericyty, které mají rozsáhlejší pokrytí než u kapilár. Endotel je zde velmi důležitým místem pro vasoaktivní látky jako je histamin a serotonin uvolňujících se při zánětu či alergii. Postkapilární venuly se také podílejí na migraci lymfocytů z cévního lumen do lymfatické tkáně.

Na ně navazují muskulární venuly, které se liší přítomností hladkých svalových buněk a s průměrem lumen méně než 1 mm. Můžeme u nich již



Obr. č. 5.: Zobrazení venuly- V, arterioly- A, kapiláry- C [26.]

rozpoznávat tunicu intimu z endotelu a bazální laminy, tunicu medii z několika málo vrstev hladké svaloviny a tunicu adventitii z longitudinálně uspořádaných kolagenních vláken. Tunica adventitia je nejtlustší vrstvou stěny venul.

Střední vény

Průměr lumen je až 10mm. Většina těchto žil například radiální, holení či podkolení žíly doprovází tepny. Charakteristickým rysem je přítomnost chlopní, zabraňující zpětnému toku krve a jsou nejpočetnější v nižších částech těla zejména na dolních končetinách. Chlopně jsou párové kapsové výčlipky tunica intima z elastické vazivové tkáně, lemované z obou stran endotelem. Tyto žíly trpí na vznik trombů neboli krevních sraženin a onemocnění se nazývá hluboká žilní trombóza spojená s imobilizací například po operaci.

- Tunica intima – Příležitostně se mohou vyskytovat hladké svalové buňky či vnitřní elastická membrána.
- Tunica media – Vrstva je o mnoho tenčí než u středních tepen. Z čehož vyplývá menší počet vrstev kruhově uspořádané hladké svaloviny, která se může nacházet těsně pod tunica adventitia.
- Tunica adventitia – Tato vrstva je silnější než tunica media střední vény.

Velké vény

Do této kategorie se řadí žíly s průměrem lumen větší než 10 mm.

- Tunica intima – Mezi ní a tunicou medií není jisté rozhraní, z tohoto důvodu je těžké rozhodnout, kam přítomnou hladkou svalovinu zařadit.
- Tunica media – Vrstva je tenká a značně zredukovaná, nachází se zde více vaziva než hladkých svalových buněk.
- Tunica adventitia – Nejtlustší vrstva stěny žil, pokud se nachází pod úrovní srdce, obsahuje navíc svazky longitudinální hladké svaloviny, která zabraňuje distenzi a zpevňuje stěnu [3., 5.].

3 Hypertenze

3.1 Definice a klasifikace

Podle kritérií WHO/ISH z r. 1993 můžeme hodnotit za arteriální hypertenzi stav, při kterém je opakované zvýšení krevního tlaku (TK) 140/90 mm Hg stanované alespoň u 2 ze 3 měření TK. Krom této systolicko-diastolické hypertenze je také zapotřebí věnovat pozornost diagnostice a léčbě i tzv. izolované systolické hypertenzi, charakterizované jako systolický TK >160 a současně diastolický TK < 90 mm Hg. Pro správné rozhodnutí o agresivitě léčby je nezbytný klasifikační systém. Ten je rozdělen na čtyři části: normální tlak – systolický nižší než 120, diastolický méně než 80, prehypertenzi – 120-139/80-90, 1. Stupeň hypertenze – 140-159/90-99, 2. Stupeň – rovno větší než 160/100. Vzhledem k zaměření této práce se budeme v následujícím textu zabývat systémovou arteriální hypertenzí.

Arteriální hypertenzi můžeme podle etiopatogenetické klasifikace rozlišit na primární (esenciální) hypertenzi, kde je známo mnoho patogenetických mechanismů, ale ne vlastní příčina vzniku a dále sekundární hypertenze, která se vyvíjí na základě jiného, přesně definovaného patologického stavu (renální, endokrinní hypertenze atd.). Esenciální hypertenze postihuje asi 95 % hypertenzních pacientů, kdežto sekundární hypertenze tvoří méně než 5 %. Vzhledem k možnostem specifické léčby je velmi důležité jejich odlišení [6.]

3.2 Regulace krevního tlaku

Mezi nejrychlejší reakce podílející se na regulaci krevního tlaku patří nervové mechanismy. Jejich řídicí centrum se nachází v mozku pojmenované jako kardiovaskulární centrum. Z tohoto centra jsou přenášeny parasympatické impulzy prostřednictvím bloudivého nervu do srdce a dále jsou přenášeny také sympatické impulzy. Zatímco sympatický nervový systém se podílí na zvýšení krevního tlaku, tak parasympatický nervový systém spíše na jeho snížení. Reakce jsou uskutečněny prostřednictvím karotických a aortálních baroreceptorů. Pokud dojde v karotickém sinu k denervaci baroreceptorů, tak má tento stav za následek labilitu krevního tlaku, ale průměrný krevní tlak ovlivněn není. Baroreceptory u chronické arteriální hypertenze jsou nastaveny na vyšší střední hodnotě TK, a proto reagují jen na jeho náhlé změny, ale se stejnou citlivostí jako u normotenzních jedinců [7.].

Další možností jsou hormonální mechanismy, ke kterým patří antidiuretický hormon, renin, angiotensin, aldosteron a epinefrin neboli sympatický neurotransmitter sekretován z nadledvin, který přímo stimuluje zvýšení srdeční frekvence, kontraktility srdce a cévní tonus. Renin je enzym syntetizován ledvinami a je z nich uvolňován při zvýšení aktivity sympatického nervového systému nebo snížení krevního tlaku, objemu extracelulární tekutiny nebo extracelulárního sodíku. Ledvin se dostává do krevního oběhu, kde enzymaticky působí na angiotensinogen a vzniká angiotensin I, který putuje do malých cév plic. V plicích dochází k přeměně z angiotensinu I na angiotensin II pomocí enzymu pocházejícího z endotelu cév. Angiotensin II má sice poločas rozpadu jen několik minut, ale je silný. Zuzuje cévy, čímž se zvýší periferní cévní odpor a krevní tlak. Jeho účinek je v krátkodobé regulaci krevního tlaku a druhá významná funkce je stimuluje sekreci aldosteronu z nadledvin. Aldosteron se účastní dlouhodobé regulace krevního tlaku, zvyšuje retenci vody a soli v ledvinách. K hormonálním mechanismům dále patří vasopresin neboli antidiuretický hormon (ADH), který je uvolňován při snížení objemu krve, krevního tlaku a zvýšení osmolarity tělních tekutin ze zadní hypofýzy. Způsobuje vazokonstrikci cév a tím zvýší krevní tlak. Následují hormony dřeně nadledvin neboli katecholaminy, adrenalin a noradrenalin zvyšují činnost levé srdeční komory, čímž zvyšují i krevní tlak. Dále se podílí společně s autonomním nervstvem na rozdělení krve mezi části krevního oběhu skrze jejich působení na arterioly v různých částech organismu [8., 9.].

3.3 Etiopatogeneze a patofyziologie hypertenze

Změny krevního tlaku jsou způsobeny 1) Činností levé srdeční komory, která během systoly vhání pod určitým tlakem krev do tepen, s jejím zvyšováním dochází také, ke zvyšování TK. 2) Objem krve ve velkých a středně velkých tepnách, který závisí na celkovém objemu krve a jeho následné rozdělení mezi velký oběh skládající se z tepen a ostatní části oběhu. Pokud se objem zvyšuje, tak se zvyšuje i krevní tlak. 3) Odpor tepenného úseku velkého oběhu, který závisí na průsvitu a pružnosti tepen. Vasokonstrikce či vasodilatace je uskutečněna pomocí hladkých svalových buněk v tunice medii a buď zmenší, nebo zvětší průsvit cévy a tím i ovlivní možnosti přívodu krve do kapilárního řečiště. Kromě řízení průtoku krve zvyšuje nebo snižuje TK.

Vasokonstrikci a následné zvýšení krevního tlaku je následek účinku vyvolaného angiotensinem II. [8.]

Patofyziologie esenciální hypertenze

Je ovlivněná řadou exogenních a endogenních vlivů – je ideálním příkladem multifaktoriálního typu patogeneze. Mezi exogenní vlivy můžeme přiřadit zejména stres a dietu, u které hraje roli příjem soli (NaCl). Bylo zjištěno, že lidé s minimálním příjmem soli hypertenzí prakticky netrpí a u většiny případů ani s věkem krevní tlak nestoupá. Z tohoto důvodu je restrikce soli důležitou součástí terapie hypertenze. K výši krevního tlaku také přispívá konzumace alkoholu (40g alkoholu denně a více má za následek vyšší riziko vzniku hypertenze), vliv dalších dietních faktorů nebyl prokázán.

Dalším faktorem, který se podílí na tomto onemocnění, je tělesná hmotnost. U obézních lidí trpí až třetina hypertenzí, která souvisí s pokročilostí obezity. S poklesem tělesné váhy dochází k snížení krevního tlaku. Spojení obezity a hypertenze je nebezpečné z důvodu vzniku inzulinové rezistence neboli nižší citlivosti tkání k inzulinu, což vede k hyperinzulinémii následně k poruše glukózové tolerance až non-inzulin dependentním diabetem. Toto spojení zahrnuje i poruchy lipidů zejména hypertriglyceridémii a snížení hladiny HDL cholesterolu a hyperurikémii pojmenované jako Reavenův syndrom nebo metabolický syndrom X.

Stres je další uplatňující se faktor. Během něhož dochází k zvýšení srdečního výdeje, periferní cévní rezistence s vasokonstrikcí v ledvinách, následující retence sodíku a spuštění systému renin-angiotenzin.

