

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Vliv Daunorubicinu na expresi buněčných adhezních molekul u králičího
modelu antracyklínové toxicity

Konzultant rigorózní práce: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Hradec Králové 2009

Mgr. Zuzana Nosková

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem zadanou rigorózní práci zpracovala sama s přispěním vedoucího práce a používala jsem pouze literaturu a zdroje, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně citovány. Dále prohlašuji, že nemám námitek proti půjčování nebo zveřejňování mé rigorózní práce nebo jejích částí se souhlasem katedry.

Datum: 22. 2. 2009

.....

podpis

Poděkování

Dovoluji si poděkovat PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení rigorózní práce, poskytnuté rady a za veškeré konzultace při práci v laboratoři.

Abstrakt	5
Abstract	6
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1. Mikroskopická anatomie cév	7
2.2. Kardiovaskulární systém	9
2.2.1. Kapiláry	9
2.2.2. Artérie	11
2.2.3. Vény	12
2.3. Fyziologické funkce jednotlivých součástí intimy	14
2.4. Endoteliální dysfunkce	21
2.5. Antracyklinové antineoplastické látky	25
2.5.1 Mechanismus cytostatického účinku	26
2.5.2 Způsob podání a farmakokinetika antracyklinů	27
2.5.3 Indikace antracyklinů	28
2.5.4 Extrakardiální nežádoucí a toxické účinky antracyklinů	28
2.5.5 Antracyklinová kardiotoxicita	29
2.5.6 Typy antracyklinové kardiotoxicity	30
2.5.6.1 Akutní kardiotoxicita	30
2.5.6.2 Subakutní kardiotoxicita	31
2.5.6.3 Chronická kardiotoxicita	31
2.5.6.4 Pozdní kardiotoxicita	31
2.6 Adhezní molekuly	33
3. CÍL PRÁCE	36
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	37
4.1 Zvířata a předepsaná dieta	37
5. IMUNOHISTOCHEMIE	39
6. VÝSLEDKY	40
7. DISKUSE	48
8. ZÁVĚR	50
9. SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ	51

Abstrakt

Cílem této rigorózní práce bylo detekovat změny endoteliální exprese VCAM-1 a ICAM-1 ve stěně aortálního oblouku králíků, kterým bylo podáváno antracyklinové cytostatikum daunorubicin. Sledovali jsme případné změny exprese obou adhezních molekul po různých dávkových intervalech podávání daunorubicinu.

Chronická antracyklinová kardiotoxicita byla navozena opakovaným podáním daunorubicinu (3 mg/kg=50 mg/m² i.v., 1x týdně) po dobu 10 týdnů. Pro sledování časového morfologických, změn aorty v průběhu rozvoje toxického účinku antracyklinů bylo utvořeno 10 daunorubicinových skupin (n=6), které reprezentovaly zvířata exponovaná různé kumulativní dávce DAU. Zvířata byla ukončována za 24 hodin nebo za 7 dnů po dané kumulativní dávce cytostatika. Výsledky byly porovnány s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat (n=6), kterým nebyla aplikována žádná látka.

Imunohistochemická analýza neprokázala indukci endoteliální exprese VCAM-1 ani u kontrolní a ani u daunorubicinové skupiny. Imunohistochemická analýza prokázala slabou endoteliální expresi ICAM-1 u obou skupin zvířat. Bohužel nebyl zaznamenán téměř žádný rozdíl v intenzitě barvení ICAM-1 mezi kontrolní a daunorubicinovou skupinou.

Výsledky této rigorózní práce neprokázaly rozvoj endoteliální dysfunkce po chronickém podávání daunorubicinu u králíka.

Abstract

The aim of this thesis was to evaluate possible changes of cell adhesion molecules expression in rabbit aorta after the administration of Daunorubicin. We focused on the expression of VCAM-1 and ICAM-1.

Chronic anthracycline cardiotoxicity was induced by repeated administration of daunorubicin (3 mg/kg=50 mg/m² i.v., 1x week) for the period of 10 weeks. We focused on the monitoring VCAM-1 and ICAM-1 expression in rabbit aorta. Ten daunorubicin groups were compared with control rabbits. The animals were killed 24 hours and/or 7 days after the administration of daunorubicin.

Immunohistochemical analysis showed no expression of VCAM-1 in any control or experimental groups. On the contrary the expression of ICAM-1 was detected in control and experimental groups. There was no significant difference between experimental and control rabbits with respect to the intensity and staining patterns.

In conclusion the administration of daunorubicin did not affect either VCAM-1 or ICAM-1 expression in aorta suggesting that endothelial dysfunction in aorta is not triggered by daunorubicin *in vivo*.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Mikroskopická anatomie cév

Všechny cévy (artérie, vény, kapiláry) jsou stavěny podle stejného základního stavebního plánu. Stěna cévy se skládá ze tří vrstev, které nazýváme tunica intima, tunica media a tunica adventicia (Klika 1986).

- ***Tunica intima***

Tunica intima je tvořena vrstvou endotelových buněk, které lemují vnitřní povrch cévy a vrstvou subendotelovou.

Endotelové buňky jsou polygonální, ploché. Jsou obvykle protažené ve směru toku krve. Centrální oblast buňky se vyklenuje do lumina cévy. Buňka vysílá tenké laterální výběžky, které mohou být pouze 0,2 μm tlusté. Ploché jádro je uloženo v centrální oblasti buňky. V okolí jádra se nachází malý Golgiho komplex, několik mitochondrií, nepříliš četné ribozomy a ojediněle drobné cisterny granulárního endoplazmatického retikula. Vyskytují se zde i elementy cytoskeletu – intermediální filamenta a četná aktinová mikrofilamenta. Přítomnost mikrofilament souvisí zřejmě s předpokládanou schopností těchto buněk se do určité míry kontrahovat. Mezi endotelovými buňkami jsou vyvinuty četné zonulae occludentes, nachází se zde také nexy. Endotelové buňky spočívají na bazální lamině. Endotelové buňky patří mezi dlouho žijící elementy. Vykazují jen nízkou mitotickou aktivitu.

Endotelové buňky mají antitrombogenní účinek. Zabraňují styku krevních destiček se subendotelovou tkání, jejich shlukování, vzniku trombů. Vykazují také značnou metabolickou aktivitu.

Subendotelová vrstva je tvořena řídkým kolagenním vazivem. Může obsahovat i jednotlivé hladké svalové buňky. Elementy tunica intima jsou uspořádány longitudinálně (Toborek and Kaiser 1999).

- ***Tunica media***

Hlavními strukturálními elementy tunica media jsou hladké svalové buňky. Hladké svalové buňky produkují mezibuněčnou hmotu. Je zde zastoupen zejména glukosaminoglykan chondroitin sulfát a proteoglykany tento glukosaminoglykan obsahující. Dále se zde nachází různé množství elastických a retikulárních vláken. Elastická vlákna vytvářejí v médiu cév jemné sítě nebo blanky. Vzhledem k vlastnostem elastinu tyto blanky nemohou být kompaktní. Jsou v nich vytvořeny otvory (fenestrae), které umožňují, aby živiny pronikaly do hlubších partií stěny cév. Nazývají se membranae fenestratae. Někdy se elastické struktury koncentrují na hranicích tunica media, vytvářejí membrana elastica interna a membrana elastica externa a oddělují tunica media od tunica intima i od tunica adventitia.

- ***Tunica adventicia***

Tunica adventitia je tvořena kolagenním vazivem. Z buněk zde nacházíme fibroblasty a adipocyty. Mohou se zde vyskytnout i hladké svalové buňky. Převažují zde longitudinálně uspořádaná kolagenní i elastická vlákna. V adventicii je obsažen převážně kolagen typu I, dále glykosaminoglykany dermatansulfát a v malé míře i heparansulfát.

Výživa stěny drobných cév je zajišťována difuzí a imbibicí výživných látek a kyslíku z krve protékající cévou. Cévy s průměrem větším než 1 mm mají vyvinutý ve stěnách systém vlastních cév, které nazýváme vasa vasorum. Vasa vasorum mohou vznikat jako větve artérie, kterou vyživují, nebo jsou zásobovány sousedními artériemi. Tyto cévy se mohou větvit v adventicii a v zevních oblastech média. Vasa vasorum se daleko častěji vyskytují ve stěnách vén než ve stěnách artérií. Je to způsobeno menší koncentrací kyslíku ve venózní krvi.

Ve stěnách většiny krevních cév, které obsahují hladké svalové buňky, se nachází mohutně vyvinutá síť sympatických nemyelinizovaných vazomotorických nervových vláken. Chemickým mediátorem je zde norepinefrin. Uvolnění norepinefrinu způsobuje vazokonstrikci. V artériích většinou eferentní nervová vlákna nepronikají až do tunica media. Norepinefrin musí difundovat několik mikrometrů, aby pronikl k hladkým svalovým buňkám média. Ve vénách se nervová zakončení nacházejí v adventicii i v médiu. Celkový počet nervových zakončení je ale menší než v artériích. Artérie kosterních svalů obsahují také zakončení parasympatických

nervových vláken. Jejich chemickým modulátorem je zde acetylcholin, který má zde vazodilatační účinek (Toborek and Kaiser 1999).

Všechny cévy mají poměrně velkou schopnost regenerace.

2.2. Kardiovaskulární systém

Kardiovaskulární systém tvoří srdce a cévy. Krevní cévy dělíme na artérie, kapiláry a žíly.

Artérie tvoří rozvětvený systém trubic. Jejich funkcí je přivádět krev obsahující kyslík a výživné látky ke tkáním. Kapiláry vytvářejí vzájemně propojenou síť v tkáních, kde dochází k výměně látek mezi krví a tkáněmi. Žíly představují systém trubic, který vzniká splýváním kapilár, a který vede krev s vysokým obsahem CO₂ a produktů metabolismu zpět k srdci.

2.2.1. Kapiláry

Stěna kapilár je tvořena vrstvou endotelových buněk. Průměr kapilár je 7-9 μm. Kapiláry se velmi často větví, proto jejich délka kolísá obvykle jen od 0,25 do 1 mm. Delší kapiláry nacházíme v některých kosterních svalech. Délka všech kapilár v lidském organismu se odhaduje na 96000 km.

Endotelové buňky tvořící stěnu kapilár jsou ploché, polygonální, pokrývají plochu asi 10 μm x 30 μm. Pinocytické vezikuly v tenkých laterálních výběžcích endotelových buněk zajišťují transcelulární transport různých látek. Počet pinocytických vezikul je obrazem intenzity transportu makromolekul endotelovou buňkou. Velký počet pinocytických molekul se nachází v endotelových buňkách kapilár v tkáni svalové, naproti tomu se jich málo nachází v kapilárách centrálního nervového systému.

Na různých místech se podél kapilár a malých venul vyskytují jednotlivé buňky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky, kterými částečně obklopují buňky endotelové. Nazývají se pericyty. Vytvářejí vlastní bazální laminu, která může někdy splývat

s bazální laminou buněk endotelových. V relativně málo diferencované cytoplazmě obsahují aktin, myozin a tropomyozin. Přítomnost těchto proteinů ukazuje, že pericyty mohou být schopny určité kontrakce. Představují první známku vývoje tunica media.

Podle struktury endotelových buněk a charakteru jejich bazální laminy můžeme kapiláry rozdělit do 4 skupin. Rozeznáváme kapiláry se souvislou endotelovou výstelkou, kapiláry fenestrované, kapiláry s póry a kapiláry sinusoidní.

- *Kapiláry se souvislou výstelkou* jsou lemovány endotelovými buňkami, kde nejsou vytvořeny fenestrace ani póry. Buňky leží na kontinuální bazální lamině. V cytoplazmě endotelových buněk se nachází různý počet pinocytických vezikul.

- *Kapiláry fenestrované* jsou vystlány endotelovými buňkami, které ve svých výběžcích mají vytvořeny fenestrace. Jsou to otvory 60 – 80 nm v průměru, které jsou přepaženy diafragmou. Diafragma je tenčí než biologické membrány a nemá typickou trilaminární strukturu. Endotelové buňky jsou obklopeny kontinuální bazální laminou. Fenestrované kapiláry nacházíme v orgánech, kde dochází k rychlé výměně látek mezi tkáněmi a krví: např. ve střevě, ve žlázách s vnitřní sekrecí.

- *Kapiláry s póry* jsou vystlány endotelovými buňkami, které mají ve svých výběžcích vytvořené otvory. Tyto póry nejsou přepaženy diafragmou. Bazální lamina těchto kapilár je kontinuální. Tento typ kapilár se nachází v glomerulech ledvin.

- *Kapiláry sinusoidní* mají nepravidelné lumen. Na některých místech měří v průměru 30-40 μm . Ve výběžcích endotelových buněk nacházíme četné póry i fenestrace. Bazální lamina sinusoid není kontinuální. V okolí sinusoid se vyskytují četné makrofágy. Vyskytují se např. v játrech a v kostní dřeni. V širokých sinusoidních kapilárách je tok krve výrazně zpomalen. Výměna látek mezi krví a tkáněmi je tu velmi usnadněna.

Bohatost kapilární sítě je závislá na metabolické aktivitě dané tkáně. Orgány s vysokou metabolickou aktivitou – např. játra, ledviny nebo myokard – mají bohatou kapilární síť. Naopak hladká svalová tkáň nebo tlusté kolagenní vazivo obsahují kapilár poměrně málo. Rychlost toku krve v aortě je asi 320 mm/s, zatímco v kapilárách jen asi 0,3 mm/s. Vzhledem k tenkosti stěny a pomalému průtoku krve jsou kapiláry vhodným místem pro výměnu látek mezi krví a tkáněmi. Malé molekuly kyslíku, oxidu uhličitého a glukózy difundují nebo jsou aktivně transportovány přes buněčnou membránu endotelových buněk. Molekuly pronikají fenestracemi nebo jsou transportovány pinocytickými vezikulami (Toborek and Kaiser 1999).

