UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

Vliv daunorubicinu na expresi markerů nitračního stresu u králičího modelu antracyklínové toxicity

RIGORÓZNÍ PRÁCE

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

Hradec Králové 2009 **Mgr. Iveta Svobodová**

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně a uvedla v ní veškerou literaturu a jiné prameny, které jsem použila.“

V Hradci Králové 14. srpna 2009 .....

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu rigorózní práce Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi za odborné vedení a vřelý přístup při vypracování rigorózní práce.

PROHLÁŠENÍ....2
PODĚKOVÁNÍ....3
1 ABSTRAKT....6
2 TEORETICKÁ ČÁST....8
2.1 Kardiovaskulární systém....8
2.1.1 Obecná struktura cév....8
2.1.1.1 Arterie....11
2.1.1.2 Kapiláry....12
2.1.1.3 Vény....13
2.1.2 Endotel a jeho fyziologická funkce....15
2.1.3 Endoteliální dysfunkce....17
2.2 iNOS....18
2.3 Nitrotyrosin....19
2.4 Antracykliny....19
2.4.1 Mechanismus účinku....20
2.4.2 Způsob podání....20
2.4.3 Farmakokinetika....21
2.4.4 Indikace....21
2.4.5 Extrakardiální účinky....22
2.4.6 Kardiotoxicita....23
2.4.7 Typy kardiotoxicity....24
2.4.7.1 Akutní kardiotoxicita....24
2.4.7.2 Subakutní kardiotoxicita....24
2.4.7.3 Chronická kardiotoxicita....24
2.4.7.4 Pozdní kardiotoxicita....24
2.4.8 Prevence kardiotoxicity....25
3 CÍL PRÁCE....26
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST....27
4.1 Zvířata a předepsaná dieta....27
5 IMUNOHISTOCHEMIE....29
6 VÝSLEDKY....31
7 DISKUSE....38
8 ZÁVĚR....40

9 SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ.....41

1 ABSTRAKT

Cílem této rigorózní práce bylo detekovat změny endoteliální exprese nitrotyrosinu ve stěně aortálního oblouku králíků, kterým bylo podáváno antracyklínové cytostatikum daunorubicin. Sledovali jsme případné změny exprese nitrotyrosinu 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 markeru nitračního stresu nitrotyrosinu ani u kontrolní a ani u žádné z daunorubicinových skupin.

Lze tedy konstatovat, že daunorubicin zřejmě neindukuje morfologicky detekovatelnou endoteliální dysfunkci v aortálním oblouku králíka u modelu antracyklínové cardiotoxicity a ukazuje na větší obrannou schopnost endoteliálních buněk ve srovnání s kardiomyocyty.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate possible changes of nitrotyrosine expression in rabbit aorta after repeated administration of daunorubicin.

Chronic anthracycline cardiotoxicity was induced by repeated administration of daunorubicinu (3 mg/kg=50 mg/m2 i.v., 1x week) for the period of 10 weeks. We focused on the monitoring nitrotyrosine 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 nitrotyrosine in any control or experimental groups.

In conclusion, the administration of daunorubicin did not induce nitrotyrosine expression in aorta in either control and daunorubicin treated rabbits, suggesting that endothelial dysfunction and/or nitrative stress in aorta is not triggered by daunorubicin treatment *in vivo.*

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kardiovaskulární systém

Kardiovaskulární systém se skládá z krevního a lymfatického vaskulárního systému. Kardiovaskulární systém distribuuje v organismu kyslík a nutriční látky ke tkáním. Dále odvádí odpadové zplodiny metabolismu k exkrečním orgánům. Zajišťuje transport hormonů k cílovým orgánům. Spolu s nervovým systémem přispívá k integraci funkce celého organismu [1].

Krevní vaskulární systém tvoří cévy a srdce. Krevní cévy se dělí na artérie, kapiláry a vény. Tepny neboli artérie se postupně větví ve stále tenčí až v nejtenčí, zvané arterioly. Ty dále přecházejí ve vlásečnice (kapiláry). Kapiláry pokračují do nejtenčích žil, které se nazývají venuly, a ty se sbírají v žíly – vény [1].

2.1.1 Obecná struktura cév

Cévní stěny odpovídají svou strukturou funkčním nárokům jednotlivých úseků cévního řečiště.

Stěna cév (Obr. 1) se skládá ze tří vrstev, které nazýváme tunica intima, tunica media a tunica adventia.

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 [2].

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 médii 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.

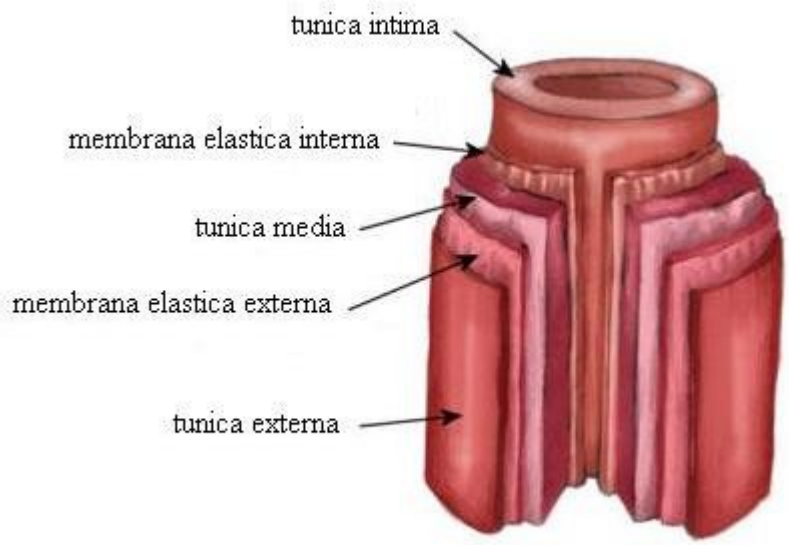
Výživa stěny drobných cév je zajišťována difuzí a inhibicí výživných látek a kyslíku z krve protékající cévou. Cévy s průměrem větším než 1 mm mají vyvinutý ve stěnách systém vlastních cév, které nazýváme vasa vasorum. Vasa vasorum mohou vznikat jako větve artérie, kterou vyživují, nebo jsou zásobovány sousedními artériemi.