K endogenním vlivům se řadí dědičné faktory a nejrůznější presorické, depresorické, apokrinní vlivy. U dědičných vlivů se nejedná o jednoduchý monogenní, ale naopak polygenní typ dědičnosti. Zhruba 30% esenciálních hypertenzí je zapříčiněno genetickou složkou. Například děti hypertonických rodičů měly zjištěny některé biochemické nálezy, k nimž se řadí vyšší hladina kalikreinu v moči, plazmatického adrenalinu, noradrenalinu a dopaminu, ale i metabolické nálezy jako jsou inzulinová rezistence, porucha glukózové tolerance, hyperlipidémie v době, kdy tyto děti hypertenzí ještě netrpěli.

K presorickým vlivům jsou přiřazeny katecholaminy, systém renin-angiotenzin-aldosteron, arginin-vazopresin, látky uvolňované cévní stěnou: endotelin

(vazokonstrikce), tromboxan TXA₂, dále kortizol, neuropeptid Y, inzulin atd. jmenované látky mají vliv na růst svalstva v cévní stěně, myokardu a občas na retenci sodíku a vody. Součástí depresorického systému je kalikrein-kininový systém, vazodilatační prostaglandiny (PGE₂), natriuretické peptidy, medullipin, adrenomedulin, prostacyklin (PGI₂), EDRF neboli endoteliální relaxační faktor – oxid dusnatý. Tyto látky působí tlumivým účinkem na myokard a tonus svalstva tunici medie mohou se projevovat diuretický a vazokonstrikčně. [10., 11., 12.]

Patofyziologie sekundární hypertenze

Má jasně identifikovatelnou příčinu. Mezi nejčastější příčiny patří onemocnění ledvin (tj. renovaskulární hypertenze), poruchy nadledvinek, Feochromocytom, koarktace aorty a spánkové apnoe. Na zvýšení krevního tlaku se v této skupině různou měrou podílí hyperdynamická cirkulace (zvětšený srdeční výdej), zvýšení periferní rezistence nebo oba mechanismy najednou.

a) Renální hypertenze

K ní se řadí celá řada především chronických onemocnění, ale mohou být i akutní. Nejčastější jsou diabetická nefropatie, intersticiální nefritidy, glomerulonefritidy, polycystické ledviny, vzácně tumory. U těchto nemocí je patogeneze hypertenze složitější, ale podíl na ni má snížená schopnost ledvin „pracovat“ se sodíkem a vodou, systém renin-angiotenzin-aldosteron, změněný poměr mezi celkovým množstvím sodíku v organismu a koncentrací angiotensinu v plazmě.

Renovaskulární hypertenze má příčinu ve vzniku ischemie ledvin s nadprodukcí reninu a angiotenzinu II. Může vést ke stenóze zejména ateroskleróze nebo fibromuskulární dysplazii a jiné. Ateroskleróza postihuje 70% až 90% případů a nejčastěji u starších osob. Zatímco fibromuskulární dysplazie má tendenci výskytu u mladších věkových skupin a nejčastěji u žen. Mohou se zapojit i genetické faktory, které společně s rizikovými faktory, jako jsou kouření a hyperlipidemie zvyšují její výskyt. [12.].

b) Endokrinní

✓ Feochromocytom

Je pojmenování pro nádor postihující dřen nadledvin nebo extradrenální sympatické ganglie. Nachází se pouze u 0,1% až 0,5% osob s hypertenzí, ale může navodit závažné hypertenzní krize. Vlivem nádoru dochází ke zvýšené produkci katecholaminů, z nichž převažuje noradrenalin, který svým účinkem na α_1 -adrenergní receptory zvyšuje tonus hladkého svalstva arteriol a tím zvyšuje celkový periferní odpor. Dále způsobí redistribuci celkového objemu krve k arteriím, jelikož zmenšuje objem venózní kapacitní část cirkulace. Důsledkem tohoto stavu dochází k záchvatovité nebo trvalé hypertenzi se značným kolísáním krevního tlaku. K uvolňování noradrenalinu a ostatních katecholaminů dochází v paroxysmech, při kterých dosahuje TK až 300/150 mmHg. Projevy těchto paroxysmů jsou bolest hlavy, nadměrné pocení, bušení srdce a k méně častým řadíme nervozitu, třes, úbytek váhy, slabost a únavu. Feochromocytom je typický příklad hypertenze způsobené zvýšeným periferním odporem, ale kvůli pozitivně inotropním a chromotropním účinkům katecholaminů je zřejmé, že se na záchvatovité hypertenzi pravděpodobně podílí i zvýšení srdečního výdeje. K diagnostice feochromocytomu se nejčastěji používají testy na katecholaminy a jeho metabolity v moči.

✓ Cushingův syndrom

Jeho propuknutí může být důsledkem poruch na ose hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Projevem je hypersekrece kortizolu z nadledvin. Syndrom můžeme rozdělit na tři formy centrální s nadprodukcí ACTH hypofýzou nebo periferní adenom kůry nadledvin a ektopickou formu s produkcí ACTH nebo CRH. Nadprodukce hormonů způsobuje retenci natria a zvýšenou citlivost stěny cév k ostatním vazopresorickým hormonům. Retence sodíku a stoupající minutový srdeční výdej způsobený zesíleným účinkem katecholaminů vedou k hypertenzi, která se vyskytuje u 80% takto nemocných lidí.

✓ Primární hyperaldosteronismus (Connův syndrom)

Jeho příčinou je jednostranný adenom, který se projevuje nadprodukcí mineralokortikoidů zejména aldosteronu. Hypertenzi zde způsobuje zvýšená retence natria, která současně zvětšuje cirkulující objem krve [7., 12., 13.].

c) Těhotenské

Hypertenze se vyskytuje u 6-8% všech těhotenství.

d) Koarktace aorty

Představuje zúžení aorty většinou v místě jejího isthmu (přechod oblouku v descendentní část). Má za následek zvýšení krevního tlaku na horních končetinách. Krevní tlak dolních končetin může být normální, ale spíše je snížený. Ke zvýšení srdeční produkce a udržování tlaku na spodní část těla je dosaženo prostřednictvím mechanismu renin-angiotensin-aldosteron.

Primární i sekundární hypertenze může mít různý průběh. Rozlišujeme benigní a maligní hypertenzi.

Benigní hypertenze má pozvolný nástup, ani její hodnoty nejsou příliš vysoké a orgánové změny se projevují v malé míře. K častějším projevům patří krvácení z nosu, závratě a bolesti hlavy. Objevují se i komplikace hlavně ateroskleróza s jejími důsledky, ke kterým řadíme ischemickou chorobu srdeční, ischemie dolních končetin, aneuryzma břišní aorty, malacie mozku, které mohou vést až k selhávání srdce, krvácení do mozku a vznik maligní hypertenze.

Maligní hypertenze postihuje méně než 5% nemocných. Na rozdíl od benigní hypertenze má prudký vzestup krevního tlaku, který sahá k hodnotám např. 240/180 mmHg. Dochází i ke zjevným orgánovým změnám, které se týkají zejména ledvin, kde jsou zasaženy drobné tepny koncentrickou proliferací intimy a arterioly fibrinoidní nekrózou (arteriolonekróza). V důsledku cévních odchylek se utváří segmentální nekrózy glomerulů neboli maligní nefroskleróza a uremie. Další časté změny jsou u oční sítnice (exsudace, edém papil, krvácení). Pacienti přežívají několik měsíců, poté umírají na selhání ledvin, krvácení do mozku či selhání srdce [14.].

Tab. 1. Klasifikace hypertenze dle WHO [12., 13., upraveno].

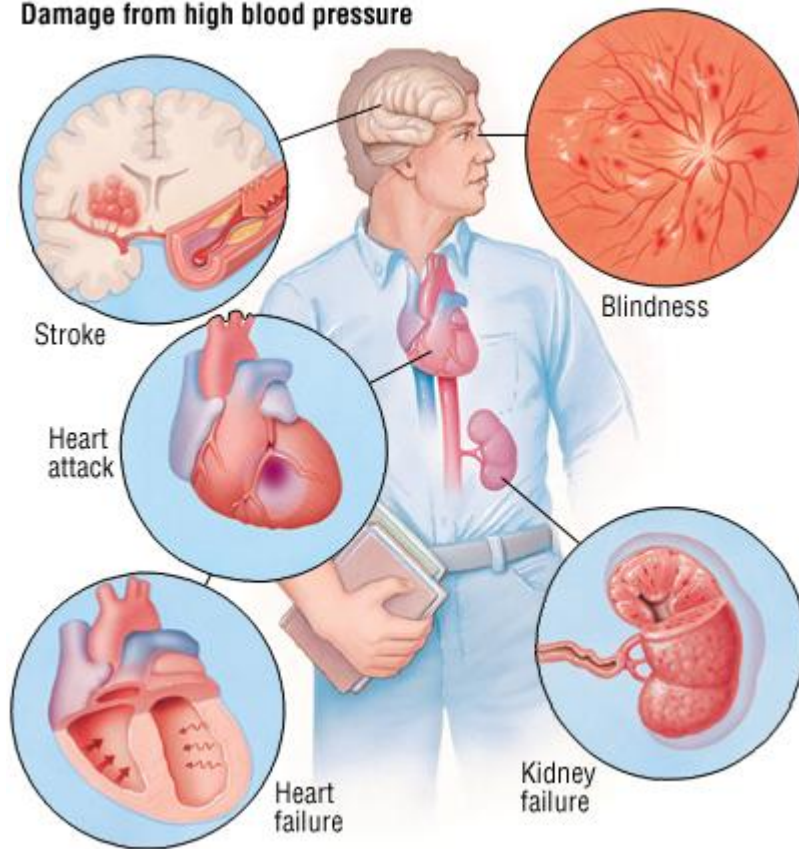
Stádium I	Bez orgánových změn
-----------	---------------------

Stádium II	Aspoň jedna z orgánových změn: hypertrofie levé komory, proteinurie, ateromový plát, aj.
Stádium III	Těžké orgánové změny se selháním funkcí: mozek – hypertenzní encefalopatie, srdce – ICHS, selhání ledvin, aj.