2.2.2 Artérie

Podle průměru se artérie dělí na arterioly, artérie malého a středního kalibru a artérie velkého kalibru.

Arterioly měří v průměru méně než 0,5 mm. Mají relativně úzké lumen vzhledem k tloušťce stěny. Tunica intima je tvořena vrstvou endotelových buněk a vrstvou subendotelovou. V endotelových buňkách vystylajících cévy větší než kapiláry se nachází tyčinkovitá granula (průměr 0,1 μm , délka 3 μm). Nazývají se Weibel-Paladeho granula. Obsahují protein nezbytný pro koagulaci krve (Willebrandův faktor). Chybění tohoto faktoru má za následek poruchu srážlivosti krve. Subendotelová vrstvička je velmi tenká. Membrana elastica interna se objevuje jen ve větších arteriolách, v menších arteriolách většinou chybí. Tunica media je složena z jedné až pěti vrstev hladkých svalových buněk. V nejmenších arteriolách je vrstvička hladkých svalových buněk diskontinuální. Endotelové buňky tu vysílají drobné výběžky, které pronikají bazální laminou a přicházejí do styku s hladkými svalovými buňkami. Toto spojení umožňuje, aby působení cirkulujících polypeptidů, které se účastní složitého procesu regulace krevního tlaku, a které se v první fázi vážou na endotelové buňky, bylo přeneseno na hladké svalové buňky. Membrana elastica externa není vyvinuta. Tunica adventitia arteriol je velmi tenká.

- *Artérie malého a středního kalibru* jsou většinou artériemi svalového typu. Vzhledem ke svému průsvitu mají poměrně tlustou stěnu. Tunica intima je tvořena endotelovými buňkami, které mají stejnou strukturu jako v arteriolách, subendotelová vrstvička je tlustší. Membrana elastica interna je dobře vyvinuta. V závislosti na průměru cévy obsahuje tunica media někdy až 40 vrstev hladkých svalových buněk. Mezi nimi se v různém množství nalézají elastická vlákna, která tvoří elastické lamely. Ve větších artériích svalového typu je vyvinuta i membrana elastica externa. Tunica adventicia je tvořena longitudiálně uspořádanými kolagenními a elastickými vlákny, dále se zde vyskytují fibroblasty a nepřilíš četné adipocyty. Ve stěnách artérií malého a středního kalibru se vyskytují vasa vasorum, lymfatické kapiláry a nervová vlákna, která někdy penetrují až do zevních oblastí tunica media.

- *Artérie velkého kalibru* jsou artériemi elastického typu. Tento typ artérií představují aorta, její velké větve a truncus pulmonalis. V poměru k velikosti lumina je stěna těchto artérií poměrně tenká. Artérie elastického typu mají v nativním stavu na průřezu nažloutlou barvu vzhledem k vysokému obsahu elastinu. Tunica intima je

tlustší než v artériích svalového typu. Endotelové buňky mají stejný charakter jako u ostatních cév. Subendotelová vrstva je tlustá, měří někdy až 100 μm . Membrana elastica interna se nedá odlišit od ostatních elastických blanek, které se nachází v tunica media. Nazývají se membranae fenestratae, ty jsou ve stěně artérií koncentricky uspořádány. Jejich počet se zvyšuje s věkem. U novorozenců se jich vyskytuje okolo 40, u starých jedinců jich nacházíme okolo 70. U starších jedinců se postupně stávají metabolicky inertními. Dochází k další depozici elastinu a lamely jsou tlustší. V tunica media artérií elastického typu se vyskytují dále hladké svalové buňky, které se upínají do elastických membrán. Tunica adventicia je tenká, obsahuje zejména longitudinálně uspořádaná elastická a kolagenní vlákna.

- *Velké artérie* se svou elastickou stěnou hrají úlohu pružníku. Zajišťují kontinuální tok krve v průběhu srdeční diastoly (Klika 1986).

2.2.3 Vény

Vény, obdobně jako artérie, dělíme na venuly a na malé, střední a velké vény. Při srovnání vény a artérie při stejném průměru, tak artérie má vždy silnější stěnu. Nejtlustší vrstvou stěny artérie je tunica media, zatímco u vén tunica adventitia.

Na postkapilární venuly s průměrem do 50 μm navazují sběrací venuly s lumenem mezi 50-100 μm . Endotelová výstelka těchto venul je obalena kontinuální vrstvou pericytů.

Sběrací venuly pokračují jako muskulární venuly s průměrem do 200 μm . Endotelové buňky jsou obklopeny 1-2 vrstvičkami hladkých svalových buněk, které zde nahrazují pericyty. Lze zde již rozeznat velmi tenkou adventicii.

- *Venuly* mají průměr 0,2-1 mm. Tunica intima je tvořena endotelem, pod kterým se nachází jen velmi málo subendotelového vaziva. Tunica media je tenká, sestává se z několika málo vrstev hladkých svalových buněk. Ve stěně některých venul nejsou hladké svalové buňky zastoupeny vůbec. Tunica adventitia je nejtlustší vrstvou stěny venul. Skládá se z kolagenního vaziva, kde se nachází četná longitudinálně uspořádaná kolagenní vlákna.

- *Malé a střední vény* měří v průměru 1-9 mm. Tunica intima je tvořena endotelem, subendotelová vrstvička je velmi tenká. Tunica media obsahuje spíše jen ploché svazečky hladkých svalových buněk, než celé vrstvy hladké svalové tkáně.

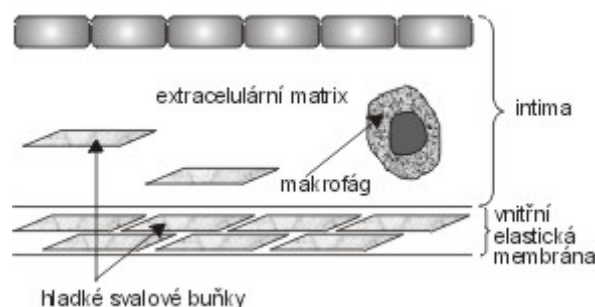
Mezi hladkými svalovými buňkami se nachází četná retikulární vlákna a jemná síť vláken elastických. Tunica adventitia je dobře vyvinuta, zde se nachází četná longitudinálně uspořádaná kolagenní vlákna, mohou se zde vyskytnout i longitudinálně uspořádané hladké svalové buňky.

- Struktura stěny *velkých vén* se výrazně mění v závislosti na lokalizaci cévy v organizmu. Tunica intima je dobře vyvinuta. Tvoří ji endotelová a subendotelová vrstva, která je tlustší než u malých vén. Tunica media je tenká, obsahuje jen několik vrstviček hladkých svalových buněk. Svalovina bývá někdy značně redukována, zde se nachází více elementů tkáně vazivové. Tunica adventitia představuje nejtlustší vrstvu stěny velkých vén. Ve velkých vénách, které leží pod úrovní srdce, obsahuje tunica adventitia svazky longitudinálně uspořádaných hladkých svalových buněk. Tyto struktury zpevňují stěnu vén a zabraňují její distenzi. Před vyústěním do srdce mohou být patrné v adventicii horní a dolní duté žíly a plicních vénách malá množství příčně pruhované svaloviny srdeční.

V malých a středně velkých vénách jsou vyvinuty chlopně. Chlopně jsou párové kapsovitě výchlípky tunica intima tvořené elastickou vazivovou tkání lemovanou po obou stranách endotelem. Chlopně jsou četné zejména ve vénách dolních končetin. Usměrnují tok krve směrem k srdci (Klika 1986).

2.3. Fyziologické funkce jednotlivých součástí intimy

Vnitřní výstelku cévní stěny tvoří jediná vrstva endoteliálních buněk. Část cévní stěny, obsahující endoteliální buňky a subendoteliální prostor mezi endotelem a medií, se souhrnně nazývá intima (obr. 1.). Povrch endoteliálních buněk (směrem do cévního lumen) je pokryt vrstvou polysacharidů, glykosaminglykanů a glykoproteinů. Endoteliální buňky obsahují i kontraktilní elementy (aktin, myozin, tropomyozin a α -actinin), uspořádané do několika struktur, které se podílejí také na remodelaci endotelu, imobilizaci bílkovin v buněčné membráně a na regulaci propustnosti endotelu pro organické molekuly a buňky. Pod endoteliálními buňkami obsahuje intima pojivovou tkáň, trochu elastických vláken, malé množství myointimálních buněk (podobné buňkám hladké svaloviny) a ojedinělé makrofágy. Hladké svalové buňky jsou dvojího fenotypu: kontraktilního a syntetického. Až 60 % objemu intimy tvoří extracelulární matrix, syntetizovaná a secernovaná jak endoteliálními buňkami, tak i buňkami hladké svaloviny a makrofágy. Obsahuje proteoglykany (chondroitin sulfát, dermatan sulfát, heparin sulfát), které jsou v kontaktu s dalšími bílkoviny matrix, jako jsou kolagen, elastin, fibronectin a laminin. Obsah proteoglykanů se zvyšuje s věkem a stoupá také v průběhu rozvoje aterosklerózy. Kolagen je v intimě syntetizován intimálními buňkami (typ III kolagenu) a buňkami hladké svaloviny (typ I kolagenu - zvyšuje se s věkem). Elastická vlákna jsou tvořena elastinem, syntetizovaným buňkami hladké svaloviny i buňkami endoteliálními. Níže ležící media obsahuje elastickou tkáň a buňky hladké svaloviny. V arteriích muskulárního typu (např. koronární arterie) je intima od medie oddělena tenkou vnitřní elastickou membránou. V arteriích elastického typu (např. aorta) je pod intimou vrstva tunica media, obsahující elastickou tkáň a hladké svalové buňky.



Obr. 1. Struktura intimy

Endoteliální buňky. Základní funkce endoteliálních buněk je regulace permeability, udržení nesmáčivého a antitrombogenního povrchu, včetně kontroly hemostázy, syntéza extracelulární matrix intimy, regulace cévního tonu a regulace remodelačních a reparačních procesů. Endoteliální buňky jsou metabolicky aktivní, produkují celou řadu působků (tab. 1.) (Albrecht, et al. 2003).

Tab. 1. **Významné faktory tvořené v endoteliálních buňkách**

vazodilatační	vazokonstrikční
oxid dusnatý (EDRF)	endotelin
prostacyklin	tromboxan A ₂
EDHP	prostaglandin H ₂
typ C natriuretického peptidu	
antitrombotické	protrombotické
TPA	PAI-1
inhibitory růstu	prorůstové
oxid dusnatý	endotelin
prostacyklin	angiotensin II
typ C natriuretického peptidu	superoxidový radikál
protizánětlivé	prozánětlivé
oxid dusnatý	TNF-a
	superoxidový radikál

Regulace permeability. Přes zdravý endotel přechází nejen voda, ionty a živiny, ale i makromolekuly - bílkoviny krevní plazmy a lipoproteiny a také některé buňky. Transportovány jsou řadou mechanismů: transcytóza, pomocí vezikul, paracelulárních kanálků, intercelulární spojů atd. Rychlost transportu je závislá na plazmatické koncentraci, velikosti a náboji molekul, ale také na krevním tlaku, věku a dalších faktorech. Endoteliální buňky mají na svém povrchu také receptory pro LDL cholesterol, histamin a inzulin a nespecifická vazebná místa pro některé hormony a léky (Luksha, et al. 2008).

Antitrombogenní a antiadherentní povrch. Membrána endoteliálních buněk obsahuje trombomodulin, který váže trombin a mění ho na aktivátor proteinu C (aktivovaný protein C inaktivuje faktory Va a VIIIa a působí tak proti tvorbě trombu). Endoteliální buňky syntetizují glykosaminoglykany (které inaktivují faktor X a trombin) a aktivátor plazminogenu. Na funkční endotel neadherují trombocyty ani leukocyty, dokonale nesmáčivý povrch zajišťuje kromě negativního elektrostatického náboje i sekrece oxidu dusnatého a prostacyklinu (inhibuje agregaci trombocytů).

Udržování cévního tonu. Optimální cévní tonus je udržován syntézou vazodilatačních a vazokonstrikčních působků. Vazodilatačně působí oxid dusnatý (NO), prostacyklin, endotelin-derived hyperpolarising faktor (EDHF) a typ C natriuretického peptidu. NO působí vazodilataci aktivací guanylátcyklázy svalových buněk. Vazokonstrikční látkou syntetizovanou v endotelu je především endotelin (aktivace kalciových kanálů buněk hladké svaloviny a stimulace jejich kontraktálních myofibril), dále tromboxan A₂ a prostaglandin H₂ (Napoli, et al. 2006).

Syntéza a sekrece cytokinů a růstových faktorů. V průběhu prvního stadia rozvoje aterosklerózy při endoteliální dysfunkci syntetizují endoteliální buňky dále řadu působků, které modifikují další progresi aterosklerotické léze: cytokiny, chemotaktické a růstové faktory pro monocyty, CSF pro makrofágy a další (Mysliwiec, et al. 2004).