Tyto cévy se mohou větvit v adventicii a v zevních oblastech médie. 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 médie. Ve vénách se nervová zakončení nacházejí v adventidii i v médii. Celkový počet nervových zakončení je ale menší než v artériích. Artérie kosterních svalů obsahují také zakončení parasympatických nervových vláken. Jejich chemickým modulátorem je zde acetycholin, který má zde vazodilatační účinek.

Všechny cévy mají poměrně velkou schopnost regenerace [2].

Obrázek 1. Obecné schéma stavby cévní stěny (převzato z www.teachpe.com).



2.1.1.1 Arterie

Podle průměru artérie dělíme je na arterioly, artérie malého a středního kalibru a artérie velkého kalibru.

Artérie (tepny) jsou většinou uloženy hlouběji v chráněných místech. Jen na některých místech je tepna povrchově uložená a její tep je hmatný. K orgánům vedou tepny zpravidla z nejbližších zdrojů. U některých orgánů mají tepny dlouhý průběh a to je známkou změny polohy tohoto orgánu během vývoje. V orgánech, které mění svůj objem, probíhají tepny vinutě a vlnovitě.

Stěna každé tepny má tři vrstvy, jsou to tunica intima, tunica media a tunica externa.

Tunica intima se skládá z jedné vrstvy plochých endotelových buněk podložených sítí elastických a kolagenních vláken nebo elastickými blankami. Elastická vlákna a blanky se souhrnně nazývají membrana elastica interna.

Tunica media je nejsilnější z vrstev stěny tepny. Skládá se z hladké svaloviny, jejíž buňky probíhají cirkulárně nebo v nízkých spirálovitých závitech, mezi nimiž a kolem jsou sítě kolagenních a elastických vláken. Podle velikosti tepen převažuje elastická nebo svalová složka v tunica media, a tepny se proto označují jako tepny elastického typu nebo svalového. Velké tepny jsou typu elastického, ve středně velkých tepnách je svalová a elastická složka v rovnováze. S větvením na menší cévy přibývá svaloviny a tepny menšího kalibru jsou svalového typu.

Tepny elastického typu se při systolickém nárazu krve rozpínají a při diastole se vracejí do původního kalibru. Tím pohánějí krev. Tepny svalového typu mají ve svalovině své stěny hlavně regulační aparát, který mění průsvit tepny a reguluje tak přítok krve.

Tunica externa je na povrchu cévy. Tvoří ji fibrilární vazivo s kolagenními i elastickými vlákny, která se na povrchu cévy síťovitě překřižují a přecházejí do vaziva v nejbližším okolí cévy. Od svalové vrstvy bývá tunica externa oddělena elastickou vrstvičkou – membrana elastica externa.

Zvláštním typem malých arterií jsou tzv. polštářkové artérie, které mají pod intimou podélně uložené svalové buňky, které svým smrštěním polštářkovitě zdvihnou intimu a zúží průsvit cévy.

Protože stěny tepen jsou relativně silné, nestačí pro ně přívod kyslíku a živin z protékající krve difusí stěnou. Výživu a kyslík pro stěny tepen obstarávají slabé tepénky a odvádějí tenoučké žilky, které v cévních stěnách podélně probíhají. Nazývají se vasa vasorum.

Arterioly jsou nejtenčí artérie. Skládají se z endotelu a z tenké vrstvičky cirkulárně probíhajících hladkých svalových buněk. Mezi endotelem a svalovými buňkami je membrana elastica interna, která se skládá ze sítě vláken. Na povrchu svalových buněk je tenká fibroelastická vrstva. Arterioly mají poměrně silnou stěnu a malý průsvit. Jsou bohatě zásobeny nervovými vlákny. Svou svalovinou pohotově mění průsvit, a proto patří k hlavním oblasti regulace průtoku cévním řečištěm v organismu. Konečné úseky arteriol před kapilárami se označují jako prekapiláry, prekapiláry dále pokračují do kapilár [3].

2.1.1.2 Kapiláry

Kapiláry neboli vlásečnice jsou velmi úzké cévy o průměru okolo 7 μm. Stěnu tvoří jen jedna vrstva endotelových buněk, k nimž zvenčí přiléhá síť retikulárních vláken. Na kapiláru mohou přiléhat zvenčí tzv. pericyty, které svými tenkým výběžky obemykají kapiláru. Pericyty mohou zužovat průsvit kapiláry.

Šířka kapilár je proměnlivá, nejběžnější průsvit odpovídá rozměru červených krvinek. Existují i menší kapiláry, které se nacházejí v sítnici oka a ve svalech. Široké kapiláry se nacházejí v játrech, kostní dřeni, v zubní dřeni a v kůře nadledvin. Tyto kapiláry se označují jako sinusoidy. Některé endotelové buňky mají i fagocytární schopnosti.

Průsvit kapilár se mění vlivem nervů, přímým vlivem některých působků. Adrenalin působí zúžení kapilár, naopak histamin s některými produkty látkové výměny, jako je CO_2 a kyselina mléčná, kapiláry rozšiřují.