3.4 Klinické následky

Hypertenze se často vyskytuje současně s diabetes mellitus. Déle trávající hypertenze společně s nízkou hladinou HDL (high density lipoproteins), hypertrofií levé komory, zvýšenou hladinou cholesterolu a obezitou důležitý kardiovaskulární rizikovým faktorem. Tlak způsobuje poškození nejen tepen, v kterých se tvoří ateroskleróza, aneuryzma a arteriolonekrózy, ale také srdce. Srdce se tlakovému přetížení adaptuje přesněji jeho levá komora, u které dochází k hypertrofii a tloušťka stěny přesahuje 20mm. Tento stav je pojmenován jako hypertenzní srdce (cor hypertonicum). Jedná se o kompenzační mechanismus, který může být dlouhou dobu bez příznaků až do vzniku např. fibrilace síní nebo dekompenzace srdce. Hypertrofie není neomezená, proto dochází k již zmíněné dekompenzaci – cor hypertonicum decompensatum, která je na rentgenovém snímku zviditelní zvětšením srdce a pravo- či levostranným selháním (perimaleolární otoky, edém plic). Dále vzniká dilatace hypertrofické levé komory. Dekompenzované srdce má vyšší nároky na přívod krve, což je těžké uskutečnit vzhledem k aterosklerotickým změnám, které zužují cévy. Důsledkem těchto změn dochází k ischemii ledvin, která prohlubuje hypertenzi a ostatních orgánů. (Viz. Obr.č.6.) [10., 14., 15].

Damage from high blood pressure



Obr. č. 6.: Následky hypertenze, stroke-mrtvice, heart attack-infarkt myokardu, heart failure- srdeční selhání, kidney failure-ledviné selhání. [27.]

4 Laboratorní zvířata

„Laboratorní zvíře je zvíře s přesně známými vlastnostmi genetickými, fyziologickými a jinými, které je speciálně chované pro experimentální účely. Takovéto zvíře je standardizováno po stránce výživy a prostředí a zůstává po všechny generace v prostorech laboratorního chovu [16].“

„Pokusné zvíře je jakékoli zvíře, na kterém se provádějí pokusy. Je to tedy pojem širší, zahrnující i zvířata laboratorní [16].“

4.1 Historie a výběr druhu zvířete

První zmínky o využívání zvířat k pokusům nalezneme již v pravěku, kde se na nich zkoušely účinky přirozených jedů. Demokritos v 5 st. př. Kr. odhalil pomocí pitev zvířecích těl jisté podobnosti ve stavbě zvířecího a lidského těla. Byly zachovány i písemné spisy fyziologických pokusů na prasatech a opicích, které prováděl CLAUDIUS GALÉNOS (130 - 210 př. Kr.). MARCELLO MALPIGHI (1628 - 1694) se zabýval histologií, již s pomocí mikroskopu. Patřil mezi první zastánce teorie o analogii ve stavbě a fyziologii živočišných orgánů a záměrně používal zvířecí modely. Postupem času se výběr zvířete upřesňuje a začíná se třídit na základě studovaného problému. Ze zvířat se už dříve vybíraly zejména ty, které žijí v bezprostřední blízkosti člověka. Z hlediska uplatnění přicházejí v úvahu druhy s malými nároky na prostředí, chov a potravu a s vysokou reprodukční schopností. A z tohoto důvodu se v laboratořích nejčastěji používají potkani, myši, morčata a králíci. V období mezi světovými válkami jsou užívány další druhy zvířat a vyšlechtěním řady kmenů laboratorních zvířat pokročila i standardizace pokusů.

Moderní přístup k laboratorním zvířatům zahrnuje snahu o minimalizaci utrpení zvířete v průběhu pokusu a v rámci možnosti snížení jejich počtu nebo náhradou jiným vhodným modelem. Tyto body se odrážejí v dodnes platné definici zásad 3 R od RUSSELA a BURCHEHO z roku 1959. Zásada 3 R:

- Refinement - zlepšení podmínek života zvířat v chovu a experimentu
- Replacement - nahrazování zvířat jinými vhodnými modely a obratlovců bezobratlými pokusnými zvířaty

- Reduction - snížení počtu používaných pokusných zvířat

Jednotlivé druhy laboratorních zvířat a jejich zástupci:

- Myši: BALB/c, ICR, NMRI, S, CBA, DBA, C3H, C57Bl
- Potkani: W (Wistar), LE (Long-Evans), SD (Sprague Dawley)
- Morčata: TRIK, DH (Dunkin Hartley)
- Králíci: NZW (New Zealand White), Ch (Chinchilla), SG (Silver Grey), Pro králíky se však častěji používá česká chovatelská nomenklatura, např. Nb - novozélandský bílý, Čv - činčila velká, Sč - stříbřitý malý černý.

K tomuto rozdělení se ještě řadí informace, zda je zvíře inbrední, outbrední či randombrední. Potomek vzájemně příbuzných rodičů se nazývá inbrední zvíře. Cílem tohoto křížení je snížit genetickou variabilitu a dosáhnout maximální homozygotnosti. Naopak outbrední zvíře vzniká křížením co nejméně příbuzných jedinců. Randombrední zvířata vynikají svou heterozygotností v uzavřené populaci zvířat. *„Chovné páry se vybírají podle pevného dlouhodobého plánu, přičemž populace chovných zvířat musí být udržována na konstantním počtu, kritéria stanovená pro výběr chovného materiálu musí být přísně dodržována a výběr nových chovných jedinců musí být prováděn z celé populace“ [16.]*

4.2 Spontánně hypertenzní potkani (SHR)

Spontánně hypertenzní potkani se nejčastěji používají jako model pro studium arteriální hypertenze. Jako jejich normotenzní kontrola se využívá potkanů s názvem Wistar Kyoto (WKY).

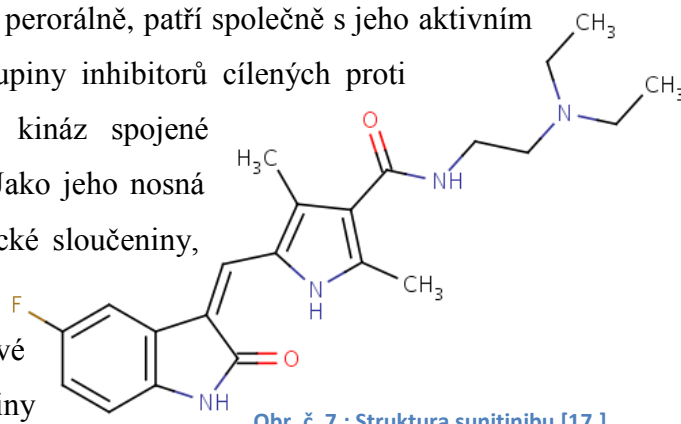
Tito spontánně hypertenzní potkani vznikají pářením samce Wistar se spontánní hypertenzí pocházející z kolonie v japonském Kyotu a samice se zvýšeným krevním tlakem. Dále se pokračuje v páření mezi sourozeneckými krysami, s výběrem pro spontánní hypertenzní, která je definovaná jako systolický krevní tlak vyšší než 150 mmHg trávající déle než jeden měsíc. Kolonie SHR jsou nejprve pre-hypertenzní přibližně prvních 6-8 týdnů života, jejich systolický krevní tlak se pohybuje kolem 100-120 mmHg. Hypertenze se u nich vyvíjí v průběhu dalších 12-14 týdnů. I u lidí se hypertenze vyvíjí rychleji a stává se těžší u samců než u samic SHR. *In vivo* studie

odhalily, že v počátcích hypertenze, SHRs mají zvýšený srdeční výdej, ale s normální celkovou periferní rezistencí. Čím více se SHR přibližují stavu hypertenze, tím se srdeční výdej vrací do normálu, ale u zbytnělých cév tento stav vede ke zvýšení celkového periferního odporu. Samec SHR se běžně používá například pro definování hypertenze, která je vyvolaná změnami signálních mechanismů nebo pro testování nových antihypertenziv. Lidská hypertenze je obtížná na studium z důvodu individuálních rozdílů ve dvou spouštěcích prvcích: polygenetické expozice a excitační faktory životního prostředí. Proto výzkumní pracovníci používají SHRs, které mají v každé kolonii jednotné polygenetické dispozice a excitační faktory životního prostředí. Hypertenze SHR se od lidské liší v tom, že u SHRs je její rozvoj v mladém věku spíše než ve středním věku jako tomu je u lidí. Jejich normotenzní kontrola byla založena později, jako inbrední kolonie Wistar Kyoto přes sourozenecké páření. Je ale nepravděpodobné, aby byl stupeň genetického rozdílu mezi SHR a WKY kmenů vztažen pouze na vysoký krevní tlak [15.].

5 Sunitinib

5.1 Popis

Sunitinib je lék podávaný perorálně, patří společně s jeho aktivním metabolitem (SU012662) do skupiny inhibitorů cílených proti široké škále receptorů tyrosin kináz spojené s růstem nádoru a angiogenezí. Jako jeho nosná konstrukce se používají aromatické sloučeniny, aryl halogenidy, alifatické aminy a aryly, indoly a indolové deriváty, karboxylové kyseliny s jejich deriváty a další. Jeho maximální plazmatické koncentrace jsou přítomné mezi 6-12 hod. po podání. *In vitro* byla prokázána jeho vazba na plazmatické bílkoviny z 90-95 %. Sunitinib je primárně metabolizován enzymem CYP3A4 (řazen k cytochromu P450) následně je produkován jeho aktivní metabolit, který je enzymem CYP3A4 dále zpracováván. Eliminace z těla je z 61 % stolicí a 16 % močí.



Obr. č. 7.: Struktura sunitinibu [17.]

Pro účinnou léčbu je zapotřebí znát lékové interakce:

- Rifabutin – může snížit hladinu sunitinibu
- Indinavir – může zvýšit hladinu sunitinibu
- Telithromycin – může snížit clearance sunitinibu
- Topotekan – sunitinib může zvýšit jeho biologickou dostupnost v ústech
- A další [17.].