Buňky hladké svaloviny. Funkce hladkých svalových buněk ve zdravé intimě není zcela jasná. Vznikají jak z endoteliálních buněk, tak ze svalových buněk medie. Jsou jim přisuzovány následující funkce:

- syntéza extracelulární matrix intimy; může se uplatňovat v rozvoji aterosklerózy a také restenózy po angioplastice,
- schopnost proliferace; na svém povrchu exprimují receptory růstových faktorů, které stimulují proliferaci; k tomu může dojít jak v průběhu aterosklerózy, např. při chirurgickém zákroku na cévě,
- vychytávání lipoproteinů; na svém povrchu mají LDL receptory, kterými získávají pro svoji potřebu cholesterol; během aterogeneze mohou být tyto jejich funkce vystupňovány a akumulací lipidů se mohou přeměnit na pěnové buňky.

Makrofágy. Zdravá intima obsahuje jen velmi málo makrofágů, jejich počet ale vzrůstá při jejím zesílení a během aterogeneze. Hlavní funkce makrofágů v intimě jsou:

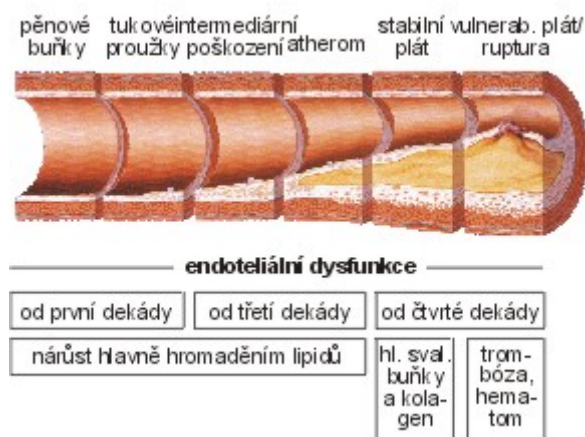
- remodelace intimy: tu ovlivňuje syntéza proteináz (metaloproteináz, kolagenáz, elastáz), které modifikují strukturu extracelulární matrix, a syntéza růstových faktorů pro endoteliální a hladké svalové buňky,
- reakce na zánět, včetně scavengerové funkce: fagocytóza a odstraňování odumřelých buněk, imunitních komplexů, plazmatických bílkovin a lipoproteinů, sekrece cytokinů pro lymfocyty v místě poškození endotelu,
- imunitní odpověď: vazba a prezentace antigenů, produkce cytokinů a růstových faktorů jako součást odpovědi na zánět (Davignon and Ganz 2004).

Extracelulární matrix. Extracelulární matrix je především strukturální složkou intimy. Její další funkce jsou:

- zajištění fyziologické permeability cévní stěny, včetně transferu esenciálních nutrientů. Intima obsahuje prakticky všechny bílkoviny krevní plazmy včetně LDL, obsah bílkovin závisí především na jejich krevní koncentraci a na velikosti jejich molekuly, nativní LDL mají afinitu k chondroitin sulfátu proteoglykanů, jejich koncentrace v intimě se ale zvyšuje především v závislosti na jejich koncentraci v krvi,

- regulace buněčné proliferace, heparin sulfát může regulovat (inhibovat) buněčnou proliferaci vazbou některých růstových faktorů (Nishikawa, et al. 2001).

Chování intimy za patologických podmínek (Brasen and Niendorf 1997).



Obr. 2. Vývoj aterosklerózy (Stary, 1995; materiál "IMPPACT", BMS ČR)

Typ I - izolované pěnové buňky

V intimě jsou přítomny skupiny makrofágů, obsahujících v cytoplasmě kapénky lipidů. Lze je nalézt v intimě koronárních arterií již v dětském věku.

Typ II - tukové proužky (fatty streaks)

Jde o vrstvu makrofágů změněných v pěnové buňky. Také intimální hladké svalové buňky obsahují kapénky lipidů. Mohou být přítomny i ojedinělé T-lymfocyty (CD4, CD8). Lipidy jsou především intracelulárně (hlavně v makrofázích), ale ojediněle jsou přítomny i extracelulární lipidové kapénky. Nejčastěji jde o estery cholesterolu s kyselinou olejovou a linolenovou. Tukové proužky jsou dvojího typu: IIa, které většinou progredují, a IIb, které neprogredují, progredují velmi pomalu nebo pouze u osob se zvýšenou koncentrací lipoproteinů v krvi. Typ IIa obsahuje více hladkých svalových buněk, extracelulární matrix, makrofágů a pěnových buněk s akumulací lipoproteinů. Tukové kapénky jsou lokalizovány hlouběji v intimě. 99 % dětí ve věku 2 až 15 let má v ascendentní aortě tukové proužky, v období puberty jsou již přítomny i v koronárních arteriích. 65 % dětí ve věku 12-14 let mělo léze typu I nebo II v levé koronární arterii. V abdominální aortě těchto lézí přibývá po 30. roce věku.

Typ III

Na rozdíl od typu II je přítomen separovaný pool extracelulárně uložených lipidů pod proužky makrofágů a pěnových buněk, který rozštěpuje strukturu hladkých svalových buněk v intimě. Tyto lipidy obsahují více volného cholesterolu, mastných kyselin, sfingomyelinu, lysofosfatidylcholinu a triacylglycerolů než typ II.

Typ IV - aterom

Jde o dále vyvinuté stadium III s hustým nahromaděním extracelulárních lipidů, nazývaným lipidové jádro, vzniklé pravděpodobně rozpadem pěnových buněk. Obsahuje krystaly cholesterolu a depozity kalcia. Mezi endotelem a lipidovým jádrem jsou v intimě makrofágy a hladké svalové buňky s kapénkami tuků. Makrofágy jsou spíše v centru, zatímco hladké svalové buňky a lymfocyty spíše na okraji léze. Tento typ léze je často přítomen ve věku kolem 30 let. Ve středně velkých arteriích neovlivňuje významně průtok krve a je proto klinicky němý. V případě fisury a trombózy se ale může projevit klinickými symptomy.

Typ V

Tyto léze obsahují vystupující pojivovou tkáň. Obsahují zvýšený obsah kolagenu a hladkých svalových buněk bohatých na endoplazmatické retikulum. Na okrajích lipidového jádra a někdy i v nové pojivové tkáni jsou kapiláry. Léze typu V může být rozdělena na další podtypy:

- Va - odpovídá předchozímu popisu, obsahuje někdy i několik lipidových jader, oddělených fibrózní pojivovou tkání,
- Vb - obsahuje kalcifikace v lipidovém jádře nebo v jiné části léze,
- Vc - chybí lipidové jádro, je jen minimální depo lipidů.

Typ VI

Jde o lézi typu IV nebo V, která je modifikována disrupcí povrchu (VIa), hematomem nebo hemoragií (VIb), nebo trombózou (VIc) a která může vést k cévní okluzi. Trombóza, nasedající na aterosklerotickou lézi je v naprosté většině případů příčinou akutní koronární symptomatologie: infarktu myokardu, nestabilní anginy

pectoris nebo náhlé smrti. Dojde-li k ruptuře aterosklerotické léze, jsou krevními složkám vystaveny subendoteliální struktury a je tak aktivována koagulační kaskáda a agregace trombocytů s tvorbou trombu. Některé tromby neokludují arterii a jsou inkorporovány do aterosklerotické léze. Pokud ale trombus narůstá a uzavírá průsvit arterie, rozvíjí se ischemie.

Aterosklerotické aneuryzma

Jde o vývojové stadium léze typu VI s erozí intimy a s alterací extracelulární intimální matrix a medie.

2.4. Endoteliální dysfunkce

Teorie endoteliálního poškození

Tato teorie předpokládá, že za tímto poškozením stojí komplex po sobě jdoucích událostí. Prvotní příčinou dysfunkce endotelu je poškození cévního endotelu v nejvíce namáhaných místech, kde příčina nebyla odstraněna a proces nebyl neutralizován. To způsobuje nejprve dysfunkci cévního endotelu s tvorbou cytokinů, adhezních molekul, růstových faktorů atd. Na takto poškozený endotel adherují trombocyty, které uvolňují řadu faktorů (především PDGF) a které stimulují proliferaci hladkých svalových buněk a syntézu extracelulární matrix. Chemotaktické faktory atrahují monocyty, které se transformují v makrofágy, a samy makrofágy i hladké svalové buňky syntetizují PDGF. Ukládání lipidů do aterosklerotického ložiska je podle této teorie sekundární záležitostí (ten Dijke, et al. 2008).

Sjednocená teorie aterosklerózy

Sjednocená teorie aterosklerózy neboli teorie endoteliální dysfunkce, vychází z předpokladu, že základním krokem v rozvoji aterosklerózy je diskretní poškození endotelu, tedy endoteliální dysfunkce. Jde většinou o lokalizované postižení endotelu, kdy není porušena jeho integrita, ale jsou alterovány jeho funkce a endoteliální buňky mají zvýšený obrát a zvýšenou propustnost pro některé molekuly (Obr. 3.).

Příčiny endotelové dysfunkce (Obr. 4.), které vedou k ateroskleróze, zahrnují hemodynamickou zátěž, zvýšený arteriální tlak, diabetes mellitus, genové alterace kódující progresi zánětlivé a reparační odpovědi, zvýšenou hladinu homocysteinu a také přítomnost infekčních agens (př. Herpetické viry, cytomegalovirus, virus Epsteinova a Barrova, Hemophilus influenzae, Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori). Dále se uplatňují např. vlivy imunitních komplexů, toxinů a léčiv (cytostatika), méně často jde o mechanické poškození endotelu. Velmi významným faktorem, který sám o sobě vyvolává endoteliální dysfunkci, je přímé působení lipoproteinů (především LDL) na endotel při jejich zvýšené koncentraci v krvi. Vysoká koncentrace LDL tak sama o sobě může nastartovat proces endoteliální dysfunkce a aterosklerózy. Typickým příkladem je onemocnění nazývané familiární hypercholesterolemie, kdy bez dalších rizikových faktorů probíhá akcelerovaná ateroskleróza a ICHS (Luksha, et al. 2008).

Dysfunkce endotelu, způsobená těmito vlivy, vede ke kompenzační odpovědi, která mění normální homeostatické vlastnosti cévního endotelu. Zvyšuje se adhezivita endotelových buněk vzhledem k leukocytům nebo krevním destičkám, roste permeabilita cévní stěny. Endotelie získávají prokoagulační vlastnosti na místo antikoagulačních, zvyšuje se produkce vazoaktivních molekul, cytokinů, chemokinů a růstových faktorů (Obr. 5.).

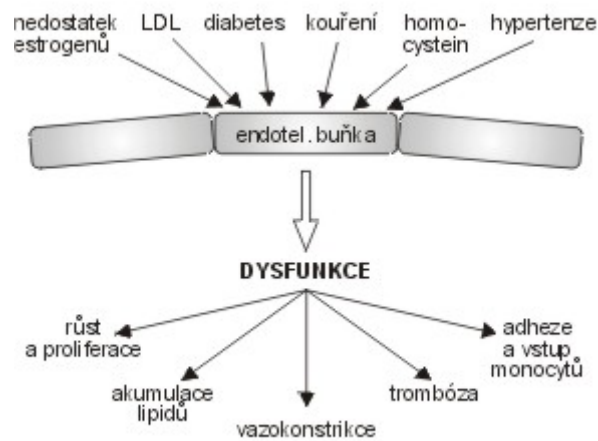
Když tato zánětlivá odpověď nedokáže vyvolávající příčiny odstranit a když není účinně neutralizována, nebo potlačena obrannými mechanismy, postupuje ve svých účincích dále. Migrace a proliferace buněk hladké svaloviny pokračuje a následkem toho myocyty pronikají do oblastí zánětu, dochází k jejich aktivaci, tvorbě extracelulární matrix. Rovněž dochází k nakušení makrofágů a T-lymfocytů v subendotelovém prostoru ve stěně cévy, která se takto ztlušťuje. Toto ztluštění je nejprve kompenzováno dilatací a lumen cévy zůstává zpočátku nezměněno (fenomén remodelace). Pokračující zánět zvyšuje počet makrofágů a lymfocytů, které se sem dostávají z krevního oběhu nebo vznikají na místě léze proliferací. Makrofágy fagocytují oxidované LDL-částice, které pronikly do intimy. Z nich vznikají pěnové buňky. Aktivace makrofágů a T-lymfocytů vede k dalšímu uvolňování cytokinů, chemokinů hydrolytických enzymů a růstových faktorů, které navozují další poškození, eventuálně způsobují ložiskovou nekrózu. A tak postupující akumulace vede k dalšímu rozšiřování a restrukturalizaci léze, která se pokrývá vazivovou čepičkou, zakrývající lipidové jádro s nekrotickými hmotami. To je již stádium pokročilé komplikující léze arteriální stěny (Shantaram 1999).

Od určité doby artérie nemůže kompenzovat lézi pronikající do lumen cévy dilatací. Lumen se zmenšuje, což vede ke snížení průtoku cirkulující krve (Mysliwiec, et al. 2004).