Kapiláry mají různou úpravu v jednotlivých orgánech. Nejčastěji tvoří sítě, někdy podélné sítě s příčnými svaly, kolem žlázovitých striktur vytvářejí košíčkové sítě, v kožních kapilárách a ve střevních klcích tvoří kličky, v ledvinách klubíčka. Tenkými stěnami kapilár probíhá veškerá látková výměna v organismu. Pro tuto výměnu je adaptována struktura endotelových buněk, které tvoří velmi tenkou vrstvu kapiláry. Tu zevně doplňuje tenká vrstva lamina basalis. V některých orgánech jsou stěny kapilár zcela souvislé, v jiných se nacházejí tzv. fenestrované kapiláry. V jejich stěnách se

nacházejí submikroskopické póry překryté ultratenkou blankou (diafragmou), na jejíž zevní straně teprve je lamina basalis. Struktury molekul v diafragmě výrazně ovlivňují její propustnost. Kapiláry pokračují jako tzv. postkapiláry. Postkapiláry mají stejnou stavbu jako kapiláry, ale na rozdíl od kapilár jsou širší. Postkapiláry dále pokračují do žil.

Přechod prekapiláry do kapiláry a do žíly se v jednotlivých orgánech liší a tkáních liší. V některých orgánech a tkáních platí schéma arteriola – prekapilára – prevenula – venula, v jiných orgánech a tkáních je to mnohem složitější.

2.1.1.3 Vény

Venuly jsou nejtenčí žíly, se stěnou složenou ze tří vrstev. Vnitřní vrstva též tunica intima, obsahuje endotel a tenkou vazivovou subendotelovou vrstvu, kde není vytvořena membrana elastica interna. Střední vrstva tunica media se skládá z tenké vrstvy hladkých svalových buněk, bez elastických vláken. Tunica externa je složena z poměrně silné vrstvy vaziva s kolagenními vlákny. Venuly se sbíhají do žil.

Žíly mají tenčí stěny než tepny stejného kalibru. Celkový objem žilního řečiště v těle je asi trojnásobná oproti objemu řečiště tepen. Krev v žilách proudí pomalu, protože ji nepohání síla srdce. Pohyb krve v žilách je závislý na řadě pohybů těla, které nepřímo pohánějí krev v přilehlých žilách.

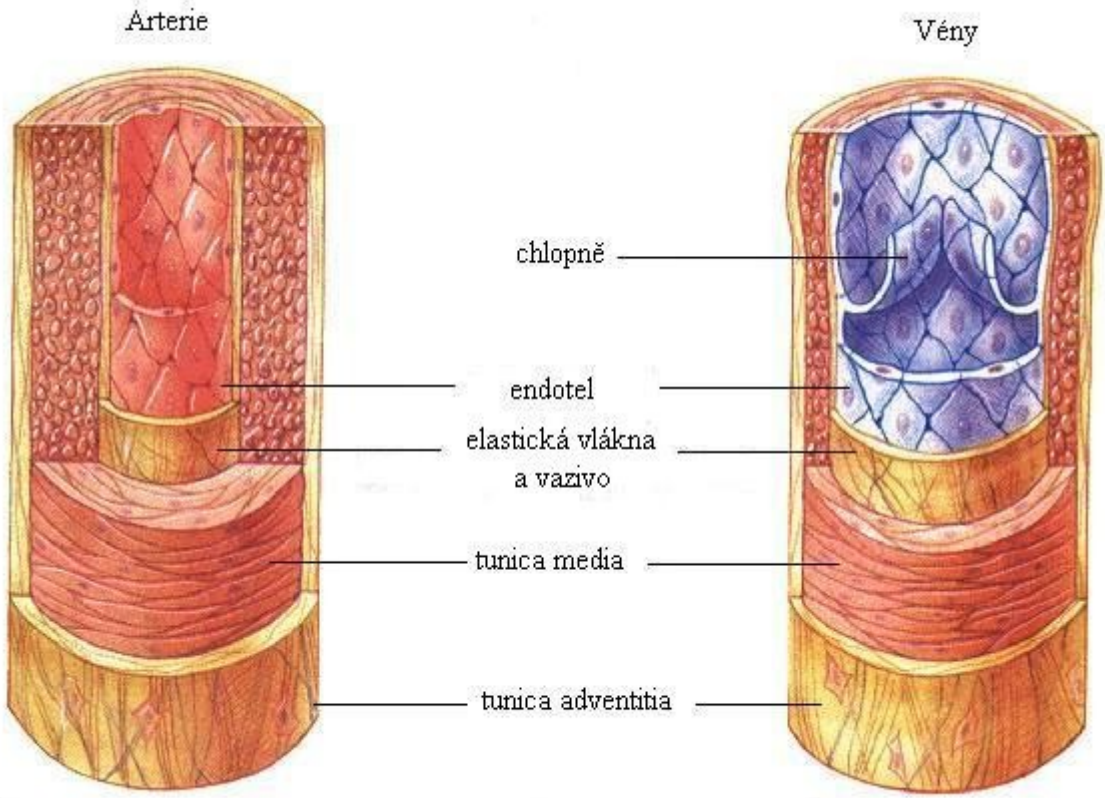
Velký objem žilního řečiště a pomalý průtok v něm jsou podkladem toho, že na řadě míst těla představuje žilní řečiště reverzní objem krve, který může být při naléhavé potřebě rychle dodán do oběhu. Poloha žil v těle je dvojí. Povrchové žíly zpravidla nedoprovázejí obdobné tepny. Tepny probíhají v podkožním vazivu, jsou místy pod kůží viditelné a mají spojky do hlubokých žil skrze povrchové facie. Hluboké žíly většinou doprovázejí tepny, často i nervy. Podél tepen středního kalibru jdou často dvě žíly, které mohou být místy napříč spojené.

Stěny žil mají tři vrstvy. Od tepen se liší menší relativní tloušťkou vrstev a poměrem zastoupení jednotlivých tkáňových složek v nich. V tunica intima je membrana elastica interna vytvořena až v žilách středního a většího průměru. Také tunica media je tenčí a obsahuje méně hladké svaloviny než v tepnách.Svalovina chybí na některých žilách, které jsou vsazeny do okolního hustého vaziva nebo do spongiózní kosti. Tím jsou zbaveny možnosti regulovat průtok krve. I stěny většiny největších žil mají zredukovanou svalovinu.