5.2 Indikace, léčba

U tohoto léku byla prokázána klinická účinnost u pacientů s pokročilými gastrointestinálními nádory (GIST). U těchto pacientů bylo prokázáno, že průměrná doba do progresu nádoru a střední doba přežití bez progresu byla čtyřikrát i vícekrát delší pacientů užívajících sunitinib 50mg/den, než u pacientů užívajících placebo. Tato léčba byla v 6 -týdenním cyklu, který se skládal ze 4 týdnů léčby a poté 2 týdnů

odpočinků. Svoji protinádorovou aktivitu ukázal u pacientů s pokročilým renálním karcinomem (RCC) po neúspěšné cytokinové terapii. U metastazujících RCC byl sunitinib účinnější než interferon α . Tento lék byl i dobře snášen u takto nemocných pacientů, přičemž nežádoucí účinky byly mírné nebo středně závažné. Gastrointestinální stromální nádory (GIST) jsou poměrně vzácné, vyskytují se u nich mutace genů, který kódují například receptor tyrosin kinázy. U renálního karcinomu von Hippel Lindau gen kóduje protein nádoru, který se supresoricky podílí na regulaci hypoxie indukovaných genů, jako je vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a růstový faktor krevních destiček (PDGF) [18.].

5.3 Mechanismus účinku

Sunitinib, jakožto inhibitor tyrosin kináz (TKI) využívá jejich receptorů, přes které jsou zprostředkovány jeho protinádorové a antiangiogenní činnosti.

Tyrosin kináza je enzym, který katalyzuje vazbu fosfátu na hydroxylovou skupinu tyrosinu vázaného v bílkovině. Zdrojem fosfátu je molekula ATP – adenosintrifosfát. Dále se podílí na regulaci buněčného růstu i dělení a přenosu signálu do buňky. Svoji úlohu mají i u možného vzniku maligního nádoru, jelikož některé tyrosin kinázy jsou produkty onkogenů [19.].

Mezi receptory tyrosin kinázy patří PDGFR- α i PDGFR - β , VEGF s jeho receptory VEGFR-1 a VEGFR-2, KIT – receptor faktoru kmenových buněk, FMS - jako tyrosin kináza-3 a další. Inhibitory způsobí blokaci extracelulární vazby například VEGF na jeho receptor s použitím protilátky anti-VEGF a blokaci intracelulární signalizační dráhy VEGFR. Jak již bylo řečeno VEGF podporuje angiogenezi z čehož vyplývá, že inhibicí této dráhy se přeruší i angiogeneze v nádoru. Výsledkem inhibice je snížení krevního zásobení nádoru, které je nezbytné pro jeho růst a šíření. Dochází tak k zastavení růstu nádoru a zamezení jeho progresu do dalších tkání.

5.4 Nežádoucí účinky

Závažnost vedlejších účinků sunitinibu vedla u některých pacientů jen ke snížení dávky, ale i k ukončení léčby. Můžeme je rozdělit do dvou skupin podle frekvence výskytu. Méně často se vyskytující riziko krvácení, „Hand-foot“ syndrom (projev kožní

toxicity protinádorové léčby, jde o exantémové virové onemocnění), zvýšené riziko tromboembolických příhod, toxicita nadledvin (která byla prokázána u potkanů i opic a projevovala se krvácením, nekrózou, hypertrofií a zánětem), zvýšením hladiny adrenokortikotropního hormonu (ACTH), poruchy štítné žlázy.

A v druhé skupině nejčastěji se vyskytující nežádoucí účinky:

- Únava
- Gastrointestinální potíže (poruchy v dutině ústní, průjem, ...)
- hypertenze

5.4.1 Únava

Vyčerpání, únava nebo nedostatek síly je často spojován s celou řadou onemocnění endokrinních, u rakoviny, systémového onemocnění nebo léčby rakoviny. Tento symptom není radno podceňovat, jelikož může být sekundárním ukazatelem onemocnění štítné žlázy či její dysfunkce. Pacientovi je nezbytné podávat informace pro posouzení příčin, ale i jak se s únavou vypořádat v průběhu celé léčby sunitinibem a zachovat si společenské a fyzické aktivity. K těmto účelům slouží různá poradenství.

5.4.2 Gastrointestinální potíže

Poruchy v dutině ústní mohou být stomatitida, zánět sliznice, přecitlivělost, ústní vředy a změna chuti. Mezi preventivní opatření ústních poruch se doporučuje vyhýbání se dráždivých potravin nebo nápojů (např.: kyselé), kořeněná jídla, velmi horké a velmi studená jídla nebo nápoje a suché a tvrdé potraviny. Pro ochranu sliznic se doporučuje používat masti nebo pastilky a pro prevenci podráždění sliznice používat měkké kartáčky nealkoholické ústní vody a mírné zubní pasty.

Průjem je u léčby sunitinibem častý a může se zhoršovat s delší dobrou léčby. K prevenci patří rozdělit jídlo a pití v malých množstvích na celý den, nekonzumovat kořeněná jídla nebo smažená a velké množství ovoce a ovocných šťáv. Pro léčbu průjmu je v tomto případě vhodný loperamid.

5.4.3 Hypertenze

Stupeň hypertenze u pacientů s nádorem závisí na typu použitého léčiva (sunitinib, sorafenib,...), věku pacienta a přítomnosti srdečních onemocnění. Lék, který

zvýší buď srdeční výdej, nebo systémovou vaskulární rezistenci (SVR) zvýší i krevní tlak. SVR mohou způsobit neurohormonální faktory, endoteliální dysfunkce spojená se snížením oxidu dusnatého (NO), zvýšení oxidačního stresu a snížení hustoty kapilár. NO vzniká činností enzymu endoteliální NO syntázy (NOS) v průběhu oxidace aminokyselin L-argininu a L-citrulinu. V lidském těle jsou známy tři různé NO syntázy, kódované třemi různými geny – indukibilní NOS (iNOS) využívána imunitním systémem, neuronální NOS (nNOS) a endoteliální NOS (eNOS). eNOS i nNOS jsou exprimovány k regulaci normálního vazomotorického tonu krevního tlaku. Vzniklý NO, vstupuje do endotelu, kde aktivuje řadu G-kináz, což se následně projeví vasodilatací. NO se ve velké míře podílí na hypertenzi a to nejen jeho produkcí, ale také propojením se systémem renin-angiotensin (kde je NO hlavním endogenním antagonistou angiotensinu 2). Snížená produkce NO, která může být způsobena inhibicí VEGFR je důsledkem, nikoliv příčinou hypertenze. Antihypertenzní léčba se volí podle toho, jestli pacient, který má podstoupit léčbu sunitinibem má či nemá hypertenzi. U pacientů, kteří již mají zvýšený krevní tlak se tato léčba volí podle stupně hypertenze. Například u pacientů trpících vysokým krevním tlakem druhého stupně, již před zahájením léčby sunitinibem, se pozastaví nebo sníží dávky antihypertenziv při pravidelné 2-týdenní pauze (od terapie sunitinibu), výsledky u tohoto způsobu kombinování léků dosáhly u všech zúčastněných lékařů vysoké shody. Dalším kritériem volby antihypertenziv je jejich sklon ovlivňovat CYP3A4 (nejrozšířenější forma všech cytochromů P450, podílí se na většině známých přeměn léčiv) a prodlužování intervalu QT (interval představuje elektrickou systolu, začíná kmitem Q a končí koncem vlny T) i zde byla shoda >90%.

5.5 Využití

V současné době se v EU sunitinib používá u pacientů s neresekovatelným a/nebo metastatického maligního GIST po neúspěšné léčbě imatinibem z důvodu nesnášenlivosti či odporu a u pacientů s pokročilým a/nebo metastatickým RCC po neúspěšné interferon α nebo interleukin-2 terapii [18., 20.].

6 Hemoxygenáza 1 (HO-1)

6.1 Enzymy

Hemoxygenáza je součástí rozsáhlé skupiny nazvané enzymy, které umožňují katalytický efekt všech chemických reakcí v organismu. „Později bylo dokázáno, že enzym má velikou molekulu, že je to bílkovina, která si též v čistém stavu, po pečlivé izolaci, dokonce ve formě krystalu, zachovává aktivitu.“ K zajištění aktivity je důležitá přítomnost neproteinového faktoru neboli koenzymu. Bylo prokázáno, že enzym není stoprocentní bílkovina. Jeho bílkovinná část je nazvána apoenzym. Můžeme se zde setkat i se situací kdy, jeden enzym s totožným názvem se často vyskytuje ve více podobách, ale s menšími odchylkami například ve struktuře. Pokud jde o rozdíly podmíněné geneticky, jedná se o izoenzymy. [21.]

Enzym tvoří reakci se substrátem komplex enzym-substrát zapadající do sebe jako klíč do zámku. Tento substrát se váže na aktivní místo enzymu, které bývá obvykle jen jedno. Rychlost enzymové reakce můžeme zvýšit pomocí takzvaných „aktivátorů“, z nichž některé jsou integrální součástí enzymu. Mezi látky urychlující tyto reakce se řadí ionty kovů, buď jako součást metaloproteinů (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{3+}) nebo pocházející z okolního roztoku (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}). Mohou se do této kategorie zařadit i látky, které chrání enzym proti jeho inaktivaci, jako je redukovaný glutation (GSH), jelikož chrání SH skupiny enzymu před oxidací. Dále ovlivňuje rychlost reakce teplota a pH. Se zvyšující se teplotou dochází i k zvýšení rychlosti reakce optimum většiny enzymů je 37°C , u dalšího vzestupu teploty tato rychlost začíná klesat kvůli denaturaci enzymů. Většina bílkovin, jsou aktivní pouze v rámci úzkého rozmezí pH, obvykle 5 až 9. V důsledku vlivu pH na kombinaci faktorů: vazba substrátu enzymem, katalytickou aktivitu enzymu, ionizace substrátu a změna struktury bílkovin (obvykle významné až u extrémních změn pH). V rámci regulace metabolismu těla jsou přítomny látky, které naopak aktivitu enzymu snižují a pojmenovaný inhibitory.