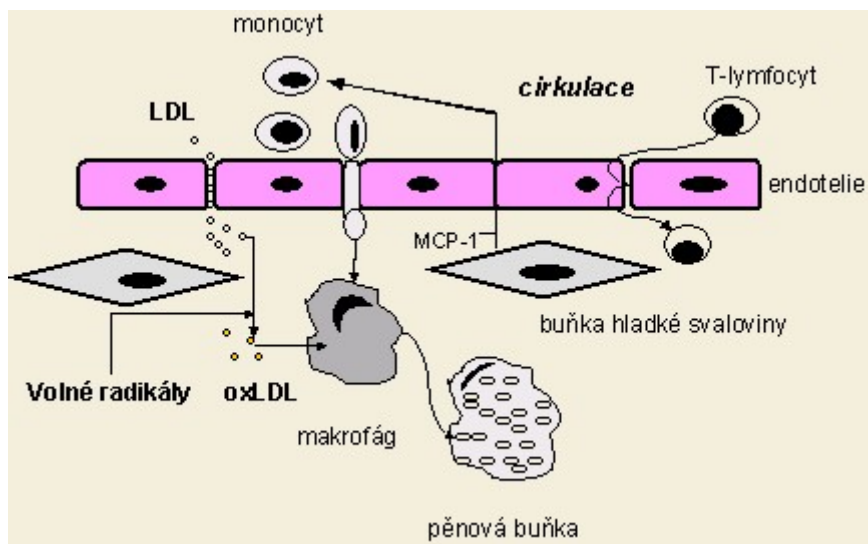
Na zhrubělém povrchu ateromového plátu adherují trombocyty, Jejich aktivací se uvolňují granula obsahující cytokiny a růstové faktory, které spolu s trombinem přispívají k další migraci a proliferaci buněk hladké svaloviny a monocytů. Aktivací destiček také vzniká arachidonová kyselina, která se přeměňuje na prostaglandiny (působením cyklooxygenasy) jako je tromboxan A₂, který je velice potentním vazokonstriktorem a látkou agregující trombocyty. Působením lipooxygenasy z arachidonové kyseliny také vznikají leukotrieny amplifikující zánětlivou reakci.

Pokud fibrózní čepička pokrývající ateromový plát zůstává dostatečně tlustá, nehrozí takové nebezpečí z obturace lumen artérií. Jakmile však dojde k jejímu

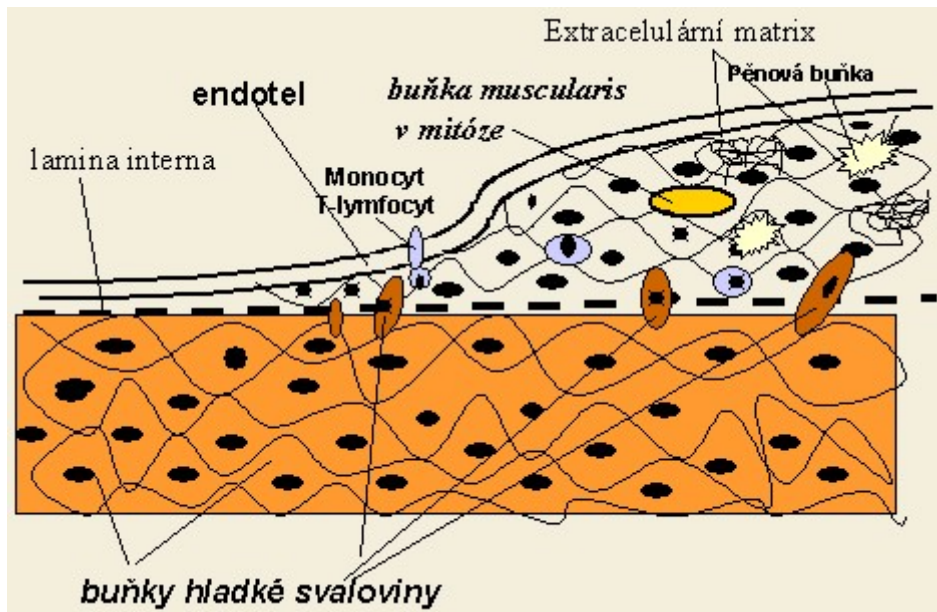
ztenčování působením metaloproteinás (kolagenas, elastas, stromelysinu) uvolňovaných z makrofágů po aktivaci T-lymfocyty, vzniká tak stádium nestabilního plátu, kdy hrozí ruptura plátu, průnik krve do jeho nitra a vznik obturujícího trombu. Uzávěr lumen vede k akutní hypoxii, se všemi jejími důsledky pro zásobenou tkáň (Mangge, et al. 2004).



Obr. 3. Endoteliální dysfunkce: hlavní příčiny a důsledky



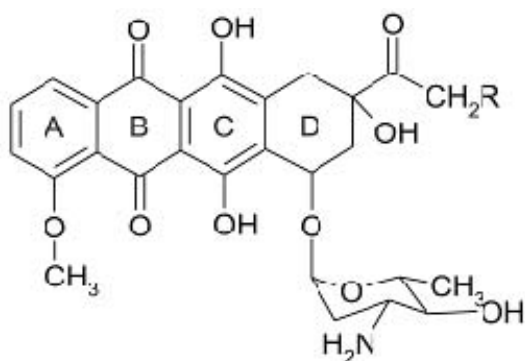
Obr. 4. Schéma počáteční fáze dysfunkce endotelu



Obr. 5. Schéma ztlušťování stěny artérie v průběhu aterosklerózy

2.5. Antracyklinové antineoplastické látky

Antracyklinová antibiotika patří mezi nejúčinnější a často používaná cytostatika. v léčbě hematologických malignit i řady solidních nádorů. Již na začátku 60-tých let byl z hub *Streptomyces peuceitilus* a *Streptomyces ceruleorubidus* izolován **daunorubicin** (též zvaný daunomycin, rubidomycin) a vzápětí i dosud nejvýznamnější antracyklinový derivát – **doxorubicin** (adriamycin). Jedná se o látky, které se skládají z tetracyklického aglykonu a glykosidicky vázaného aminocukru daunosaminu. Oba deriváty si jsou chemicky velmi podobné (liší se pouze jednou hydroxylovou skupinou na C14, Obr. 6.), nicméně je mezi nimi značný rozdíl v indikační šíři. Chinonová část aglykonu (cyklus B) má zásadní význam pro tvorbu volných kyslíkových radikálů redoxní cyklizací (Ferreira, et al. 2008).



Obr. 6. Chemická struktura antracyklinu (R= OH doxorubicin, R= H daunorubicin).

2.5.1 Mechanismus cytostatického účinku

I když jsou antracyklinová antineoplastika v klinické praxi úspěšně užívána přes 35 let, stále není definitivně jasno v otázce jejich mechanismu účinku. Z dosavadních informací vyplývá, že protinádorové působení těchto léčiv je patrně výsledkem poměrně složitých dějů odehrávajících se v maligně transformované buňce.

Za hlavní cílovou strukturu pro cytostatický účinek antracyklinů se považuje DNA v jádře buňky. Antracykliny mají **schopnost interkalace**, tj. schopnost vmezeřovat se mezi páry bazí DNA. U antracyklinů dochází k vmezeření specificky mezi páry C-G bazí. Tento jev je založen na nekovalentní vazbě (vodíkové můstky, van der Waalsovy síly, elektrostatické a hydrofobní interakce). Vzniklý komplex DNA-antracyklin pak následně brání transkripci a replikaci DNA a RNA. V poslední době je role interkalace v klinickém účinku antracyklinových cytostatik do určité míry zpochybňována. Zdá se totiž, že k tomuto ději dochází významnou měrou až při vysokých - klinicky irelevantních - koncentracích cytostatika (Ruggiero, et al. 2008).

Svou interkalací mezi páry bazí DNA mají též **schopnost blokovat funkci topoizomerázy II**. Topoisomerázy jsou jaderné enzymy, které se podílejí téměř na všech biologických dějích, kde figuruje dvoušroubovice DNA (replikace, transkripce, rekombinace a chromosom utvářející děje). Antracykliny pravděpodobně vytvářejí stabilní ternární komplex topoisomeráza II – DNA a tak inhibují zpětné spojení obou vláken DNA. Důsledkem tohoto jevu dochází ke kumulaci zlomů na dvoušroubovici DNA s následnou indukci programované buněčné smrti – apoptózy (Chen, et al. 2007).

Dále se v přítomnost antracyklinů generují reaktivní sloučeniny kyslíku, které vedou k peroxidaci lipidů, poškozují myokard, a podmiňují tak závažnou kardiotoxicitu. Typické jsou změny subcelulární struktury – tj. pomalá ztráta myofibril a vakuolizace buněk. V tomto ději se významně uplatňují ionty železa dostupné z myoglobinu a hemoglobinu.

2.5.2 Způsob podání a farmakokinetika antracyklinů

Doxorubicin (adriamycin) je antibiotikum produkované *Streptomyces peucetius*.

Jako hydrochlorid se podává přísně i. v. rozpuštěn ve fyziologickém roztoku, a to pomalou injekcí (10 – 20 min), nebo krátkodobou infúzí, event. výjimečně dlouhodobou i. v. infúzí (48 – 96 h). Dávkový režim doxorubicinu závisí na celkovém zdravotním stavu nemocného, obvykle 30 až 60 mg/m² i. v. každý třetí den léčby. Celková kumulativní dávka by neměla být vyšší než 550 mg/m² (prevence kardiotoxicity). Po perorálním podání se vstřebává velmi málo. Liposomální léková forma prodlužuje dobu cirkulace cytostatika v krevním řečišti. Užívá se v léčbě Kaposiho sarkomu v souvislosti s AIDS (Barry, et al. 2007).

Daunorubicin je svou aplikací podobný doxorubicinu. Aplikuje se v denní dávce 45-60 mg/m².

Idaurubicin je antibiotikum u něhož je možná také perorální aplikace. Podává se v monoterapii každé 3 týdny 8 – 15 mg/m².

Po intravenózním podání se antracyklinová antibiotika rychle distribuují do celého těla, zvláště pak do ledvin, sleziny, jater, plic a srdce. Tato léčiva se podstatnou měrou váží na intracelulární komponenty (včetně DNA). Distribuční objem doxorubicinu je vyšší než 25 l/kg. Antracykliny patrně nepronikají skrz hematoencefalickou bariéru, ale prochází placentární bariérou do plodu a také do mateřského mléka.

Biotransformace antracyklinů probíhá především v játrech za účasti cytoplazmatických enzymů aldo-keto reductáz. Vznikají tak alkoholické metabolity (doxorubicinol, daunorubicinol atd.) s mnohem nižší cytostatickou aktivitou, ovšem se značným toxickým potenciálem. Uvedený typ biotransformace se uplatňuje i v jiných tkáních (např. myokard); hydroxylové metabolity se zde mohou aktivně podílet na orgánové toxicitě. Další navržené metabolické cesty zahrnují hydrolýzu glykosidické vazby prostřednictvím NADP-reduktázy a konjugaci s kyselinou glukuronovou a sulfátem (Barry, et al. 2007).

Největší množství vlastního léčiva (40-50 %) je z organismu **vylučováno** játry, a to z poloviny v nezměněné podobě. Pouze menší část podané dávky léčiva je vyloučena z organismu ledvinami. Pokles plazmatických hladin nejužívanějšího

doxorubicinu se odehrává ve 3 fázích s poločasem eliminace $t_{1/2\alpha} = 4,8$ min, $t_{1/2\beta} = 2,6$ h a $t_{1/2\gamma} = 48$ h (Danesi 2002).

2.5.3 Indikace antracyklinů

Antracyklinová antibiotika vykazují významný cytostatický a pouze mírný antimikrobiální účinek. Minimální bakteriostatická koncentrace je většinou nad hranicí únosné toxicity. Protinádorový účinek těchto látek může být využit v kurativní, ale i adjuvantní, neoadjuvantní či paliativní terapii (Klener 1996, Elbl 2002).

Jak již bylo uvedeno, malý rozdíl v chemické struktuře mezi daunorubicinu a doxorubicinem v chemické struktuře se ukázal být zásadní pro jejich klinické uplatnění. Podstata toho jevu ovšem stále nebyla vysvětlena.

Daunorubicin je téměř výhradně užíván v kombinační terapii akutní myeloblastické či lymfoblastické leukémie.

Doxorubicin má spektrum indikací podstatně širší. Užívá se i v léčbě mnohočetného myelomu, Hodgkinových i neHodgkinových lymfomů, jakož i u celé řady solidních tumorů (karcinom prsu, vaječníků, malobuněčný karcinom plic a sarkom měkkých tkání). Doxorubicin se většinou podává v kombinačním chemoterapeutickém režimu (Nagy, et al. 2006).

Idaurubicin je indikován u akutní nelymfocytární leukemie.

Všechny antracykliny je nutné podávat přísně intravenózně, neboť paravenózní aplikace způsobuje obávanou nekrózu a zánět v okolní tkáni (jestliže nejde o perorální podání).

2.5.4 Extrakardiální nežádoucí a toxické účinky antracyklinů

Antracykliny, stejně jako většina ostatních protinádorových léčiv, vykazují pouze relativní selektivitu svého cytostatického účinku. Následkem toho je chemoterapie obsahující tato cytostatika provázena řadou nežádoucích účinků.

Pro antracykliny je charakteristická významná myelosuprese, jež může výrazně ovlivnit dávku podaného léčiva. Úbytek leukocytů je nejmarkantnější 7 až 10den po aplikaci a odeznívá do 19 až 24 dnů. Trombocytopenie a anémie se vyvíjejí obdobně, ale jsou většinou méně výrazné. Bylo pozorováno, že pokles leukocytů po podání doxorubicinu má významný vztah k AUC léčiva a podobně byla nalezena

korelace mezi AUC doxorubicinolu a poklesem neutrofilů a trombocytů (Danesi 2002).