Žilní chlopně jsou útvary charakteristické pro žíly. Jedná se o výběžky intimy kryté endotelem, uvnitř jsou vyztužené dostatečným množstvím vaziva. Žilní chlopně mají poloměsíčitou formu, s jednou až třemi kapsami. Jejich orientace dovoluje průtok krve jen jedním směrem, a to k srdci. V žilách jsou chlopně různě četné a od sebe různě vzdálené. Nejčetnější jsou na končetinových žilách, povrchových a i hlubokých [1].

Struktura cév je znázorněna na obrázku č. 2.

Obrázek 2. Znázorňuje strukturu cév (převzato z http://faculty.stcc.edu).



2.1.2 Endotel a jeho fyziologická funkce

Endotel tvoří jednovrstevnou vnitřní výstelku cévního lumen. Endoteliální buňky mají nepravidelný podlouhlý tvar s délkou okolo 25-50 μm, šířkou 10-15 μm a výškou do 5 μm. Dlouhou dobu se předpokládalo, že endotel tvoří pouze buněčnou bariéru oddělující cévní stěnu od krve a zajišťuje nesmáčivý povrch cévního lumen. Výzkum v posledních letech však prokázal, že endotel je metabolicky velmi aktivní orgán s celou řadou fyziologických funkcí [4].

Jednou ze základních funkcí endotelu je zajištění řízené propustnosti mezi krví a okolními tkáněmi. Endotel kontroluje prostup jak pro buněčné elementy, tak pro nebuněčné krevní komponenty. Nebuněčné komponenty využívají pro svou cestu paracelulární i transcelulární transportní mechanismy. Prostup krevních elementů – leukocytů je realizován za pomoci vazoadhezivních molekul, kterých endotel na svém povrchu exprimuje celou řadu (E-selektin, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1).

Další úlohou endotelu je kontrola optimálního průtoku krve cévou. Mezi nejdůležitější látky s vazoaktivním účinkem, které jsou produkovány endotelem, patří oxid dusnatý (NO). Jeho tvorba je zprostředkována NO-syntázou, která je aktivována smykovým napětím krevního proudu (shear-stress), hypoxií a celou řadou lokálních působků. NO má mohutný vazodilatační účinek, inhibuje expresi adhezivních molekul, adhezi a agregaci trombocytů a apoptózu endoteliálních buněk. Brzdí též migraci myocytů z médie, jejich proliferaci a transformaci v sekreční buňky. Další vazodilatační látkou produkovanou endotelem je prostacyklin [5]. Prostacyklin je uvolňován za obdobných situací jako NO a jejich účinek se navzájem potencuje. Třetím vazodilatačně působícím faktorem je endothelium – derived hyperpolarizing factor, jehož hlavní biologickou úlohou je pravděpodobně vazodilatace v koronárním řečišti. K zachování rovnováhy vzniká v endotelu několik látek s vazokonstrikčním působením. Jde především o endotelin-1. Vedle podnětů, které vedou i k uvolnění NO (např. bradykinin, angiotenzin II, shear stress), jeho syntézu stimulují některé aterogenní proteiny (trombin), či lipoproteiny (oxidovaný LDL). V intaktních cévách působí endotelin-1 bimodálně – vazokonstrikční účinek je mírněn současnou stimulací produkce NO a prostacyklinu [6].

Plná vazokonstrikce se objeví až při poškození endotelu. Endotelin-1 také stimuluje proliferaci myocytů v cévní stěně. Na povrchu endotelu je též vázán angiotenzin-konvertující enzym a endotel může prostřednictvím změny jeho aktivity

ovlivňovat hladiny angiotezinu II a bradykininu. Další funkcí endotelu je zajištění integrity cévního řečiště. Intaktní endotel je dokonale nesmáčivým povrchem. Již při pouhé deskvamaci endoteliálních buněk dochází k absorbci von Willebrandova faktoru (vWF) a ten prostřednictvím destičkových receptorů aktivuje adhezi trombocytů, které se vážou na subendoteliálně lokalizovaná vlákna kolagenu. Poté dochází k jejich aktivaci a degranulaci, což vede k uvolnění řady dalších proagregačně a vazokonstrikčně působících látek. Prostřednictvím destičkových receptorů IIb/IIIa a fibrinogenu destičky agregují. Primární, destičková fáze hemokoagulace je doprovázena sekundární hemostázou, na jejímž konci je přeměna fibrinogenu trombinem v nerozpustný fibrin. I tato fáze je ovlivnitelná endotelem. Endotel váže na svém povrchu antitrombin III, který inaktivuje trombin a vzniklý komplex je z cirkulace odstraněn. Endotel také produkuje trombomodulin. Komplex trombomodulin-trombin má již omezenou schopnost štěpit fibrinogen, navíc aktivuje protein C, který – v komplexu s proteinem S – inaktivuje faktory Va a VIIa a tím inhibuje koagulaci. Endotel kontroluje navíc i fibrinolýzu. Klíčovým enzymem štěpícím molekuly fibrinu je plasmin. Ten vzniká z cirkulujícího plasminogenu působením tkáňového aktivátoru plasminogenu (t-PA). Ten naopak může být inhibován svým inhibitorem (PAI-1). Jak t-PA, tak PAI-1 jsou v endotelu syntetizovány a mohou být v různém poměru uvolňovány.

Endotel může zasahovat i do reparativních procesů a angiogeneze. Reparativní pochody v cévní stěně jsou kontrolovány řadou cytokinů. Mezi růstové faktory a cytokiny endoteliálního původu jsou řazeny např. Transformující růstový faktor beta, fibroblastový růstový faktor, destičkový růstový faktor, interleukin-1, endotelin-1. Tyto mitogeny stimulují růst buněk hladké svaloviny, jejich migraci do subendoteliálního prostoru z médie s následnou hyperplázií intimy a hypertrofií cévní stěny. Naopak velmi významným antimitogenem je NO, který inhibuje proliferaci buněk hladké svaloviny a zabraňuje hypertrofii cévní stěny [7].