Druhy inhibice:

- Kompetitivní – zde substrát s inhibitorem soutěží o stejné aktivní místo

- Nekompetitivní – na enzym se současně váže substrát do aktivního místa a inhibitor na jiné než aktivní místo, nedochází k soutěžení, inhibitor způsobí deformaci molekuly v aktivním místě a tím i sníží produkci daného enzymu
- Akompetitivní - inhibitor se váže na vzniklý komplex enzym-substrát

Význam enzymů není pouze v uvedené biologické funkci, ale má čím dál větší uplatnění pro praktickou medicínu. Pro lékaře jsou vynikající diagnostickou a prognostickou pomůckou. Rutinně se měří aktivita intracelulárních enzymů, které se ve zvýšené míře uvolňují z buňky do krve při jejím chorobném poškození. Také se užívají léčebným účelům například proteolytické enzymy k nekrvavému odstranění ložisek mrtvé tkáně či fibrinu [21., 22.].

6.2 Účinek

Poprvé byla hemoxygenáza detekována v jaterních mikrosomech. Tento enzym se podílí na rozkladu hemu na bilirubin. Dochází přitom k uvolnění železa (z hemu), oxidu uhelnatého (CO) a vzniku biliverdinu. Z biliverdinu se v přítomnosti bilirubin reductázy a redukované formy koenzymu nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADPH) vzniká bilirubin (Obr. č. 2). Bilirubin je dále vylučován do žluče, jako konjugát vznikající s pomocí kyseliny glukuronové.

HO má dvě geneticky odlišné izoformy HO-1, která se nejvíce exprimuje ve tkáních spojených s metabolismem erytrocytů nebo hemoglobinu a u ostatních tkáních sice v menší míře, ale rychle reaguje na transkripční aktivaci různých podmětů. Druhým izotopem je HO-2, která se nejsilněji exprimuje ve varlatech a také v jiných tkáních včetně cév, ale nereaguje na transkripční aktivaci. HO-1 se nachází v endoplazmatickém retikulu, plazmatické membráně buněk endotelu a mitochondriích jater. [23.]

6.3 Produkty

CO s bilirubinem byly dlouhou dobu řazeny do skupiny toxického odpadu, ale v roce 1987 byla zjištěna kladná stránka bilirubinu v antioxidační aktivitě (používají se Gunnovo potkani jako experimentální model hyperbilirubinémie) a CO přispívá k protizánětlivým vlastnostem HO. „*CO potlačuje prozánětlivé cytokiny a chemokiny jako tumor nekrotizující faktor α , interleukin- 1β , interleukin-6, monocyty*

chemoattractant protein-1, a makrofágů zánětlivých bílkovin 1 β a zvyšuje expresi protizánětlivého mediátoru interleukinu-10[23].“ Další vliv má CO v buněčné proliferaci, pokud dojde k inhibici tvorby CO, zvýší se růst hladkých svalových buněk spojený s reakcí endoteliálních mitogenů jako jsou endotelin-1 a růstový faktor destiček. Jeho účinek na hladké svalové buňky cév však nemusí být závislý na endotelu například: potlačení E2F-1 (transkripční faktor podílející se na progresi buněčného cyklu) pomocí indukce inhibitoru buněčného cyklu p21Cip1. V posledních deseti letech se význam HO výrazně oddálil z metabolického na ochrannou funkci enzymu v odlišných stavech spojených s buněčným stresem a patologií. Ze studie zkoumající vztah HO k aterosklerotickému cévnímu onemocnění vyplývá, že nízké koncentrace bilirubinu v séru mají vliv na zvýšené riziko koronárních tepenných onemocnění. [23.]

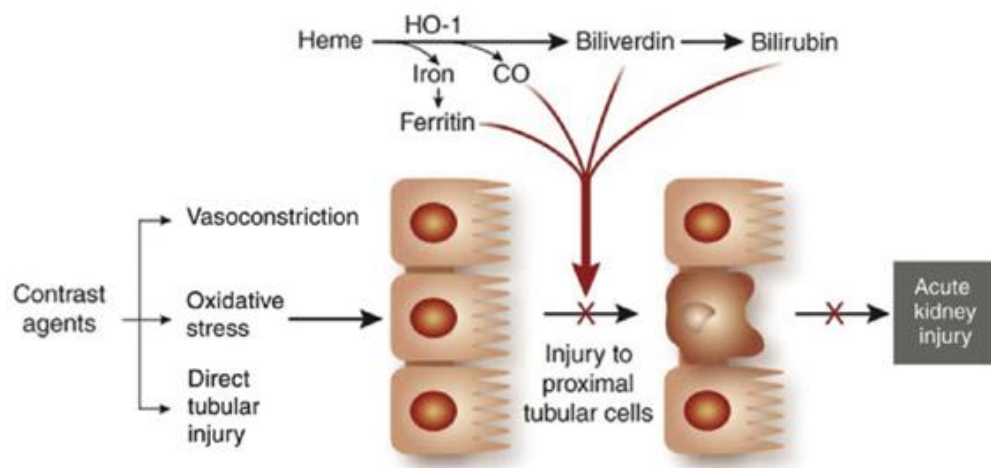
6.4 Aktivace a využití

Jsou tři různé varianty aktivace:

- MAPK
- Fosfatidyl 3 – kináza
- Proteinové kinázy A, C a G

Signální dráhy HO-1: jedna z prvních možností jak extracelulárními podněty aktivovat HO-1 je mitogeny aktivovaná protein kináza (MAPK), které patří mezi serin-tryptofanové protein kinázy. Na genové regulaci HO-1 se kromě MAPK podílí také fosfatidyl 3 -kináza a proteinové kinázy A, C a G. Na fyzické a chemické namáhání reaguje tělo zvýšenou syntézou HO-1 ve většině tkání, protože HO-1 patří mezi stresové proteiny, u kterých transkripční regulace reaguje na změnu prostředí.

Z výše uvedeného vztahu HO-1 k aterosklerotickému onemocnění se nabízí otázka, zda by se mohla využívat pro terapeutické účely? HO-1 je terapeuticky vhodným řešením aterosklerotických a kardiovaskulárních onemocnění, což se potvrdilo výsledky mnoha různých testů. Mezi takové lékové přípravky patří statiny, rapamycin, paklitaxel, oxid dusnatý, kyselina acetylsalicylová a probucol. Terapeutické použití HO-1 vyvolává doposud nezodpovězené otázky, kterými se bude zabývat další experimentální práce [23.].



Obr. č. 8: Účinek HO-1 , Obrázek poukazuje na ochrannou úlohu Hem oxygensy-1 v patogenezi akutního zranění ledvin a její aktivitu při přeměně z hemu na bilirubin. Produkty reakce HO-1 mají antioxidační, vasodilatační, protizánětlivé a antiapoptické účinky, vedoucí k zeslabení akutního zranění ledvin. Uvolněné železo je dále ukládáno do feritinu [28.]

7. Zadání práce

Jako součást komplexní studie jsme v této bakalářské práci chtěli popsat a vyhodnotit expresi hemooxygenázy-1 (HO-1) u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) potkanů s ohledem na podávání léčiva sunitinibu za použití imunohistochemických a stereologických metod. Sledovali jsme, zda podávání sunitinibu ovlivní expresi HO-1 na cévním endotelu.

8. Experimentální část

8.1 Sunitinib – design experimentu

V experimentu se sledoval vliv dlouhodobé podávání sunitinibu (10 mg/kg za den v pitné vodě) spontánně hypertenzním potkanům (SHR).

Zvířata byla rozdělena do 2 skupin a v každé skupině bylo 6 zvířat. První skupině byl podáván sunitinib, druhá skupina pak sloužila jako kontrola a zvířatům byla podávána pouze voda. Aplikace sunitinibu (nebo čisté vody u kontrolní skupiny) probíhala denně po dobu 8 týdnů, což představuje dvakrát tak delší dobu, než je doporučována u pacientů. Po těchto 8 týdnech se potkanům nechalo 5 dní na zotavení. Poté následovalo další podávání sunitinibu u SHR potkanů 8 týdnů. Usmrcení zvířat proběhlo 24 h po poslední dávce.

8.2 Imunohistochemie

Základem imunohistochemických metod je detekce specifických antigeních determinant (molekul či jejich částí) ve tkáni s využitím vazby antigenu a protilátky.

Pro analýzu byly odebrány segmenty aorty, které se umístili do zmrazovacího media, následně zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při mínus 80°C. Na zmrazovacím mikrotomu se ze segmentů dále zhotoví příčné řezy o tloušťce 7 mikrometrů. Řezy se dále vkládají na sklíčko s želatinou, poté jsou vysoušeny vzduchem a na konci přípravné fáze fixovány v acetonu (20min. při 20°C).

K určení exprese HO-1 využijeme metodu En Vision s detekcí pomocí DAB.

8.2.1 Metoda En Vision

Pracovní postup

Preparát se po fixaci v acetonu nechá 30 minut sušit na vzduchu. Dále řezy vložíme na 5 minut do fosfátového pufru (PBS). Nespecifická vazebná místa se musí před převrstvením primární protilátkou zablokovat pomocí 10% roztoku goat séra (kozí sérum) ředěného v PBS. Sérum necháme na tkáň působit 30 minut.

V dalším kroku můžeme na preparát nakapat, již zmíněnou primární protilátku mouse anti-rat HO-1 ředěnou 1/100. Primární protilátka se ponechá 1 hodinu inkubovat. Dále se preparát oplachuje v PBS a to dvakrát po 5 minutách.

Endogenní peroxidázovou aktivitu tkáně bylo nutno potlačit použitím 3% peroxidu vodíku (ředěného v PBS), působení po dobu 15 minut. Dále je opět dvakrát oplach v PBS po dobu 5 minut s následným převrstvením sekundární protilátkou goat anti-mouse IgG na 30 minut. Po oplachu (2x5 minut v PBS) byla provedena vizualizace navázaných protilátek pomocí DAB - diaminobenzidinu (DAB substrát-chromogen roztok). DAB působí na tkáň po dobu 45 sekund a zapříčiní v místě, kde se nachází antigen hnědé zbarvení.