Jako u dalších cytostatik se přechodně vyskytuje nauzea, zvracení. Emetogenní účinek (ve 30 až 40% případů) řadí antracykliny mezi střední až silné emetogeny. Nauzeu a zvracení lze podstatně zmírnit až odstranit antagonisty serotoninových (5-HT₃) receptorů. Vliv na trávicí ústrojí se může projevit anorexií, průjmy, event. tenezmy a záněty střevní sliznice. Stomatitida, ezofagitida, mukositida a alopecie bývají častěji následkem dlouhodobější i. v. infúze. Léze v dutině ústní bývají spojovány s vylučováním doxorubicinu do slin. Alopecie (v 90 – 100% případů) je spojena s významnou ztrátou vlasů počínaje 3. týdnem po první dávce doxorubicinu. V současnosti není k dispozici žádný prostředek, kterým by bylo možno tomuto časnému vlivu zabránit. V místě podání bývá občas pozorováno zarudnutí, které je v podstatě benigní lokální alergickou reakcí a nemělo by být zaměňováno za náhodné paravenózní podání. V některých případech se může objevit tzv. recall fenomén, tj. zvýšené riziko postradiačních lézí (i obnova dříve vyhojených) v exponované oblasti v důsledku předchozí nebo současné radiační terapie. Zřídka se vyskytuje „flash“ v obličeji, horečka, konjunktivitida, kožní a nehtové pigmentace (Jones, et al. 2006).

Mutagenní a karcinogenní potenciál byl prokázán na laboratorních modelech (Goodman 2001). V preklinických experimentech byla u hlodavců a králíků zaznamenána poměrně výrazná nefrotoxicita antracyklinů. Podstata tohoto jevu nebyla dosud vysvětlena. Změny v ledvinách bývají charakterizovány jako degenerace epitelii proximálního a distálního tubulu se známkami nekrózy i apoptózy a s přítomností proteinového materiálu v lumen tubulů. V humánní medicíně ovšem nefrotoxicita nebývá závažnější komplikací chemoterapie obsahující terapie antracykliny (Chen, et al. 2007).

2.5.5 Antracyklinová kardiotoxicita

Krátce po zavedení antracyklinů do klinické praxe se objevily první zmínky o jejich kardiotoxickém působení (Ferreira, et al. 2008). Kardiotoxické působení antracyklinových cytostatik se do určité míry vymyká nežádoucím účinkům běžně sledovaných u jiných cytostatik. Nespecifita cytotoxického působení se nejčastěji projeví na rychle proliferujících tkáních (např. kostní dřeň, sliznice aj). Kardiotoxicitu,

ačkoliv většinou méně závažnou než antracyklinovou, je možno pozorovat i u některých jiných cytostatik (např. mitoxantron, bleomycin, cyklofosfamid, cisplatina, busulfan).

Jelikož jsou antracykliny často podávány v kombinaci s dalšími protinádorovými léčivy, je nutné věnovat potenciálnímu negativnímu vlivu dalších farmak na srdeční funkci značnou pozornost a nepřisuzovat toxicitu pouze na stranu antracyklinů. Kardiotoxicita antracyklinů se ukázala velmi významným omezením v jejich klinického užití, a proto možnost redukce tohoto závažného toxického účinku je intenzivně studována (Horan, et al. 2006).

2.5.6 Typy antracyklinové kardiotoxicity

Vzhledem k nástupu a charakteru klinických projevů lze rozdělit antracyklinovou kardiotoxicitu na akutní, subakutní, chronickou a pozdní, ale je známo, že existují i další názory na způsob rozdělení. V literatuře je též možné pozorovat určitou terminologickou nejednotnost. Někteří autoři hovoří zjednodušeně o dvou hlavních variantách antracyklinové kardiotoxicity (akutní a chronické) a jejich různých formách (např. chronická forma kardiotoxicity s časným a pozdním nástupem srdeční dysfunkce, (Thorburn and Frankel 2006).

Etiopatogeneze kardiotoxicity je patrně multifaktoriální. Ačkoliv je antracyklinová kardiomyopatie předmětem intenzivního odborného zájmu, dosud se nepodařilo dostatečně objasnit mechanismus jejího vzniku. V průběhu let bylo prezentováno několik teorií, které se často nevyklučují a hypoteticky se mohou doplňovat. Dosavadní znalosti naznačují poměrně komplexní povahu problému. Nejčastěji je antracyklinová kardiomyopatie spojována s poškozením myokardu volnými kyslíkovými radikály, avšak diskutovány jsou i další možné mechanismy (Thorburn and Frankel 2006).

Kyslíkové radikály se generují zejména po vytvoření stabilního komplexu mezi antracykliny a ionty železa z myoglobinu a hemoglobinu. Projevují se následovně:

2.5.6.1 Akutní kardiotoxicita

Nebývá častá, je přechodná, event. klinicky zvládnutelná antiarytmiky. Ojedinele byly popsány fatální případy komorových arytmí, nebo vznik náhlého infarktu

myokardu. Objevuje se bezprostředně po první dávce (během 24 h) nebo jako následek první léčebné kúry změnami na EKG v úseku ST-T, prodloužením intervalu QT a arytmiemi. Po skončení arytmiie lze v léčbě pokračovat. Akutní toxicita bývá doprovázena myelosupresí, nauzeou a zvracením. Akutní poruchy rytmu však nejeví závislost na podané dávce, dávkovacím schématu a patrně ani nemají vztah k rozvoji antracyklinové kardiomyopatie (Finolezzi, et al. 2003).

2.5.6.2 Subakutní kardiotoxicita.

Vznik subakutní toxicity bývá pozorován v průběhu dnů popř. několika týdnů od začátku podávání antracyklinů. Obecně patří mezi vzácně se vyskytující typ toxicity a častěji je připisován daunorubicinu. V literatuře je nejčastěji popisován vznik toxické perikarditidy, myokarditidy, eventuálně tzv. „myokarditis-perikarditis syndrom“, který může výjimečně končit i smrtí (Allen 1992, Gharib 2002, Elbl 2002).

2.5.6.3 Chronická kardiotoxicita

Chronická kardiotoxicita patří mezi nejobávanější nežádoucí účinky antracyklinových antineoplastik a významně omezuje jejich klinické užití.

Chronická kardiotoxicita je způsobena dlouhodobějším podáváním těchto léčiv a projevuje se kardiomyopatií. Klinicky se manifestuje náhle (během prvního roku léčby, nejčastěji v průběhu 1 –2 měsíců po poslední dávce) a rychle progreduje. Je poměrně rezistentní na léčbu. Může ohrozit život nemocného, její prognóza bývá vážná. K jejím známkám patří tachykardie, tachypnoe, dilatace srdce, plicní a venózní kongesce, pleurální výpotky. Příčinou je poškození a progresivní ztráta myocytů, která je zprvu funkčně kompenzována zbylými monocyty, a proto často uniká pozornosti. S růstem kumulativní dávky se však prohlubuje pokles srážlivosti myokardu a klesá ejekční frakce. Následkem může být akutní srdeční dekompenzace (Finolezzi, et al. 2003).

2.5.6.4 Pozdní kardiotoxicita

Pozdní antracyklinová kardiotoxicita se rozvíjí po jednom roce a dále od ukončení chemoterapie a často probíhá dlouhou dobu skrytě. K manifestaci pozdní antracyklinové kardiotoxicity dochází obvykle za 2-20 let, tedy mnohdy až v produktivním věku pacientů, kteří v dětství prodělali protinádorovou léčbu, ale tento typ kardiotoxicity byl popsán i u dětí. Projevuje se poruchami vodivosti a

tachyarytmiemi. Poškození myocytů a dysfunkce komor mívá za následek pozdní dekompenzaci srdce (Barry, et al. 2007).

Model chronické antracyklinové kardiotoxicity u králíka: antracyklinová kardiotoxicita byla navozena opakovaným podáváním daunorubicinu (Daunoblastina, 3 mg/kg, 1 x týdně po 10 týdnů). Echokardiografické měření systolické srdeční funkce bylo prováděno na začátku pokusu, ve vybraných intervalech v průběhu pokusu (9., 10. týden, vždy před další aplikací studovaných látek) a na konci experimentu (5-7 dní po poslední aplikaci). Invazivní vyšetření srdeční funkce bylo prováděno na konci pokusu. Odběry vzorku krve pro biochemickou a hematologickou analýzu byly prováděny na začátku, v polovině (5. týden) a na konci experimentu. Odběry krve pro stanovení troponinu T byly prováděny na začátku pokusu, v 5., 8., 10. týdnu a na konci pokusu, není-li dále uvedeno jinak (Sterba, et al. 2007).

2.6 Adhezní molekuly

- **Imunoglobulinová skupina**

Imunoglobuliny jsou velice početná skupina látek bílkovinné povahy obsahující molekuly s Ig-doménami. Někteří členové této skupiny mají vztah k ateroskleróze. Patří k nim VCAM-1, ICAM-1 a PECAM-1 (Kriegelstein and Granger 2001).

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1), PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1). Exprese VCAM-1 je nízká až zanedbatelná u nestimulovaných endoteliálních buněk, ale jeho tvorba vzrůstá po cytokinové stimulaci. Tato adhezivní molekula je zodpovědná za adhezi lymfocytů a monocytů v zánětlivém cévním ložisku (Galkina and Ley 2007).

Exprese adhezních molekul v aterosklerotické lézi

Srovnávání exprese VCAM-1, ICAM-1 a E-selektinu v aortách hypercholesterolemických králíků, LDLR^{-/-} a ApoE^{-/-} myší v laboratorních podmínkách se provádí Northern blot analýzou. Provedená analýza prokazuje vzrůst exprese VCAM-1, ICAM-1 u zkoumaných zvířecích druhů, ale neprokuje zvýšenou expresi E-selektinu. Ustálená hladina mRNA v aortách hypercholesterolemických myší a králíků odpovídala objemu aterosklerotických lézí, vše bylo potvrzeno barvením olejovou červení.

V malých lézích VCAM-1, ICAM-1 jsou přednostně vyjádřeny buňkami endoteliálními, kdežto ve větších lézích již bohatých na pěnové buňky je exprese patrná i v buňkách intimy. VCAM-1 je rovněž vyjádřen hladkosvalovými buňkami, které přiléhají bezprostředně k lézi. Tato fenotypická změna se může objevit v aktivovaných hladkosvalových buňkách, nebo v buňkách, které migrují do intimy.

Vyslovení zákonitostí exprese VCAM-1 a ICAM-1 endoteliálními buňkami je lehce reprodukovatelné a podobné jak u myší, tak i u králíků, kteří jsou krmeni potravou s vysokým obsahem cholesterolu. Exprese VCAM-1 i ICAM-1 endoteliálními buňkami je jasně prokazatelná na okraji jak malých, tak i velkých lézí. Zřídka je možno ji pozorovat za okrajem léze (Cybulsky, et al. 2004).

Expresí VCAM-1 je zpravidla omezena pouze do míst s výskytem lézí. Kdežto expresí ICAM-1 je možno pozorovat i v místech nepoškozené aorty. Tyto pozorování velmi jasně ukazují, že při expresi adhezních molekul v aterosklerotických lézích myši, nebo i králíků se uplatňují podobné kontrolní mechanismy. Nicméně expresí VCAM-1 je kontrolována mnohem přísnějšími mechanismy (Kriegelstein and Granger 2001).

Expresí VCAM-1, ICAM-1 a E-selektinu byla rovněž zkoumána i na několika lidských vzorcích postupujících aterosklerotických lézích, které byly opatřeny při pitvách, či při transplantacích. Ve všech případech expresí ICAM-1 byla objevena v endoteliálních buňkách nad plaky a v přilehlých hladkosvalových buňkách a makrofázích. Expresí byla doložena imunohistochemickým barvením. Pokročilé lidské koronární aterosklerotické plaky ukázaly ohniskové expresí VCAM-1. Velmi jasná expresí této molekuly byla v endoteliálních buňkách, obvykle v souvislosti se zánětlivou infiltrací těchto ložisek. Expresí byla pozorována v nepoškozených krevních cestách se ztlustělou intimou. Kromě expresí v aterosklerotických placích byla též patrná v hladkosvalových buňkách, makrofázích a v endoteliálních buňkách na spodině lézí (Cybulsky, et al. 2001).

Dalšími laboratorními experimenty bylo prokázáno, že endoteliální buňky aorty v místech, která jsou více predisponována k tvoření aterosklerotických lézí exprimují VCAM-1 jak u myši, tak i u králíka. ICAM-1 byl také vyjádřen v těchto místech, ačkoliv tato expresí byla posunuta i do míst s relativně nižší možností rozvoje lézí.

U normocholesterolemických zvířat byl prokázán vliv hemodynamických dějů na expresí VCAM-1 a ICAM-1 a to v endoteliálních buňkách v místech predisponovaných k utváření lézí. Je možné, že stres může vyvolat expresí adhezních molekul endoteliem a jiný odlišný stres může vyprovokovat jedinečný repertoár genové expresí. Hemodynamické děje mohou také stát v pozadí prostupu lipoproteinů do endoteliálního prostoru a ulpívání lipoproteinů v intimě. Lipoproteinová oxidace může být rovněž příčinou expresí adhezních molekul (Cybulsky, et al. 1999).

Bez ohledu na mechanismus, kterým dojde k expresí VCAM-1, či ICAM-1 v endotelu aorty u normálních zvířat, může tato expresí zprostředkovat občasnou migraci leukocytů. Dle jiných názorů, je možné pozorovat zvýšenou hustotu makrofágů v intimě v místech, která jsou více náchylná ke vzniku lézí. Tyto

makrofágy mohou v případě hypercholesterolemie a akumulace lipoproteinových částic být aktivovány a mohou začít produkovat prozánětlivé faktory.