2.1.3 Endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkce je definována jako funkční poškození endotelu, charakterizované především zvýšenou propustností cévní stěny, nerovnováhou mezi vazoaktivními, hemokoagulačními a proliferaci inhibujícími, resp. stimulujícími působky. Mimo selektivní zvýšení permeability se projevuje sklonem k vazospazmu, resp. nedostatečnou vazomotorickou odpovědí na endotel-dependentní podnět (někdy dokonce paradoxní vazokonstrikcí), tendencí k trombóze a nedostatečnou inhibicí subendoteliální proliferace. Představuje časnou, morfologicky němou fázi aterosklerózy, avšak podílí se i na vývoji morfologicky zřejmých aterosklerotických lézí a přispívá ke klinické manifestaci aterosklerózy. Hraje důležitou roli také v patogenezi hypertenze, srdečního selhání, renálního selhání, komplikací diabetes mellitus, sepse a dalších chorob. Existuje řada příčin endoteliání dysfunkce. Většina z nich jsou známé rizikové faktory aterosklerózy. Mezi hlavní příčiny patří arteriální hypertenze, hyperlipoproteinémie (zejména hypercholesterolémie a především zvýšená hladina LDL, přičemž nejnebezpečnější jsou oxidované či glykované LDL), hyperglykémie, hyperinzulinémie, hypoxie, hyperhomocysteinémie, kouření, ionizující záření, cytostatika, stárnutí, imunokomplexy a různé infekce. Je zřejmé, že např. u diabetu působí navzájem několik rizikových faktorů, které vznik endoteliální dysfunkce akcelerují. K těmto systémovým faktorům se mohou přidat lokálně působící faktory jako jsou turbulence krevního toku (bifurkace cévy, menší fixace cévy k okolí), vrozené či získané cévní anomálie, či intravaskulární výkony (angioplastika). [8].

2.2 iNOS

Hlavním vasodilatačním faktorem, produkovaným endoteliálními buňkami, je oxid dusný. Ten je syntetizován endotelovou syntházou. Gen eNOS je exprimován konstitutivně, ale exprese reaguje také na stres. Přestože je eNOS primárně přítomen v endotelových buňkách, může být také nalezen v krevních destičkách a některých neuronech. Při aktivaci eNOS jsou důležité další faktory, jako je NADP; 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin; FMN a FAD. Sekrece oxidu dusného je zodpovědná za vasodilataci [9].

Oxid dusný snáze proniká do tkání a aktivuje guanylcyklázu, která zvyšuje hodnoty cGMP. Zvýšené hodnoty cGMP zapříčiňují inhibici kontraktilních mechanismů vedoucích k vasorelaxaci. Endotelové buňky navíc uvolňují NO do krve a vyvolávají deregulaci endotelových buněk adhezivních molekul, intracelulárních adhezivních molekul-1 (ICAM-1) a vaskulárních buněk adhezivních molekul (VCAM-1).

Regulace NO je ovlivněna hlavně především stresem, stres je dokonce jeden z nejdůležitějších stimulů eNOSu. Bylo dokázáno, že fyzické cvičení dokáže stimulovat produkci NO ve svalech, stejně tak jako indukovat expresy eNOS genu.

Endotelová produkce NO může být stimulována hormony, acetylcholinem, vasopresinem, estrogeny, histaminem a dále faktory z krevních destiček- serotoninem, ADP, stejně tak jako faktory tvořené při krevní koagulaci – trombinem; narozdíl od zánětlivých cytokinů, které snižují expresy eNOSu. Mezi cytokiny patří TNF a LDL.

Porucha regulace NO byla nalezena v mnoha vaskulárních onemocněních včetně aterosklerózy, hypercholesterolemie, ischemické choroby srdeční, diabetu a hypertenze. Výzkumy ukazují, že endotelová svalová relaxace je porušena zejména u zvířat živených stravou bohatou na cholesterol nebo u aterosklerotických arterií. Tyto poruchy souvisí se stupněm rozvoje aterosklerózy [10].

Endotelové buňky nemají jen ochranou funkci, ale ve zvýšené míře mohou poškozovat endotel. Proto endotel může hrát dvojí roli v aterogenezi. Vysoké hladiny NO, které mohou poškozovat buňky, jsou produkovány tzv. inducible NOS (iNOS). Tato isoforma NOSu je primárně přítomná v makrofázích, hepatocytech, myokardu a v hladkých svalových buňkách.

Zvýšené hodnoty NO způsobují různými mechanismy apoptózu ve svalových buňkách. NO je reaktivní a ve zvýšených hladinách může způsobit poškození buněk. Reaguje se superoxidem na peroxonitrit, u kterého výzkumy ukázaly, že může být hlavní faktor buněčného poškození.

Takto zvýšené hladiny NO mohou přispívat k rozvoji stresu a tkáňového poškození v aterogenezi [11].

2.3 Nitrotyrosin

Mezi enzymy, které se podílejí na rozvoji zánětlivých onemocnění patří také nitrotyrosin. Nitrotyrosin vzniká spolu s 3-chlorotyrosinem z myeloperoxidázy (MPO) oxidačními procesy. Koncentrace nitrotyrosinu a 3-chlorotyrosinu jsou zvýšeny u jedinců, u kterých se rozvíjí ateroskleróza [12].

Nitrotyrosin hraje důležitou roli při rozvoji aterosklerózy a jiných zánětlivých onemocnění. Skládá se z tyrosinu, který může být volný nebo vázaný. Forma vázaná na protein je biologicky aktivní nitrotyrosin, který vzniká nitrací z tyrosinu. Tato forma má rovněž spojitost s aterosklerózou. Nitrotyrosin může vznikat několika cestami. MPO oxiduje anion kyseliny dusité (NO_2^-) na oxid dusičitý, který umožňuje nitraci tyrosinu na nitrotyrosin. Další cesta vzniku nitrotyrosinu je oxidace $HClO^-$, pomocí enzymu MPO. $HClO^-$ se oxiduje na NO_2Cl pomocí NO_2^-. Výsledný produkt NO_2Cl je také druh reaktivního nitrogenu, který podporuje tvorbu nitrotyrosinu.