Po oplachu se jádra buněk dobarví hematoxylinem. Poté řezy zbavíme přebytečné vody, k tomu využijeme odvodňovací řadu: aceton-xylen (10:1) na 3 min., aceton-xylen (1:10) na 3 min. a xylen (3x2 min.). Nakonec sklíčka zamontujeme do Eukittu.

PROTOKOL – EN VISION – HO-1

1. fixace aceton (-20°C)	30 min
2. usušit	30 min
3. PBS	5 min
4. 10% goat serum v PBS (900 µl PBS + 100 µl séra)	30 min
5. anti-HO-1 (+ BSA) 1:50	60 minut
6. PBS	2x5 min
7. 3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml PBS)	15 min
8. PBS	2x5 min
9. anti-rabbit EnVision (ready to use + rat serum)	30 min
10. PBS	2x5 min
11. DAB (10 µl na 500 µl pufru)	45 s
12. PBS	oplach
13. dobarvení jader Hematoxylin 1/5	5s + 1 min modrání
14. redest. H ₂ O	oplach
15. aceton	oplach

16. aceton-xylen (10:1)→aceton xylen (1:10)	3 min
17. 3x xylen	2 min
18. eukit	

8.2.2 Kvantitativní analýza imunohistochemie – stereologická analýza

Plocha velikosti endoteliální exprese HO-1 byla kvantifikována pomocí stereologických metod [35.]. Nejprve se nakrájela série 50 řezů o tloušťce 7 μ m. Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé barvení byl vybrán náhodně a pak se vybral každý 10 řez, takže pět řezů pro každé barvení bylo použito ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 100 průsečíků mezi body sítě a HO-1 barvení na cévním endotelu na jednu cévu. Odhadovaná plocha barvení se vypočetla podle vzorce:

$$estA = a * P,$$

kde parametr a charakterizuje plochu příslušející jednomu testovacímu bodu a P je počet průsečíků mezi body testovací sítě a pozitivitou barvení.

Fotodokumentace a digitalizace obrazu z mikroskopu byly provedeny s využitím Olympus AX 70, digitální firewire kamery Pixelink PL-A642 (Vitana Corp. Ottawa, Kanada) se softwarem, analýzy obrazu NIS (Laboratory Imaging, Česká republika). Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELIPSA (ViDiTo, Slovensko).

Statistická analýza

Všechny hodnoty v grafu jsou předkládány jako \pm S.E.M. $n = 8$ zvířata. Statistická významnost v rozdílech mezi skupinami byla posuzována t-testem s využitím GraphPad Prism 5.0 softwaru (GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornie, USA). P hodnoty 0,05 nebo méně byly považovány za statisticky významné.

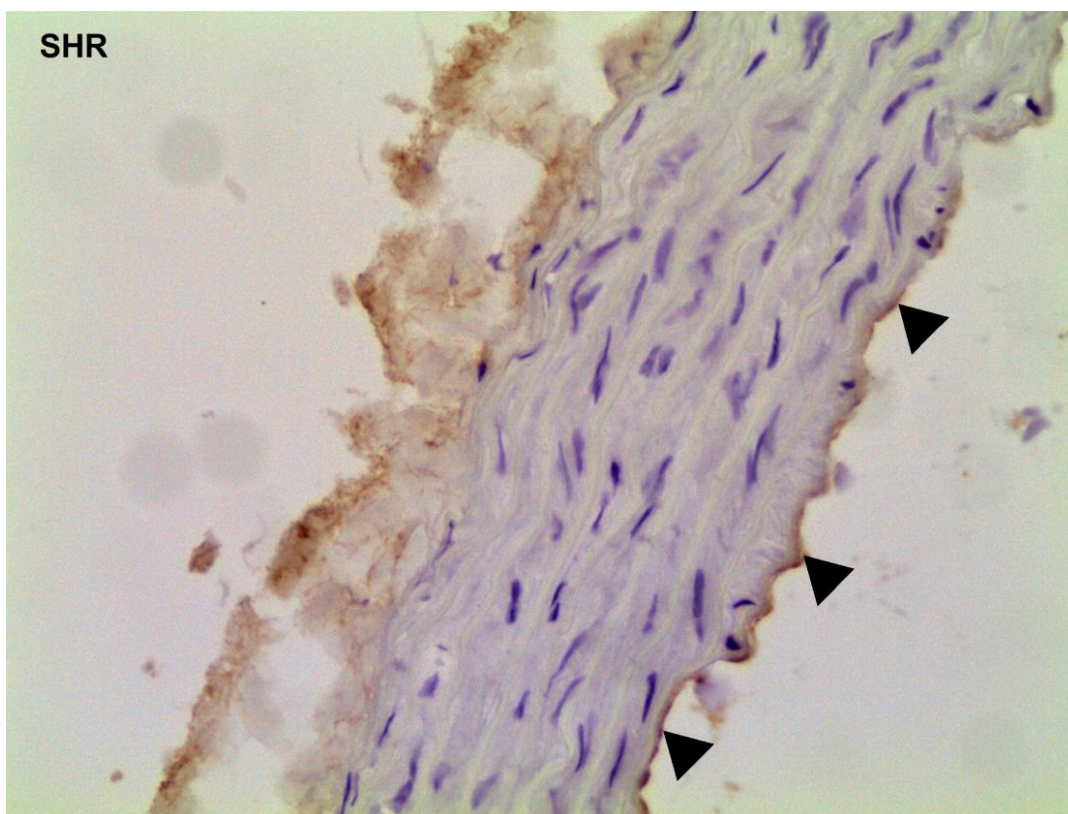
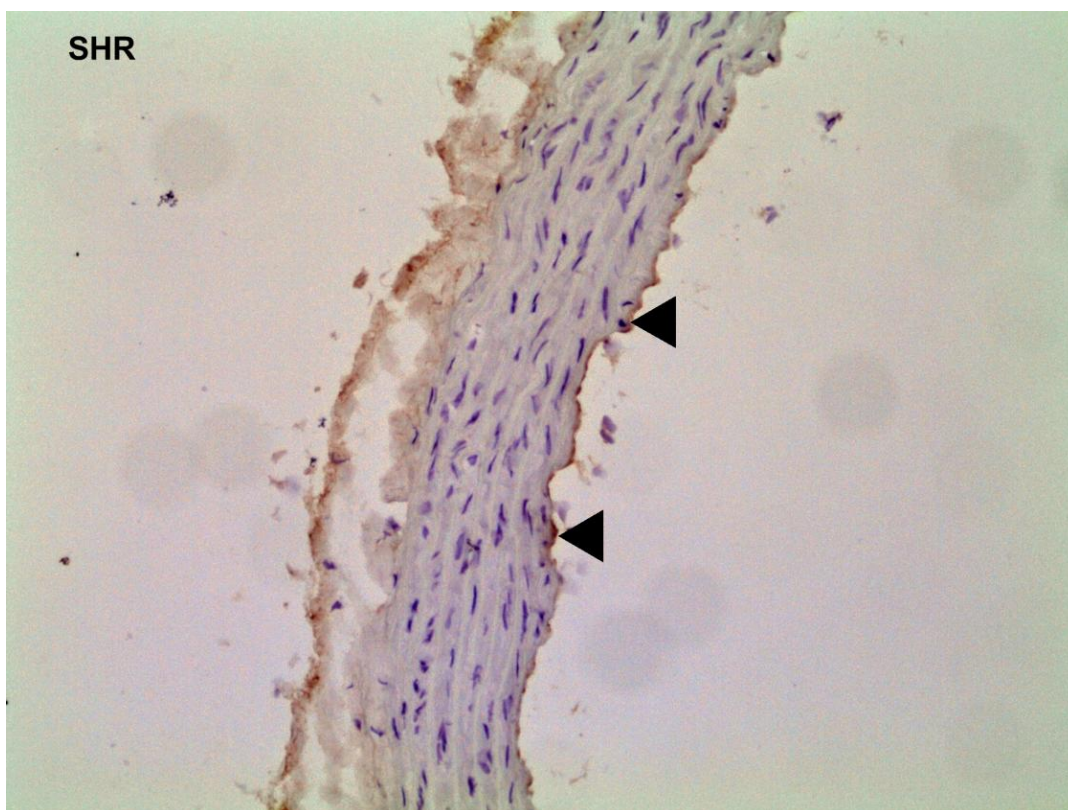
9. Výsledky