VCAM jsou vyjádřeny endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami. Exprese ICAM je pozorovatelná ve stejných oblastech jako VCAM-1, ale je patrná i v místech s nízkým výskytem zánětlivých lézí (Jang, et al. 1994).

3. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo detekovat změny endoteliální exprese VCAM-1 a ICAM-1 ve stěně aortálního oblouku králíků, kterým bylo podáváno antracyklínové cytostatikum daunorubicin. Sledovali jsme případné změny exprese obou adhezních molekul po různých dávkových intervalech podávání daunorubicinu. Pro zobrazení exprese těchto adhezních molekul byly využity imunohistochemické metody.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Zvířata a předepsaná dieta

Pokusná zvířata: králci, Činčila velká, samci

Podmínky: zvířata byla umístěna ve viváriu LF HK UK a krmena standardní laboratorní dietou. Zacházení se zvířaty se řídilo dle "Guide for the care and use of laboratory animals" (1996). Užití laboratorních zvířat pro účely tohoto pokusu bylo schváleno Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Použitá léčiva a chemikálie: pro účely pokusu byly použity tyto látky: *ketamin* (Narketan inj., Vétoquinol, Švýcarsko), *pentobarbital* (Sigma-Aldrich, USA), *daunorubicin* (Daunoblastina, Pharmacia, Itálie).

Schéma pokusu:

Chronická antracyklinová kardiotoxicita byla navozena opakovaným podáním daunorubicinu ($3 \text{ mg/kg} = 50 \text{ mg/m}^2$ i.v., 1x týdně) po dobu 10 týdnů. Vzorky krve pro stanovení standardních biochemických a hematologických parametrů byly odebírány před 1., 5. aplikací a na konci pokusu z centrální ušní artérie. Plazmatické koncentrace srdečního troponinu T, popř. troponinu I byly stanoveny v plazmě získané 1., 5., 8., 10. týden a na konci pokusu. Studie byla ukončena 5. až 7. den po poslední aplikaci, kdy byly invazivně hodnoceny parametry srdeční funkce.

Pro sledování časového sledu biochemických, morfologických, funkčních a jiných změn myokardu levé komory v průběhu rozvoje toxického účinku antracyklinů bylo vytvořeno 10 daunorubicinových skupin (n=6), které reprezentovaly zvířata exponovaná různé kumulativní dávce DAU. Zvířata byla ukončována za 24 hodin nebo za 7 dnů po dané kumulativní dávce cytostatika. Výsledky byly porovnány s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat (n=6), kterým nebyla aplikována žádná látka

a) *kontrolní skupina;*

b) *daunorubicinová skupina* (daunorubicin, 3 mg/kg, i.v., podáván 1x týdně);

- *1-týdenní za 24 hod*
- *1-týdenní za týden*
- *3-týdenní za 24 hod*
- *3-týdenní za týden*
- *5-týdenní za 24 hod*
- *5-týdenní za týden*
- *8-týdenní za 24 hod*
- *8-týdenní za týden*
- *10-týdenní za 24 hod*
- *10-týdenní za týden*

5. IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm dlouhých segmentech aortálního oblouku. Vzorky se ponořily do OCT směsi, následně byly zamrazeny v kapalném dusíku a uloženy v ledničce při -80 stupních Celsia. Na zmrazovacím mikrotomu byly poté nakrájeny série příčných řezů o tloušťce $7\mu\text{m}$ a ty byly přeneseny na sklíčka předem upravené v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout a pak se na 20 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v -20 stupních Celsia. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Poté se řezy vložily do 0,3% roztoku peroxidu vodíku v PBS (15 minut), čímž se zablokovala endogenní peroxidázová aktivita. Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné ještě zablokovat nespecifická vazebná místa, proto se řezy na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). 1 hodinu se pak inkubovaly s primární protilátkou při pokojové teplotě. Po oplachu v PBS se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou- goat anti-mouse IgG (DAKO En Vision+(tm), Carpinteria, USA). K tomu, aby navázané protilátky mohly být zobrazeny, se použil diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Pro kontrolní sklíčka byl zvolen stejný postup, ale místo primární protilátky se použil roztok BSA.

Byly použity následující primární protilátky:

- Mouse anti-human PECAM-1 (ready to use) Dakocytomation, Denmark
- Mouse anti-rabbit VCAM-1 (Rb1/9) (ředění 1/20) (laskavě poskytnuto Dr. M.I.Cybulsky)
- Mouse anti-rabbit ICAM-1 (Rb2/3) (ředění 1/10) (laskavě poskytnuto Dr. M.I.Cybulsky)

6. VÝSLEDKY

Výsledky analýzy činnosti myokardu byly hodnoceny na Farmakologickém ústavu Lékařské fakulty v Hradci Králové, kde byla prokázána indukce závažné kardiomyopatie po podání Daunorubicinu.

My jsme se zaměřili pouze na hodnocení případných změn exprese adhezních molekul ve stěně cévy (aortálního oblouku)

Imunohistochemické barvení v oblasti aortálního oblouku

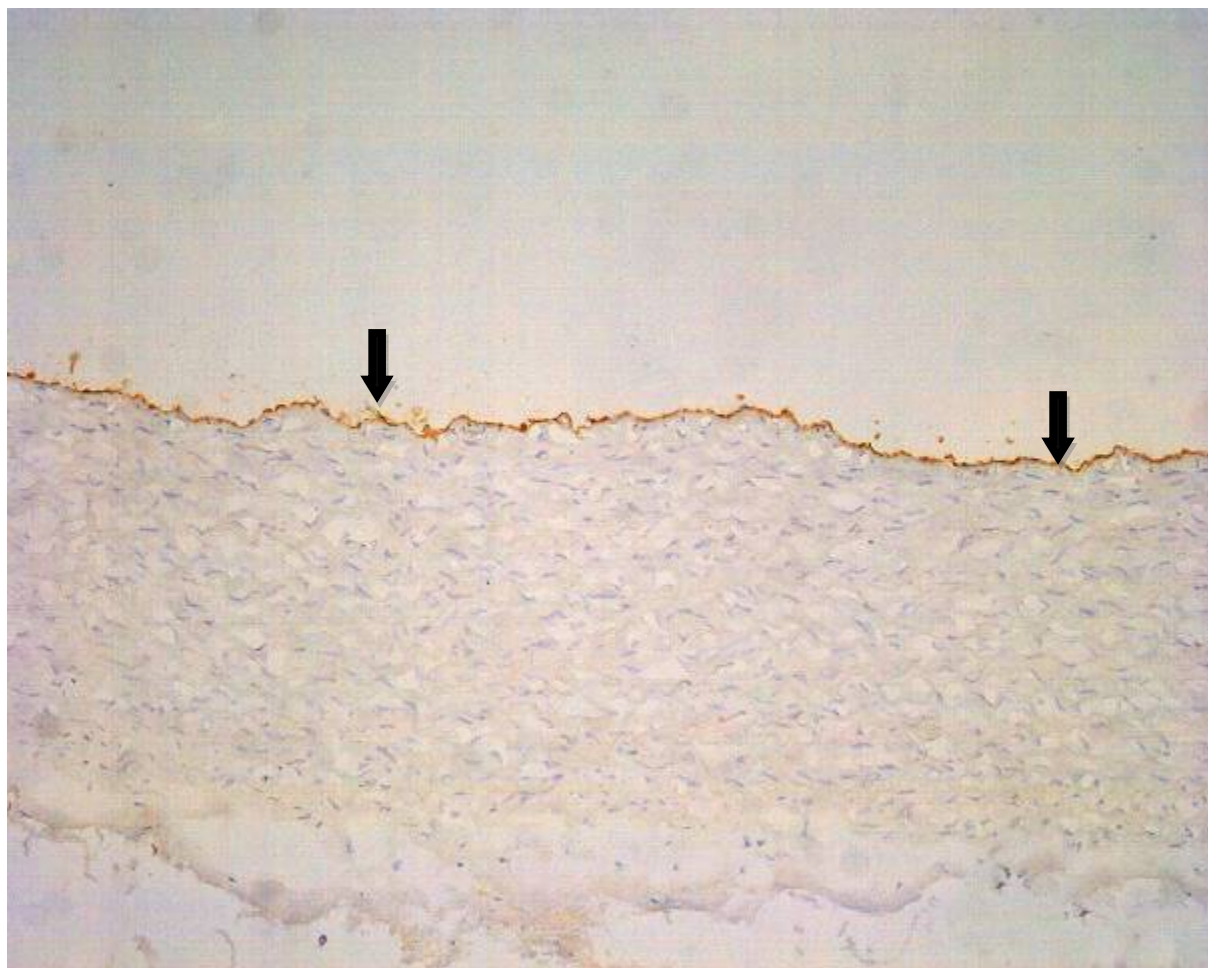
Stěna cévy nevykazovala žádné známky patologie. Imunohistochemická analýza prokázala silnou expresi PECAM-1 téměř po celém lumen cévy bez ohledu na skupinu králíků. Tyto výsledky potvrzují použití PECAM-1 jako markeru cévního endotelu. Detekce ICAM-1 byla velmi variabilně prokázána u různých skupin zvířat včetně té kontrolní, přičemž jeho exprese nebyla ovlivněna ani podáváním daunorubicinu. Nalezené výsledky exprese ICAM-1 jsou vidět v tabule číslo 2.

Naproti tomu exprese VCAM-1 nebyla nalezena u žádného zvířete z kontrolní ani žádné z daunorubicinových skupin.

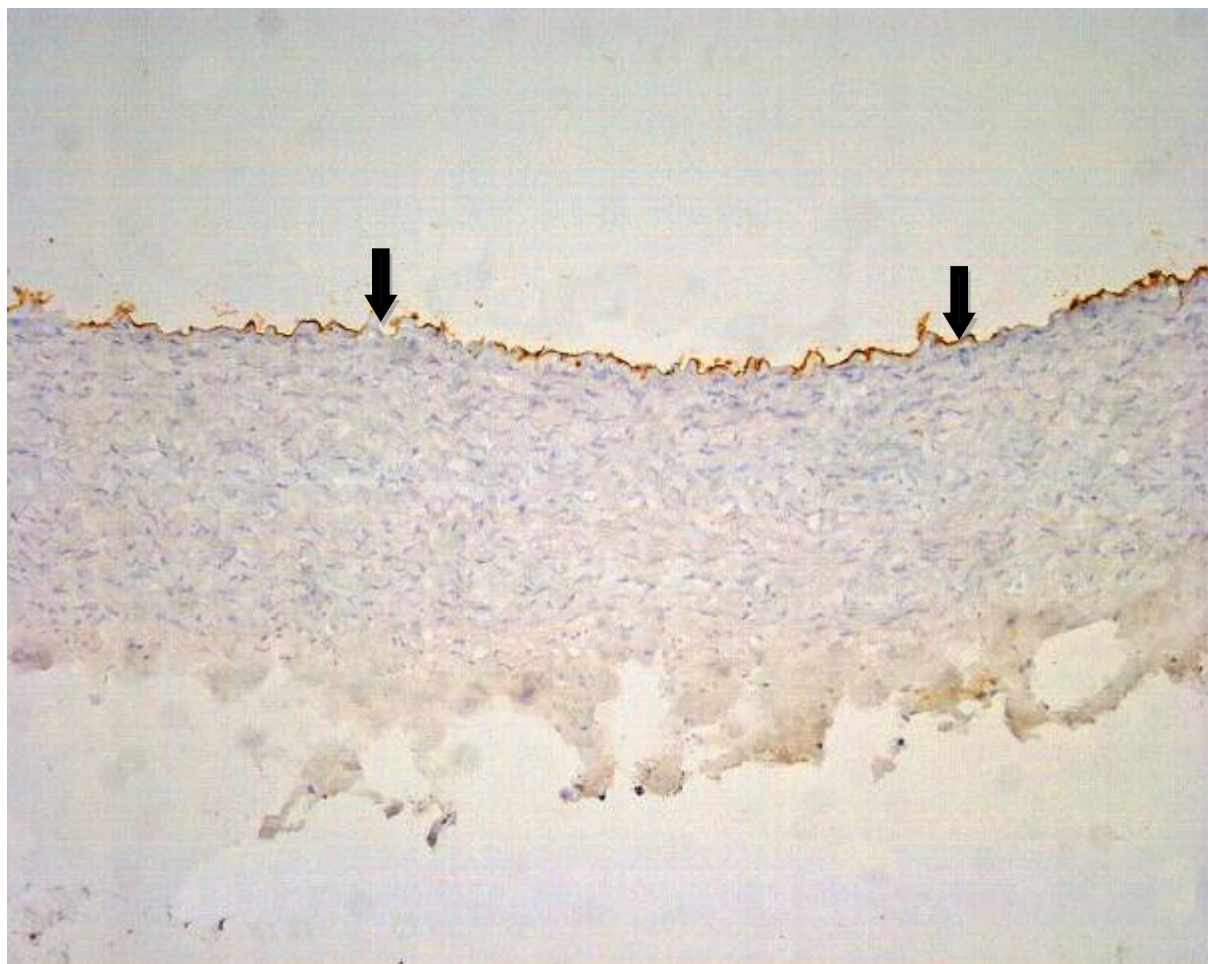
Tabulka č. 2: Expresy ICAM-1 a VCAM-1 u kontrolní a jednotlivých experimentálních skupin. Expresy ICAM-1 se velmi proměnlivě objevila u zvířat z kontrolní i daunorubicinových skupin. Naproti tomu exprese VCAM-1 nebyla nalezena u žádného zvířete. U každého zvířete bylo hodnoceno 5 sklíčků, tudíž čísla v tabulce vyjadřují počet pozitivních sklíčků z 5 pro každé zvíře.