Kouření je další faktor, který podporuje vznik nitrotyrosinu, který se dále podílí na vzniku zánětlivých onemocnění a tvorby aterosklerózy.

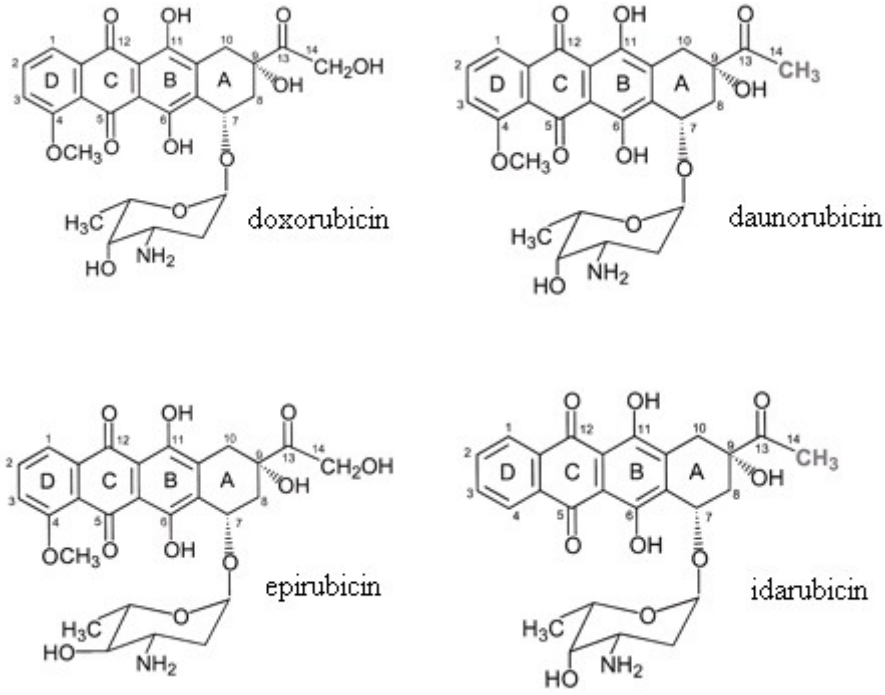
2.4 Antracykliny

Tato skupina léků byla izolována z mikroorganizmů podobně jako antibiotika působící proti bakteriím. Společným účinkem léků této skupiny je poškozování maligních, ale i zdravých buněk, liší se však způsobem, jakým toho dosahují a liší se i vedlejšími nežádoucími účinky.

Antracyklíny se skládají z tetracyklického aglykonu s chinonovými a hydrochinonovými skupinami. Na kruh A je vázán cukr daunosamin. [13].

Struktury antracyklínů jsou ukázány na obrázku (Obr.3).

Obrázek 3. Struktura jednotlivých antracyklinů (převzato z www.wikipedia.org) .



2.4.1 Mechanismus účinku

Za hlavní cílovou strukturu pro cytostatický účinek antracyklinů se považuje DNA v jádře buňky. Antracykliny mají schopnost interkalace, to je schopnost vmezeřovat se mezi páry bází DNA a blokovat funkci zejména topoisomerázy II. Důsledkem je inhibice replikace a transkripce DNA a RNA. V přítomnosti antracyklinů se také generují reaktivní sloučeniny kyslíku, které vedou k peroxidaci lipidů, poškozují myokard, a podmiňují kardiotoxicitu. Tkáň myokardu je chudá na antioxidační enzymy, které mohou působení kyslíkových radikálů eliminovat, a tím se projeví jejich toxický účinek právě v myokardu.

Typické jsou změny subcelulární struktury, to znamená pomalou ztrátu myofibril a vaskuolizace buněk. V tomto ději se významně uplatňují ionty železa dostupné z myoglobinu a hemoglobinu [13].

2.4.2 Způsob podání

Dávkovací schéma podávání se může lišit podle jeho užití v rámci specifického léčebného režimu (např. v monoterapii nebo v kombinaci s jinými cytotoxickými látkami) a v závislosti na indikaci.

Je doporučena aplikace kanylou volně protékající intravenózní infuzí (0,9% fyziologického roztoku nebo 5% roztoku glukózy). Infuze by měla být běžně podávána v časovém rozmezí 3-20 minut dle dávky a objemu infuzního roztoku, aby se minimalizovalo riziko vzniku trombózy nebo perivenózní extravazace. Přímé podání injekce se nedoporučuje vzhledem k riziku extravazace.

Ostatní způsoby podání se příliš nevyužívají. Výjimkou je perorální aplikace idarubicinu [14].

2.4.3 Farmakokinetika

Biotransformace antracyklinů se odehrává většinou v játrech. vznikají alkoholické metabolity a ty mají mnohem nižší cytostatickou aktivitu. Alkoholové metabolity se podílejí i na orgánové toxicitě.

Většina dávky je u z organismu vyloučena játry, pouze menší část léčiva je z organismu vyloučena ledvinami.

2.4.4 Indikace

V hematologii je doxorubicin součástí kombinací k léčbě nehodgkinských lymfomů, Hodgkinovy choroby, mnohočetného myelomu, akutní lymfoblastické a myeloidní leukémie. U solidních tumorů patří mezi indikace: karcinom prsu, osteosarkom, sarkom měkkých tkání, malobuněčný bronchogenní karcinom. Karcinom močového měchýře, ovaria a endometria, žaludku a štítné žlázy, jater. Neuroblastom a Wilmsův nádor. Doxorubicin je možnou alternativou k léčbě nádorových výpotků v intrapleurální nebo intraperitoneální aplikaci.