9.1 Imunohistochemická detekce HO-1 v aortě

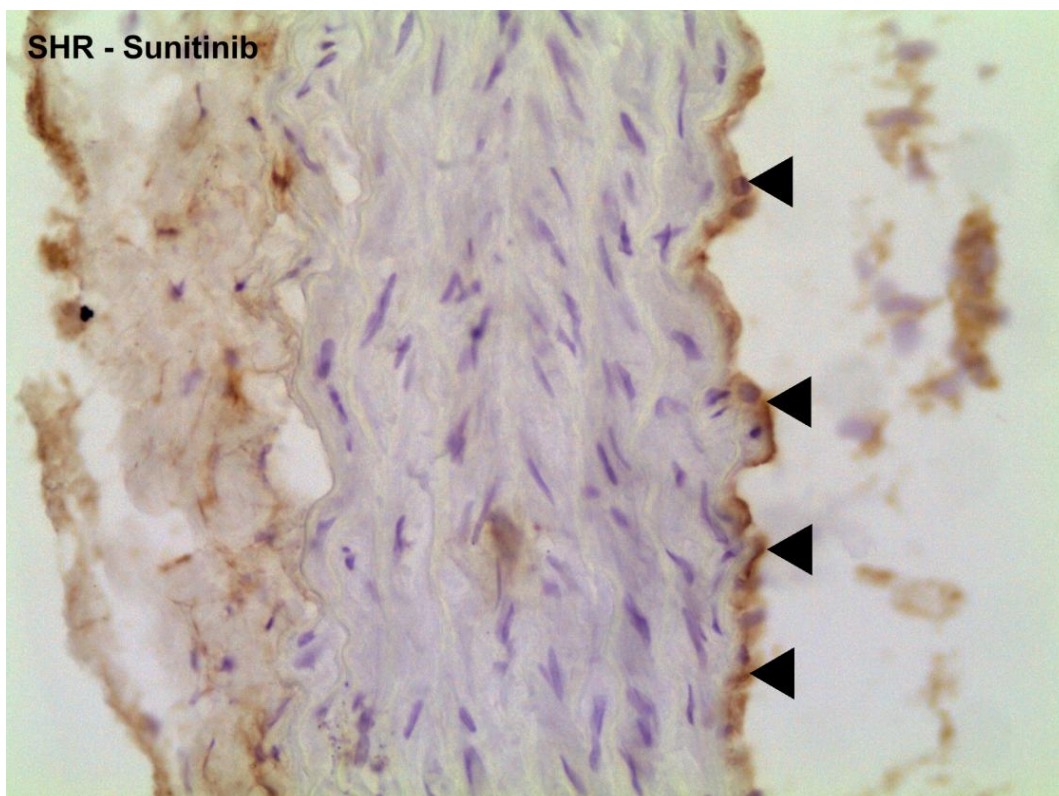
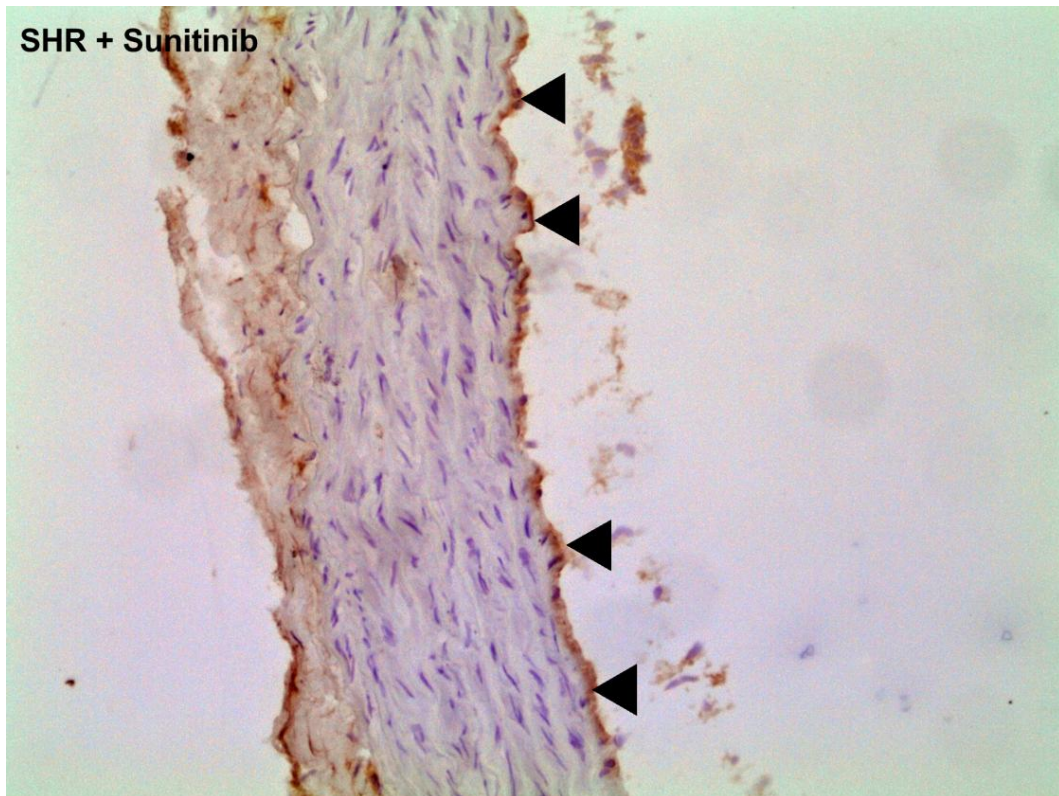
Celkově lze konstatovat, že v cévách nebyly pozorovány žádné morfologické abnormality viditelné ve světelném mikroskopu.

Imunohistochemické barvení bylo provedeno u 60 preparátů (řezů). 60 preparátů zahrnovalo 5 preparátů systematicky náhodně vybraných řezů z každého zvířete. V každé skupině bylo 6 zvířat. Imunohistochemická analýza prokázala expresi HO-1 pouze v buňkách cévního endotelu u obou skupin zvířat (obr. 9-12). Exprese byla detekována u všech zvířat v obou skupinách avšak exprese HO-1 byla výrazně silnější u skupiny potkanů, kterým byl podáván sunitinib (obr. 11 a 12). Exprese HO-1 nebyla pozorována mimo cévní endotel.

Obr. 9 a 10: Reprezentativní obrázek exprese HO-1 u kontrolních potkanů. Exprese HO-1 byla detekována pouze na cévním endotelu (šipky) u všech zvířat v neléčené skupině. Preparáty jsouobarveny hematoxylinem. Zvětšení 10x a 20x.



Obr. 11 a 12: Reprezentativní obrázky exprese HO-1 u potkanů, kterým byl podáván sunitinib. Silná exprese HO-1 na cévním endotelu byla typickým jevem pro skupinu potkanů léčených sunitinibem (šipky). Preparáty jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 10x a 20x.

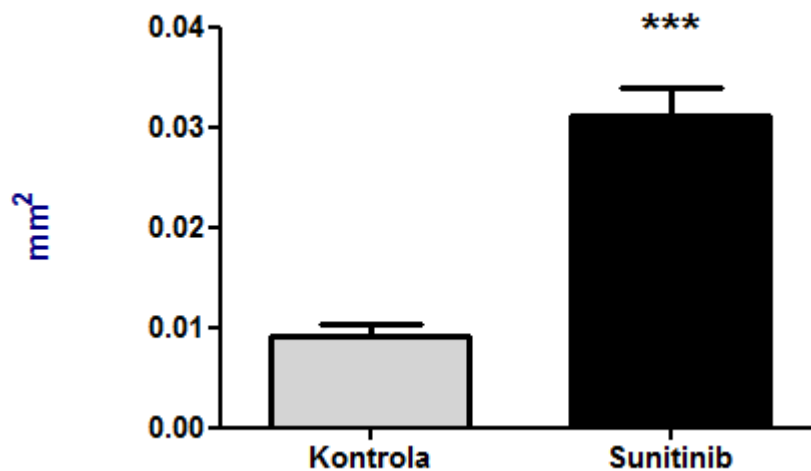


9.2 Stereologická analýza exprese HO-1 v aortě

Cílem této kvantifikace bylo zjistit účinek podávání sunitinibu na cévní endoteliální expresi HO-1 u SHR potkanů a vyjádřit tak kvantitativně výsledky imunohistochemické analýzy.

Stereologická analýza exprese prokázala signifikantní nárůst exprese HO-1 na cévním endotelu po podávání Sunitinibu ve srovnání s kontrolní skupinou (graf 1).

Graf 1: Stereologická analýza exprese HO-1 v aortě. Podávání Sunitinibu vedlo ke statisticky významnému zvýšení exprese HO-1 ve srovnání s kontrolní skupinou (*) ($P < 0.001$).**



10 Diskuse

Sunitinib malát představuje multikinázový inhibitor tyrosinkinázy, váže se na tyrosinkinázové domény receptorů pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR), PDGF, KIT, RET, FLT-3. Inhibuje tak aktivaci několika signálních drah v buňce a má jak antiangiogenní, tak protinádorový účinek [36.].

U tohoto léku byla prokázána klinická účinnost u pacientů s pokročilými gastrointestinálními nádory (GIST). Cílem Sunitinibu jsou tyto receptory tyrosinkináz: receptory pro růstový faktor destiček (PDGFR α a PDGFR β), receptory pro endoteliální růstový faktor (VEGFR-1, VEGFR-2 (Flk-1/KDR), VEGFR-3), receptory pro kolonie stimulující faktor typu 1 (CSF-1) receptory pro růstový faktor kmenových buněk (KIT), Fms protein tyrosinkinázy 3 (FIT-3) a receptory pro neutrofický faktor odvozeného od gliálních buněk (RET) [30.].

Sunitinib inhibuje angiogenezi v nádorech, čímž vede ke zpomalení nebo zastavení růstu těchto nádorů. Toho dosahuje blokádou signalizační kaskády pro VEGF. Blokáda VEGF signalizace však může být příčinou i případných nežádoucích účinků [34.]. Blokáda VEGF může vést k inhibici aktivity endoteliální NO syntázy (eNOS), což může být příčinou rozvoje arteriální hypertenze, která je jak nežádoucím účinkem, tak také jakýmsi markerem efektivity podávání sunitinibu [37.]. Podávání Sunitinibu avšak také ovlivňuje srdeční činnost a může vést k srdečnímu selhání [31.].

Hemoxygenáza je enzym, který se podílí na rozkladu hemu a výsledkem je malé množství biliverdinu, železa a oxidu uhelnatého (CO). Jsou známy dvě izoformy hemoxygenázy, z nichž HO-1 je vysoce inducibilní enzym. HO-1 je produkována ve většině savčích tkání a lokalizována v endoplazmatickém retikulu, zatímco HO-2 se nachází v mozku, varlatech, endotelu, distálních tubulech nefronu, játrech a myenterickém plexu břicha se subcelulární lokalizací v mitochondriích [32.]. Zvýšená regulace genové exprese HO-1 brání vaskulární endoteliální dysfunkci a buněčné smrti prostřednictvím poklesu hladiny volných kyslíkových radikálů.