		ICAM	VCAM			ICAM	VCAM
kontrola bez aplikace fyz. r.	11/07	0	0	8 aplikace DAU končení za 24h	51/06	0	0
	12/07	0	0		07/07	0	0
	13/07	1/5	0		09/07	0	0
	80/07	0	0		10/07	0	0
	84/07	0	0		70/07	2/5	0
	85/07	5/5	0		71/07	0	0
1 aplikace DAU končení za 24h	22/07	0	0	8 aplikace DAU končení za týden	52/06	0	0
	24/07	4/5	0		68/06	0	0
	78/07	4/4	0		69/06	0	0
	79/07	2/5	0		04/07	5/5	0
	87/07	4/5	0		54/07	0	0
	91/07	0	0		55/07	2/5	0
1 aplikace DAU končení za týden	16/07	4/5	0	10 aplikace DAU končení za 24h	53/06	3/5	0
	73/07	0	0		71/06	1/3	0
	74/07	0	0		01/07	0	0
	75/07	0	0		03/07	0	0
	93/07	0	0		08/07	0	0
	18/08	0	0		60/07	5/5	0
3 aplikace DAU končení za 24h	90/07	4/4	0				
	95/07	1/5	0				
	96/07	0	0				
	16/08	2/4	0				
	17/08	0	0				
3 aplikace DAU končení za týden	86/07	2/5	0				
	88/07	0	0				
	94/07	5/5	0				
	13/08	4/5	0				
	14/08	0	0				
5 aplikace DAU končení za 24h	15/08	5/5	0				
	84/05	0	0				
	85/05	0	0				
	86/05	0	0				
	56/07	0	0				
5 aplikace DAU končení za týden	77/07	0	0				
	83/07	2/4	0				
	05/06	0	0				
	76/06	5/5	0				
	50/07	4/5	0				
	51/07	0	0				
	52/07	0	0				
	53/07	1/5	0				

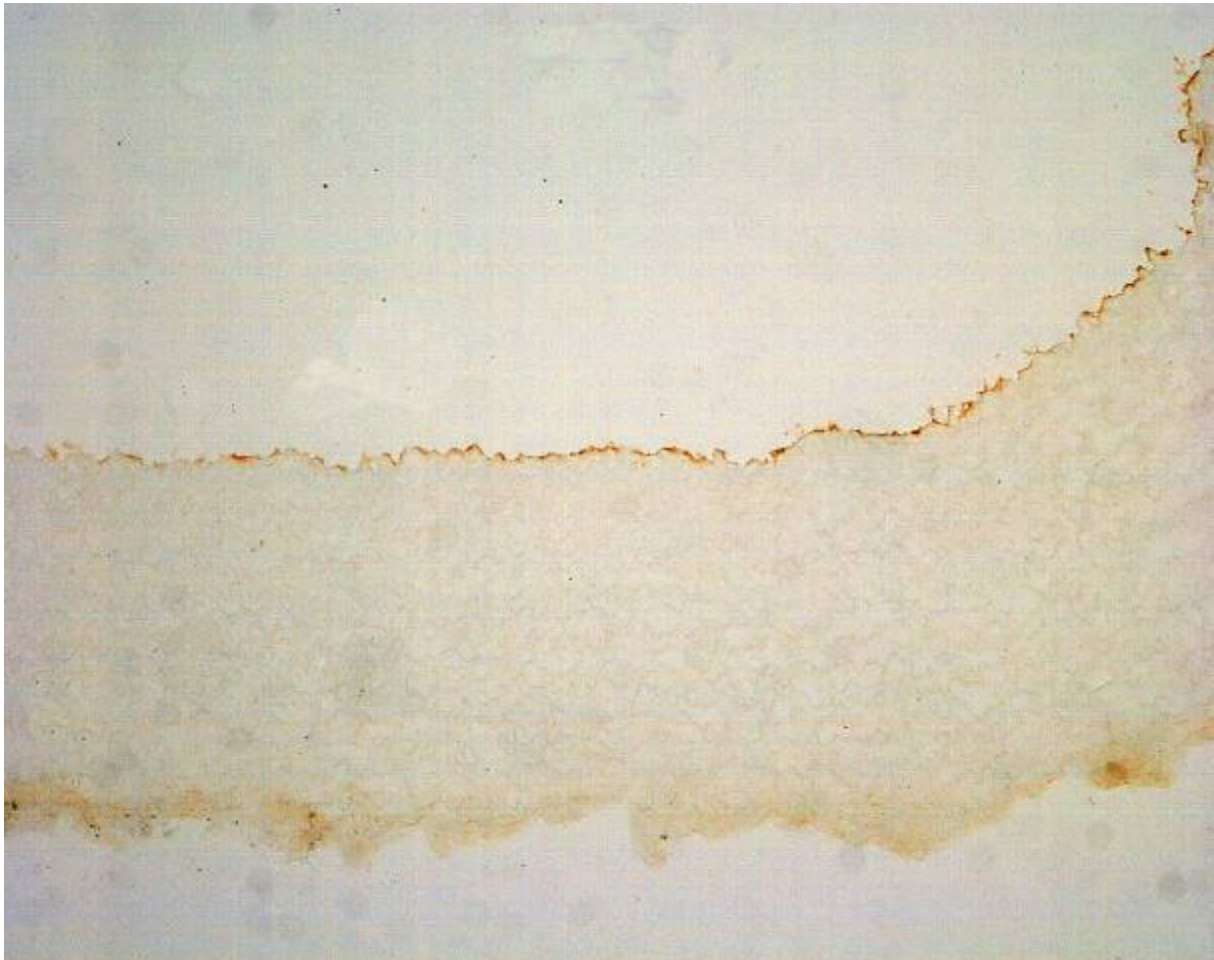
Obrázek 7. - Endoteliální exprese PECAM-1 u kontrolní skupiny zvířat. Exprese byla pozorována u všech zvířat po celém lumen cévy. Šipky ukazují na hnědou barvu, která je důkazem detekce PECAM-1 exprese. Zvětšení 100x.



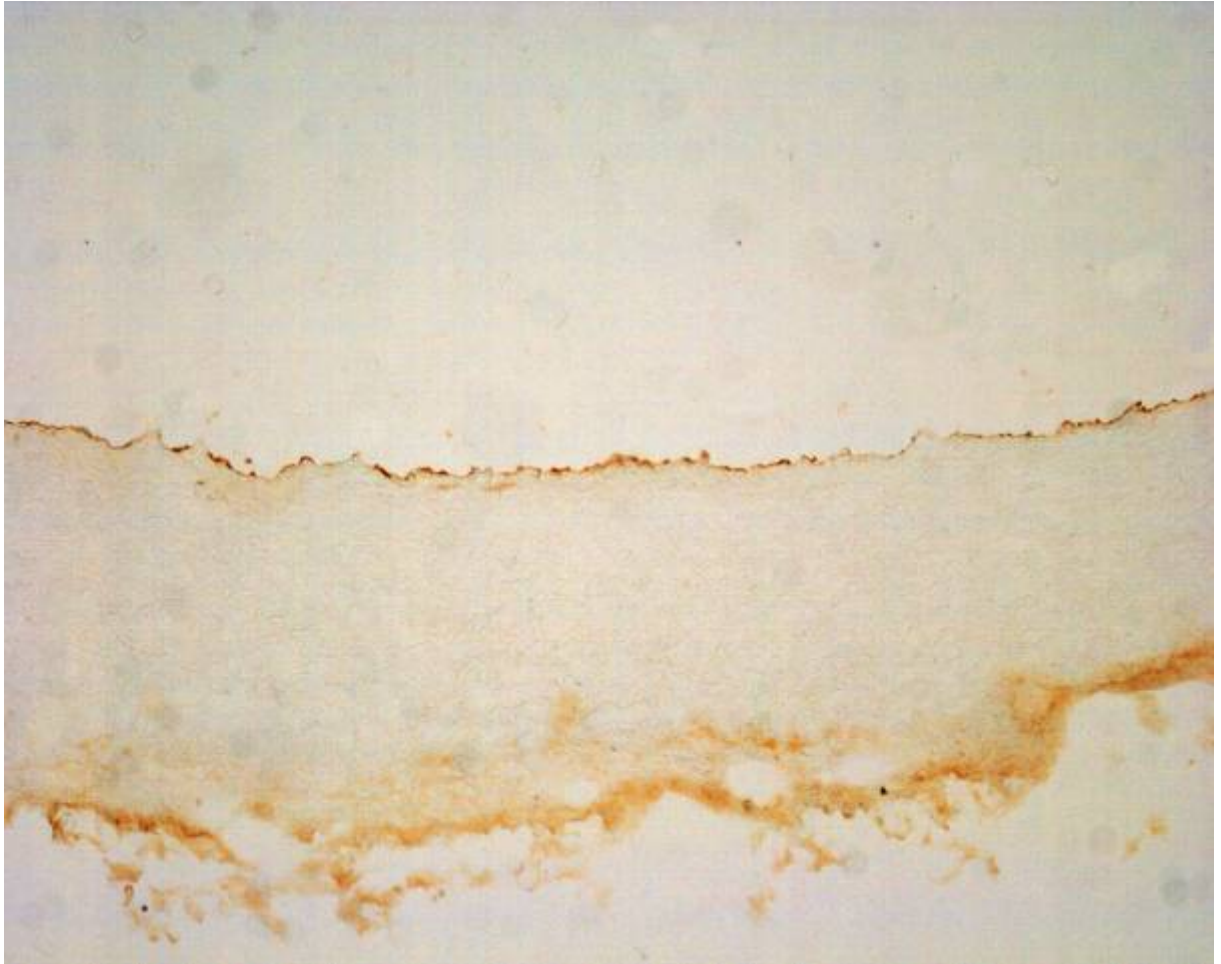
Obrázek 8. Endoteliální exprese PECAM-1 u daunorubicinové skupiny skupiny zvířat. Exprese byla pozorována u všech zvířat ze všech daunorubicinových skupin po celém lumen cévy. Šipky ukazují na hnědou barvu, která je důkazem detekce PECAM-1 exprese. Zvětšení 100x.



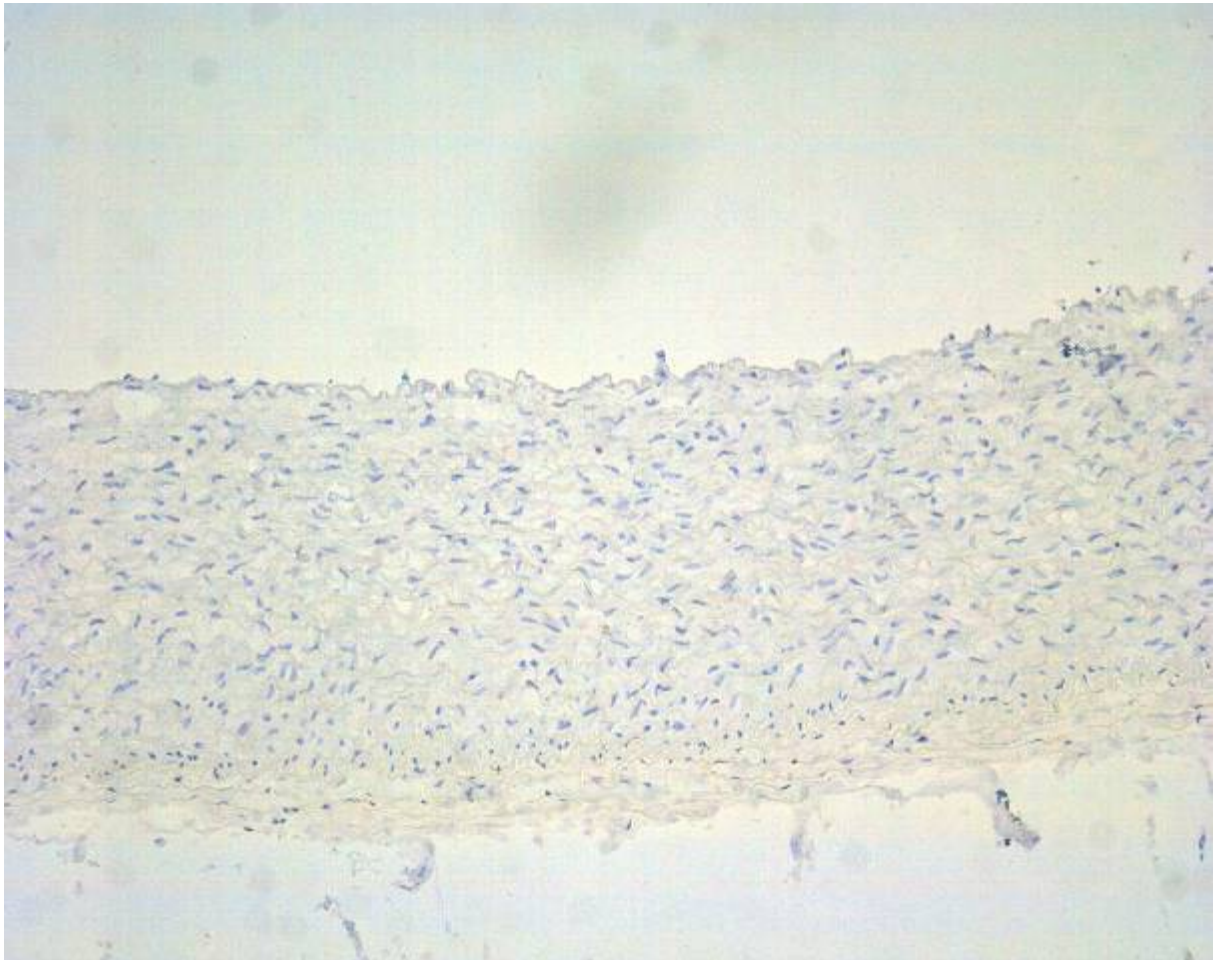
Obrázek 9. - Endoteliální exprese ICAM-1 u kontrolní skupiny zvířat. Exprese ICAM-1 byla velmi variabilní u zvířat kontrolní skupiny. Někde byla velmi silná jinde naopak téměř žádná. Zvětšení 100x.