Daunorubicin se používá především k indukční léčbě lymfoblastické a myeloblastické leukemie nebo k léčbě blastické transformace chronické myeloidní leukemie. Lék se používá zásadně v kombinační léčbě [15].

Na terapii epirubicinem příznivě reaguje široké spektrum nádorových onemocnění časný, metastazující a pokročilý karcinom prsu. Dále karcinom ovaria, žaludku a jícnu, karcinom v oblasti hlavy a krku. Také se používá pro léčbu primárního hepatocelulárního karcinomu, karcinomu plic, sarkomů měkkých tkání a kostí, akutní leukemie, karcinom močového měchýře, non-hodgkinský lymfom a Hodgkinův lymfom, mnohočetný myelom, karcinom pankreatu, hormonálně refrakterní karcinom prostaty a karcinom rekta.

Idarubicin se používá u léčby akutní nelymfocytární leukémie dospělých. Je schopen indukce remise jak v terapii první linie, tak u pacientů s relapsem, kteří neodpověděli na léčbu. Další využití idarubicinu je u akutní lymfocytární leukémie u dospělých a dětí jako terapie druhé linie.

Mitoxantron patří mezi antracyklinové deriváty. Používá se k indukční léčbě akutní myeloblastické leukemie a je cytostatikem druhé volby u Hodkinovy choroby a nehodgkinských lymfomů. U solidních tumorů se uplatňuje v léčbě karcinomu prsu a ovaria [16].

2.4.5 Extrakardiální účinky

Hematologická toxicita stejně jako ostatní cytotoxické látky způsobují antracykliny myelosupresi. Před zahájením a v průběhu každého terapeutického cyklu by měl být vyhodnocen hematologický profil včetně diferenciálního bílého obrazu. Predominantní manifestací hematologické toxicity je reverzibilní leukopenie nebo granulocytopenie (neutropenie) a je nejčastější akutní toxicitou limitující podání tohoto léku. Leukopenie a neutropenie jsou obecně závažnější při režimech s vysokými dávkami, dosahují nejvýznamnějšího minima mezi 10. a 14. dnem po podání léku. Ve většině případů jsou tranzientní s návratem počtu neutrofilů k normálním hodnotám k 21. dni. Mohou se vyskytnout také trombocytopenie a anemie. Těžká myelosuprese se klinicky projevuje horečkou, sepsí/septikemií, septickým šokem, hemoragií, tkáňovou hypoxií nebo úmrtím [16].

Sekundární leukemie byla zaznamenána u pacientů léčených antracykliny včetně. Její výskyt je častější při současném podávání s antineoplastickými agens poškozujícími DNA, nebo pokud byli již dříve pacienti intenzivně léčeni cytotoxickými léky nebo pokud byly dávky antracyklinu eskalovány. Tyto leukémie mohou mít latentní periodu 1 až 3 roky.

Emetogenní účinek řadí řadí antracykliny mezi střední až silné emetogeny. Nauseu a zvracení lze potlačit antagonisty serotoninových receptorů. Mukozitida se obecně dostaví brzy po podání léku a pokud má těžký průběh, může během několika dní vyústit ve slizniční ulcerace. Většina pacientů se zotaví z tohoto nežádoucího účinku do třetího týdne léčby.

Eliminace probíhá převážně hepatobiliární cestou. Hladiny celkového bilirubinu by měly být zjištěny před započetím léčby a během léčby. U pacientů se zvýšenými hodnotami bilirubinu a může dojít ke zpomalení eliminace léčiva a zvýšení celkové

toxicity. U těchto pacientů jsou doporučeny nižší dávky. Pacientům s těžkým postižením jater by neměl být podávány [17].

.

2.4.6 Kardiotoxicita

Projevy kardiotoxicity byly popsány po podání většiny cytostatik. Nejvíce pozornosti je věnováno antracyklinům a mitoxantronu, neboť představují největší riziko. Častěji se s projevy kardiotoxicity setkáváme i po podání cyklofosfamidu, 5-fluorouracilu, taxanu a trastuzumabu.

Kardiotoxicita antracyklinů je kumulativní, na prvním místě závisí na dosažené kumulativní dávce (KD). Jsou stanoveny maximální doporučené KD pro jednotlivé preparáty: 550 mg/m$_2$ pro daunorubicin a doxorubicin, 100 až 150 mg/m$_2$ pro idarubicin, 850900 mg/m$_2$ pro epirubicin a 160 mg/m$_2$ pro mitoxantron (při předchozí léčbě antracykliny 100 mg/m$_2$).

Dalšími rizikovými faktory kardiotoxicity antracyklinů jsou věk (nad 65 let, pod 3 roky), kombinace s jinými kardiotoxickými cytostatiky (cyklofosfamid, taxany, 5-fluorouracil) nebo radioterapií mediastina, ženské pohlaví, předcházející srdeční onemocnění a bolusové podání cytostatika.

Podle časového faktoru dělíme kardiotoxicitu antracyklinů na akutní, subakutní, chronickou a pozdní. Klinicky významná je hlavně chronická a pozdní kardiotoxicita, která se projevuje s časovým odstupem po ukončení léčby jako chronické srdeční selhání [18].

Jejími projevy jsou nejčastěji supraventrikulární extrasystoly (SES), komorové extrasystoly (KES), nespecifické změny úseku ST-T a prodloužení intervalu QTc. Názory na změnu srdeční frekvence po podání antracyklinů nejsou jednotné, některé práce popisují vzestup tepové frekvence, jiné její pokles. Vzácně se vyskytujícími komplikacemi jsou perikarditida, akutní srdeční selhání a infarkt myokardu. Dále byla popsána jednotlivá náhlá úmrtí pacientů léčených antracykliny pod obrazem fibrilace komor u pacientů s prodlouženým intervalem QTc, komorové tachykardie typu torsade du pointes a nezvladatelný AV blok III. Stupně [18].