Cílem této bakalářské práce bylo popsat a kvantifikovat expresi HO-1 u spontánně hypertenzních potkanů s ohledem na podávání léčiva sunitinibu za použití imunohistochemických a stereologických metod. Cílem bylo tedy ověřit jeho případný vliv na endotel aorty.

Expresse HO-1 byla sledována na 60 řezech aorty. Expresse byla detekována pouze na cévním endotelu v aortě. Expresse HO-1 byla nalezena u všech zvířat v experimentu. Podávání sunitinibu vedlo k signifikantnímu nárůstu exprese HO-1 ve srovnání s neléčenou skupinou.

Několik studií ukázalo protektivní vliv HO-1 u různých patologických stavů a to zejména u kardiovaskulárních onemocnění [29.]. HO-1 má antioxidační, protizánětlivé účinky, které souvisí s metabolity, které vznikají díky její aktivitě, což je CO a bilirubin [33.].

V této bakalářské práci tedy podávání sunitinibu vedlo ke zvýšení exprese HO-1 ve srovnání s neléčenou skupinou u hypertenzních potkanů. Tento překvapivý výsledek ukazuje na to, že endotel reaguje na podávání Sunitinibu. Otázkou zůstává, co toto zvýšení exprese znamená. Původně se dalo očekávat, že exprese bude klesat v důsledku vyššího krevního tlaku a potkanů léčených sunitinibem. Pokles exprese HO-1 byl dáván do souvislosti s rozvojem hypertenze a zvyšování jeho aktivity vedlo ke snižování krevního tlaku [32.]. Můžeme tedy zatím pouze spekulovat, že se jedná o protektivní aktivaci endotelu aorty v důsledku potenciálně toxického vlivu Sunitinibu. To však bude dále studováno na základě exprese dalších markerů endoteliální dysfunkce.

11 Závěr

Imunohistochemická analýza ukázala expresi HO-1 pouze u endotelových buněk aorty. Exprese HO-1 byla nalezena u všech zvířat v experimentu.

Podávání sunitinibu vedlo k signifikantnímu nárůstu exprese HO-1 ve srovnání s neléčenou skupinou, což bylo prokázáno pomocí imunohistochemických a stereologických metod.

Tato zvýšená exprese může souviset s rozvojem protektivní reakce cévního endotelu aorty na podávání sunitinibu.

Podávání Sunitinibu ovlivňuje cévní endotel, takže je potřeba brát v úvahu jeho potenciální toxické účinky v cévním řečišti podobně jako to bylo popsáno v srdci.

12 Seznam zkratek

ACTH - *adrenocorticotropic hormone*, adrenokortikotropní hormon

ADH – antidiuretický hormon

ATP – *adenosine triphosphate*, adenosintrifosfát

CNS – centrální nervová soustava

CO - oxidu uhelnatého

CYP3A4 – enzym řazen k cytochromu P450

EDRF - *endothelium-derived relaxing factor*, endoteliální relaxační faktor

GIST - *Gastrointestinal stromal tumour*, Gastrointestinální stromální tumor

HDL - *high density lipoproteins*, lipoproteiny vysoké hustoty

HO-1 - Hemoxygenáza 1

ICHS – Ischemická choroba srdeční

MAPK - mitogeny aktivovaná protein kináza

NADPH – nikotinamidadeninukleotidfosfátu

NO - oxid dusnatý

NOS - enzym endoteliální NO syntáza

PDGF - *platelet derived growth factor*, růstový faktor krevních destiček

PGE2 - vazodilatační prostaglandin E2

PGI2 – prostacyklin I2

RCC - *renal cell carcinoma*, renální karcinom

SHR- *spontaneously hypertensive rat*, spontánně hypertenzní potkani

SVR - systémovou vaskulární rezistenci

Tk – krevní tlak

TKI - inhibitor tyrosin kináz

VEGF - *vascular endothelial growth factor*, vaskulární endoteliální růstový faktor

WHO – *World health organization*, Světová zdravotnická organizace

WKY - Wistar Kyoto potkani

13 Seznam použité literatury

1. MESCHER A., *Junqueira's Basic Histology*, McGraw-Hill Companies 2009, ISBN 9780071714754, str. 185 – 191
2. JOHNSON K. E., *Histology and cell biology*, Williams and Wilkins 1991, ISBN 0-683-06210-7, str. 183 - 184
3. KONRÁDOVÁ V., UHLÍK J., VAJNER L., *Funkční histologie*, H a H 2000, ISBN 80-86022-80-3, str. 117-121
4. MALÍNSKÝ J., LICHNOVSKÝ V., MICHALÍKOVÁ Z., *Přehled histologie člověka v obrazech*, Univerzita Palackého v Olomouci 2009, ISBN: 978-80-244-2277-0, str. 12
5. ROSS M. H., PAWLINA W., *Histology a text and atlas*, Williams and Wilkins 2011, ISBN 978-0-7817-7200-6, str. 425
6. HORKÝ K., WIDIMSKÝ J., CÍFKOVÁ R., *Doporučení diagnostických a léčebných postupů u arteriální hypertenze*, Praha 1997, odborný článek <http://new.euromise.org/czech/tajne/hypertenze/hyper.html>
7. NEČAS E. A SPOL., *Patologická fyziologie orgánových systémů*, Karolinum 2006, ISBN 80-246-0615-1, str. 131
8. STŘÍTESKÝ J., HALBERSTADT P., *Patologie*, Scientia medica 1995, ISBN 80-85526-47-6, str. 25-26
9. PORTH C. M., *Pathophysiology: Concepts of Altered Health States*, 2004, ISBN-10: 0781749883 a ISBN-13: 978-0781749886, str. 3-6
10. SILBERNAGL, STEFAN, LANG, FLORIAN, *Atlas patofyziologie člověka*, Praha 2001, ISBN 80-7169-986-3, str. 206-232
11. ŠPINAR J. A SPOL., *Hypertenze, diagnostika a léčba*, Praha 1999, ISBN 80-7169-736-2, str. 15-25
12. WIDIMSKÝ P. A SPOL., *Základní klinické problémy v kardiologii a pneumologii*, Triron 2004, ISBN: 8072544586, str. 72-75

13. SOVOVÁ E., HRČKOVÁ Y., MAREČKOVÁ J., KMONÍČKOVÁ A., *Hypertenze pro praxi - pro lékaře, studenty, sestry, pacienty*, Olomouc 2008, ISBN 978-80-244-1968-8, str. 11-52
14. POVÝŠIL C., ŠTEINER I., DUŠEK P., *Speciální patologie*, Karolinum 2004, ISBN 80-246-0951-7, str. 31
15. DOGGRELL S. A., BROWN L., *Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure*, Elsevier Science B. V. 1998, str. 89-105
16. JEBAVÝ L. A SPOL., *Chov laboratorních zvířat*, Česká zemědělská univerzita v Praze 2011, ISBN: 978-80-213-2176-2, str. 3-25
17. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01268> (28.2.2012)
18. DEEKS E. D., KEATING G.M., *Sunitinib*, časopis ADIS DRUG PROFILE redakční kancelář Wolters KluwerHealth, Conshohocken 2006, str. 2255-2266
19. <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/tyrosinkinaza> (3.5.2012)
20. MISS GALLEGO G. A., GALLEGO G. A., Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, *Molecular basis of hypertension side effects induced by Sunitinib*, str.4-23
21. LEDVINA M. A SPOL., *Biochemie pro studující medicíny*, Karolinum 2009, ISBN: 9788024614144, str. 27-42
22. VOET D., VOET J. G., *Biochemistry*, JOHN WILEY & SONS 2011, ISBN 13 978-0470-57095-1, str. 469-496
23. STOCKER R., PERRELLA M. A., *Heme Oxygenase-1: A Novel Drug Target for Atherosclerotic Diseases?*, American Heart Association 2006, ISSN: 1524-4539, str. 2178-2189
23. <http://www.vhlab.umn.edu/atlas/phystutorial/phystutorial2.shtml> (5.3.2012)
24. <http://www.siumed.edu/~dking2/crr/CR046b.htm>,
<http://www.siumed.edu/~dking2/crr/CR025b.htm> (7.3.2012)
25. <http://glasgowpbl.wikispaces.com/Block+5+Scenario+4> (9.3.2012)

26. <http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/vascularmodelingpage/circsystempage/microvessels/microvessels.html> (11.3.2012)
27. <http://www.drugs.com/health-guide/high-blood-pressure-hypertension.html> (15.3.2012)
28. http://www.nature.com/ki/journal/v72/n8/fig_tab/5002530f1.html (16.3.2012)
29. CAO J., INOUE K., LI X. ET AL., *Physiological significance of heme oxygenase in hypertension*, Int J Biochem Cell Biol 2009, str. 1025-1033
30. FAIVRE S., DEMETRI G., SARGENT W., RAYMOND E., *Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development*, Nat Rev Drug Discov 2007, str. 734-745
31. GUPTA R., MAITLAND M.L., *Sunitinib, hypertension, and heart failure: a model for kinase inhibitor-mediated cardiotoxicity*, Curr Hypertens Rep 2011, str. 430-435
32. HOSICK P.A., STEC D.E., *Heme oxygenase, a novel target for the treatment of hypertension and obesity?*, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2012, str. 207-214
33. KRONENBERG F., *Association of bilirubin with cardiovascular outcomes: more hype than substance?*, Circ Cardiovasc Genet 2010, str. 308-310
34. MENA A.C., PULIDO E.G., GUILLEN-PONCE C., *Understanding the molecular-based mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitor: sunitinib*, Anticancer Drugs 2010, str. 3-11
35. NACHTIGAL P., SEMECKÝ V., GOJOVA A. ET AL., *The application of stereological methods for the quantitative analysis of the atherosclerotic lesions in rabbits*, Image Analysis and Stereology 2002, str. 165-174
36. PAPAETIS G.S., SYRIGOS K.N., *Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies*, BioDrugs 2009, str. 377-389
37. RIXE O., BILLEMONT B., IZZEDINE H., *Hypertension as a predictive factor of Sunitinib activity*, Ann Oncol 2007, str. 1117