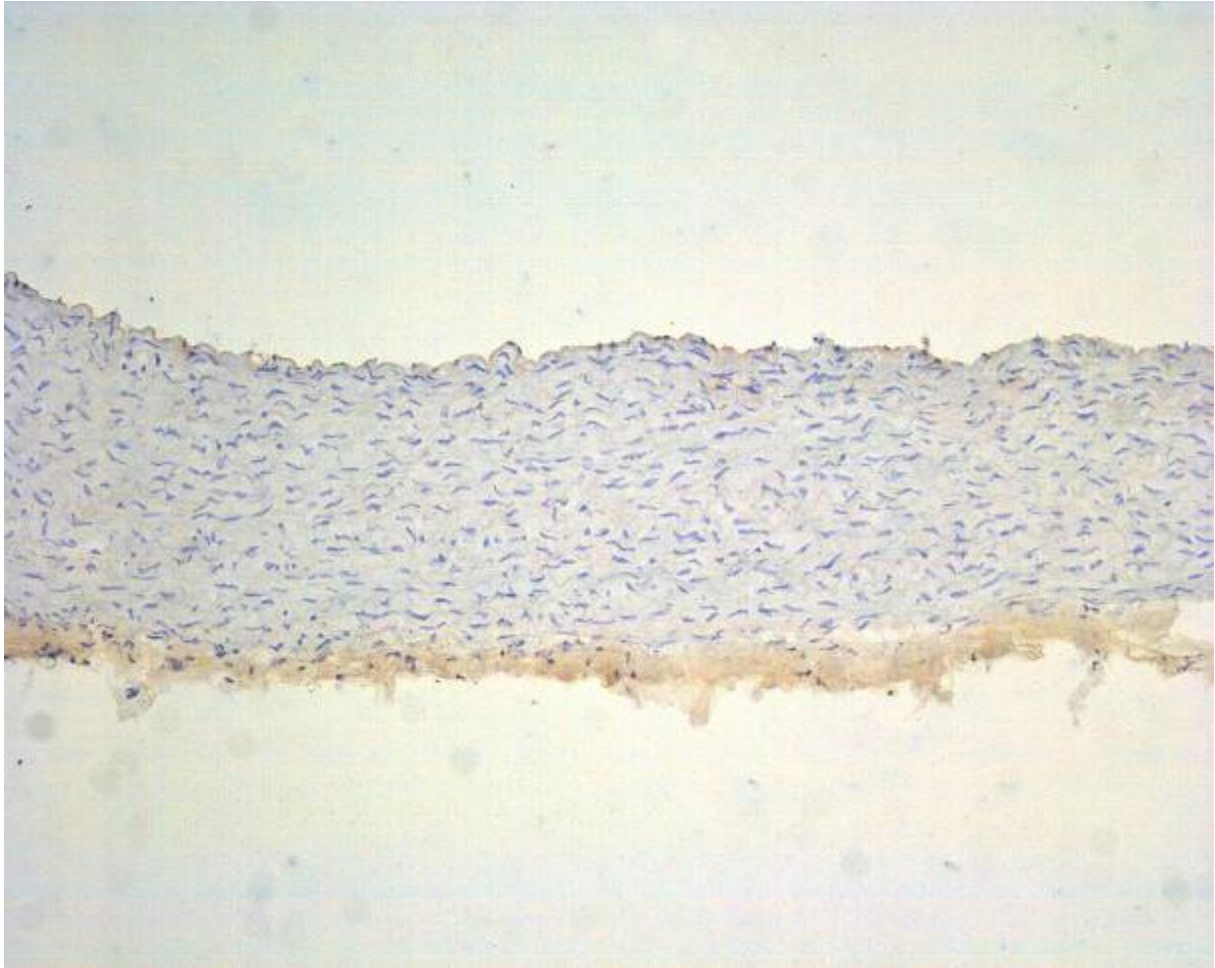
Obrázek 10. - Endoteliální exprese ICAM-1 u daunorubicinové skupiny zvířat. Exprese ICAM-1 byla velmi variabilní u zvířat daunorubicinové skupiny. Někde byla velmi silná jinde naopak téměř žádná. Zvětšení 100x.



Obrázek 11. - Endoteliální exprese VCAM-1 u kontrolní skupiny zvířat. Exprese VCAM-1 nebyla pozorována u žádného zvířete z kontrolní skupiny. Zvětšení 100x.



Endoteliální exprese VCAM-1 u daunorubicinové skupiny zvířat. Exprese VCAM-1 nebyla pozorována u žádného zvířete z daunorubicinové skupiny. Zvětšení 100x.



7. DISKUSE

Onkologická léčba je často provázena řadou vedlejších nežádoucích účinků, které mohou zkomplikovat a někdy i zmařit její výsledný efekt. Závažnou komplikací je poškození srdce neboli kardiotoxicita. I když se nevyskytuje tak často jako např. hematologická toxicita, hepatotoxicita nebo nefrotoxicita, nelze ji vzhledem k možným fatálním komplikacím podceňovat. Nejčastějšími projevy kardiovaskulární toxicity jsou arytmie, změny krevního tlaku, srdeční selhání, ischemie myokardu a perikarditida. Většina těchto komplikací probíhá akutně, tj. objevují se v průběhu léčby nebo bezprostředně po jejím ukončení. Výjimečné postavení mezi cytostatiky zaujímají antracykliny se svojí chronickou a pozdní kardiotoxicitou, která se může projevit až s časovým odstupem po ukončení léčby (Ferreira, et al. 2008).

Antracyklinová antibiotika jsou jedny z nejužívanějších cytostatik. Antracykliny, podobně jako všechna ostatní cytostatika, vykazují pouze relativní selektivitu svého cytostatického účinku. Následkem toho provází cytostatickou terapii řada nežádoucích účinků. Pro antracykliny je charakteristická významná myelosuprese, jež může výrazně ovlivňovat dávku podaného léčiva. U hlodavců a králíků používaných v preklinických experimentech byla zaznamenána poměrně výrazná nefrotoxicita antracyklinů.

První zmínky o kardiotoxickém působení antracyklinů se objevily již krátce po jejich zavedení do klinické praxe (Chen, et al. 2007). Kardiotoxické působení antracyklinových cytostatik se do značné míry vymyká nežádoucím účinkům běžně sledovaných u jiných cytostatik. Kardiotoxicita antracyklinů se ukázala být významným omezením jejich klinického užití, a proto je možnost redukce tohoto závažného nežádoucího účinku intenzivně studována. Jedním z mechanismů, který je intenzivně studován ve vztahu k rozvoji kardiotoxicity je tvorba volných kyslíkových radikálů. Není zcela jasné, jestli produkce volných kyslíkových radikálů (ROS) k protinádorovému působení. Z dostupných informací se zdá, že ROS se účastní na protinádorovém efektu antracyklinů spíše minoritně, na rozdíl od kardiotoxicity, kde patrně hrají velmi významnou úlohu (Chen, et al. 2007).

Adhezní molekuly VCAM-1 i ICAM-1 hrají důležitou roli v rozvoji zánětlivé reakce a uplatňují se také v patogenezi různých patologických stavů. Jsou exprimovány endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami (Ann

Jang Y. 1994).

Expres těchto adhezivních molekul je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují v patogenezi aterosklerózy, diabetu mellitu ale i dalších onemocnění. Bylo prokázáno, že hypercholesterolemie, oxidační stres, kouření (Powell JT 1998), hyperhomocysteinemie (Loscalzo J. 1996), hemodynamický stres (nízký shear stress) zvyšují expresi VCAM-1 a ICAM-1 (Wapola PL 1995). Expres obou těchto molekul je také indukována zánětlivými cytokiny jako TNF- α nebo IL-1 (Vlassara H. 1995) (Lahera, et al. 2007).

Cílem této rigorózní práce bylo zjistit, zda dlouhodobé podávání daunorubicinu vede kromě signifikantních změn na srdci také k rozvoji endoteliální exprese, kterou je možné na morfoloické úrovni sledovat díky expresi adhezních molekul VCAM-1 a ICAM-1.

Studium imunohistochemického barvení adhezních molekul však neprokázala indukci jejich exprese v aortálním oblouku. Expres VCAM-1 nebyla pozorována ani u kontrolní a ani u daunorubicinové skupiny. Naproti tomu slabá expres ICAM-1 byla pozorována u kontrolní skupiny. Nicméně téměř stejná intenzita exprese byla nalezena také po dlouhodobém podávání daunorubicinu. Výsledky této pilotní studie tedy naznačují, že dlouhodobé podávání daunorubicinu sice vede k rozvoji patologických změn v myokardu, nicméně nevede ke zvýšené expresi adhezních molekul VCAM-1, ICAM-1, které jsou považovány za standardní morfoloické markery rozvoje endoteliální dysfunkce.

8. ZÁVĚR

Tato rigorózní práce představuje pilotní studii, která se zaměřila na studium možné indukce endoteliální dysfunkce po dlouhodobém podávání cytostatiku daunorubicinu u králičího modelu pro studium chronické kardiotoxicity.

Imunohistochemická analýza neprokázala indukci endoteliální exprese VCAM-1 ani u kontrolní a ani u daunorubicinové skupiny.

Imunohistochemická analýza prokázala slabou endoteliální expresi ICAM-1 u obou skupin zvířat.

Bohužel nebyl zaznamenán téměř žádný rozdíl v intenzitě barvení ICAM-1 mezi kontrolní a daunorubicinovou skupinou.

Výsledky této rigorózní práce neprokázaly rozvoj endoteliální dysfunkce po chronickém podávání daunorubicinu u králíka.

9. SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ

1. Klika. 1986. Histologie. Praha.
2. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 1999;94(5):295-314.
3. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003;199(1):8-17.
4. Luksha L, Agewall S, Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2008.
5. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide* 2006;15(4):265-79.
6. Mysliwiec M, Borawski J, Naumnik B, Rydzewska-Rosolowska A. Endothelial dysfunction, atherosclerosis and thrombosis in uremia--possibilities of intervention. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004;49:151-6.
7. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109(23 Suppl 1):III27-32.
8. Nishikawa SI, Hirashima M, Nishikawa S, Ogawa M. Cell biology of vascular endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:35-40; discussion 41.
9. Brasen JH, Niendorf A. [Atherosclerosis. Formal pathogenesis, classification and functional significance]. *Pathologe* 1997;18(3):218-27.
10. ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 2008;11(1):79-89.
11. Shantaram V. Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes and hypertension. *Clin Exp Hypertens* 1999;21(1-2):69-77.
12. Mangge H, Hubmann H, Pilz S, Schauenstein K, Renner W, Marz W. Beyond cholesterol--inflammatory cytokines, the key mediators in atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(5):467-74.
13. Ferreira AL, Matsubara LS, Matsubara BB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008;6(4):278-81.
14. Ruggiero A, Ridola V, Puma N, Molinari F, Coccia P, De Rosa G, Riccardi R. Anthracycline cardiotoxicity in childhood. *Pediatr Hematol Oncol* 2008;25(4):261-81.

15. Chen B, Peng X, Pentassuglia L, Lim CC, Sawyer DB. Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 2007;7(2):114-21.
16. Barry E, Alvarez JA, Scully RE, Miller TL, Lipshultz SE. Anthracycline-induced cardiotoxicity: course, pathophysiology, prevention and management. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8(8):1039-58.
17. Nagy AC, Tolnay E, Nagykalnai T, Forster T. Cardiotoxicity of anthracycline in young breast cancer female patients: the possibility of detection of early cardiotoxicity by TDI. *Neoplasma* 2006;53(6):511-7.
18. Jones RL, Swanton C, Ewer MS. Anthracycline cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 2006;5(6):791-809.
19. Horan PG, McMullin MF, McKeown PP. Anthracycline cardiotoxicity. *Eur Heart J* 2006;27(10):1137-8.
20. Thorburn A, Frankel AE. Apoptosis and anthracycline cardiotoxicity. *Mol Cancer Ther* 2006;5(2):197-9.
21. Finolezzi E, Torromeo C, Vincenzi B, Avvisati G. [Anthracycline cardiotoxicity]. *Clin Ter* 2003;154(2):115-21.
22. Sterba M, Simunek T, Popelova O, Potacova A, Adamcova M, Mazurova Y, Holeckova M, Gersl V. Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination. *Physiol Res* 2007;56(5):535-45.
23. Kriegelstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001;14(6 Pt 2):44S-54S.
24. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27(11):2292-301.
25. Cybulsky MI, Won D, Haidari M. Leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions. *Can J Cardiol* 2004;20 Suppl B:24B-8B.
26. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001;107(10):1255-62.
27. Cybulsky MI, Lichtman AH, Hajra L, Iiyama K. Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clin Chim Acta* 1999;286(1-2):207-18.
28. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24(7):1591-601.

29. Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Miana M, de las Heras N, Cachafeiro V, Luno J. Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem* 2007;14(2):243-8.