2.4.7 Typy kardiotoxicity

2.4.7.1 Akutní kardiotoxicita

Akutní kardiotoxicita je přechodná, reverzibilní, eventuálně klinicky zvládnutelná antiarytmiky. Objevuje se bezprostředně po první dávce (během 24 hod.) nebo jako následek první léčebné kúry změnami na EKG v úseku ST-T, prodloužením QT intervalu a arytmiemi. Po skončení arytmie může léčba pokračovat. Akutní kardiotoxicita bývá doprovázena myelosupresí, nauzeou a zvracením [18].

2.4.7.2 Subakutní kardiotoxicita

Subakutní toxicita je spojena se syndromem perikarditidymyokarditidy. Klinickým projevem jsou příznaky srdečního selhávání. Byla popsána po opakovaném podání daunorubicinu nebo v průběhu několika měsíců po skončení chemoterapie.

2.4.7.3 Chronická kardiotoxicita

Kardiotoxicita způsobená dlouhodobějším podáváním doxorubicinu, označovaná jako chronická, se projevuje kardiomyopatií, která může mít za následek srdeční selhání. Souvisí s kumulativní dávkou (> nebo = 550 mg/m2). Klinicky se manifestuje náhle (během prvního roku léčby, nejčastěji 1-2 měsíce po poslední dávce) a rychle progreduje. Je poměrně rezistentní na léčbu. Může ohrozit život nemocného, její prognóza bývá vážná. Symptomy: tachykardie, tachypnoe, dilatace srdce, plicní a venózní kongesce, pleurální výpotky. Příčinou je poškození a progresivní ztráta myocytů, která je zprvu funkčně kompenzována zbylými myocyty, a proto často uniká pozornosti. S růstem kumulativní dávky se však prohlubuje pokles stažlivosti myokardu a klesá ejekční frakce. Následkem může být akutní srdeční dekompenzace [18].

2.4.7.4 Pozdní kardiotoxicita

Pozdní kardiotoxicita se může manifestovat po více letech až desetiletích (4-20 let) od ukončení léčby. V elektrických vlastnostech se projevuje poruchami vodivosti a tachyarytmiemi. Poškození myocytů a dysfunkce komor mívá za následek pozdní dekompenzaci srdce. Tento typ kardiotoxicity byl popsán i u dětí [19].

2.4.8 Prevence kardiotoxicity

Prevencí srdečního poškození je lék dexrazoxan (ICRF-187), strukturně příbuzný EDTA. Lék je podáván obvykle 15 minut před doxorubicinem v množství 10 - 20x větším než je dávka podávaného cytostatika. Dosavadní studie nepotvrzují původní předpoklady, že podání dexrazoxanu snižuje počet léčebných odpovědí, zkracuje přežívání nemocných nebo zvyšuje myelotoxicitu léčby.

Také změna lékové formy antracyklinů - podání lipozomální formy - umožňuje zvýšit celkovou kumulativní dávku bez zvýšení rizika kardiotoxicity.

Podobně změna délky aplikace z krátké infůze na několikahodinovou kontinuální infůzi nebo podání ve schématu 1x týdně (kumulativní dávka podána ve více jednotlivých dávkách) je doprovázeno snížením kardiotoxicity.

Prevencí předávkování antracyklinů, a tím i nárůstu toxicity, je redukce dávek antracyklinů při poruše jaterních funkcí. Dávku doxorubicinu nebo epirubicinu je vhodné redukovat o 50 % při hodnotách sérového bilirubinu v rozmezí 1,5 - 3 násobku normálních hodnot a o 75 % při 3 - 5 ti násobku sérových hodnot bilirubinu.

U asymptomatických nemocných s ejekční frakcí levé komory pod 35%, tj. ve stadiu NYHA 1 městnavého srdečního selhání, se uplatňují ACE inhibitory. Nověji lze podat antagonisty receptoru pro angiotensin I, které snižují morbiditu a mortalitu na kardiovaskulární poruchy ještě účinněji než ACE inhibitory. Indikace srdečních glykosidů, beta-blokátorů a blokátorů kalciových kanálů se neliší od indikací pro jiné formy srdečního selhání. V případě manifestního městnavého srdečního selhání doplňujeme léčbu ACE inhibitory o léčbu diuretiky [19].

3 CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo detekovat změny endoteliální exprese markeru nitrace proteinů nitrotyrosinu ve stěně aortálního oblouku králíků, kterým bylo podáváno antracyklínové cytostatikum daunorubicin. Sledovali jsme případné změny exprese nitrotyrosinu po různých dávkových intervalech podávání daunorubicinu. Pro zobrazení exprese tohoto markeru byly využity imunohistochemické metody.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Zvířata a předepsaná dieta

Pokusná zvířata: králíci, 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 užity 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 mg/kg=50 mg/m2 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 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

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 7μm 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-rabbit nitrotyrosine (Chemicon, clone 2A8.2) ředění 1:100

Pracovní postup

EnVision systém – detekce exprese nitrotyrosinu

1. sušení tkáňových řezů v termostatu (60min)
2. fixace v acetonu (-20°C; 30min)
3. oschnutí řezů (15min)
4. promytí v PBS (2 x 5 min)
5. aplikace 10% blokujícího zvířecího séra (30 min)
6. aplikace primární protilátky (inkubace 60 min)

7. promytí v PBS (2 x 5 min)
8. promytí v 3% H_2O_2 (15 min)
9. promytí v PBS (2 x 5 min)
10. aplikace sekundární protilátky (inkubace 30 min)
11. promytí v PBS (2 x 5 min)
12. inkubace s roztokem chromogenu (DAB) (doba inkubace různá pro každou protilátku)
13. oplach řezů v aceton
14. odvodnění řezů (aceton)
15. odvodnění řezů (aceton-xylen 10/1) (3 min)
16. odvodnění řezů (aceton-xylen 1/10) (3 min)
17. odvodnění řezů (xylen) (3 x 2 min)
18. montování řezů do Eukittu

6 VÝSLEDKY

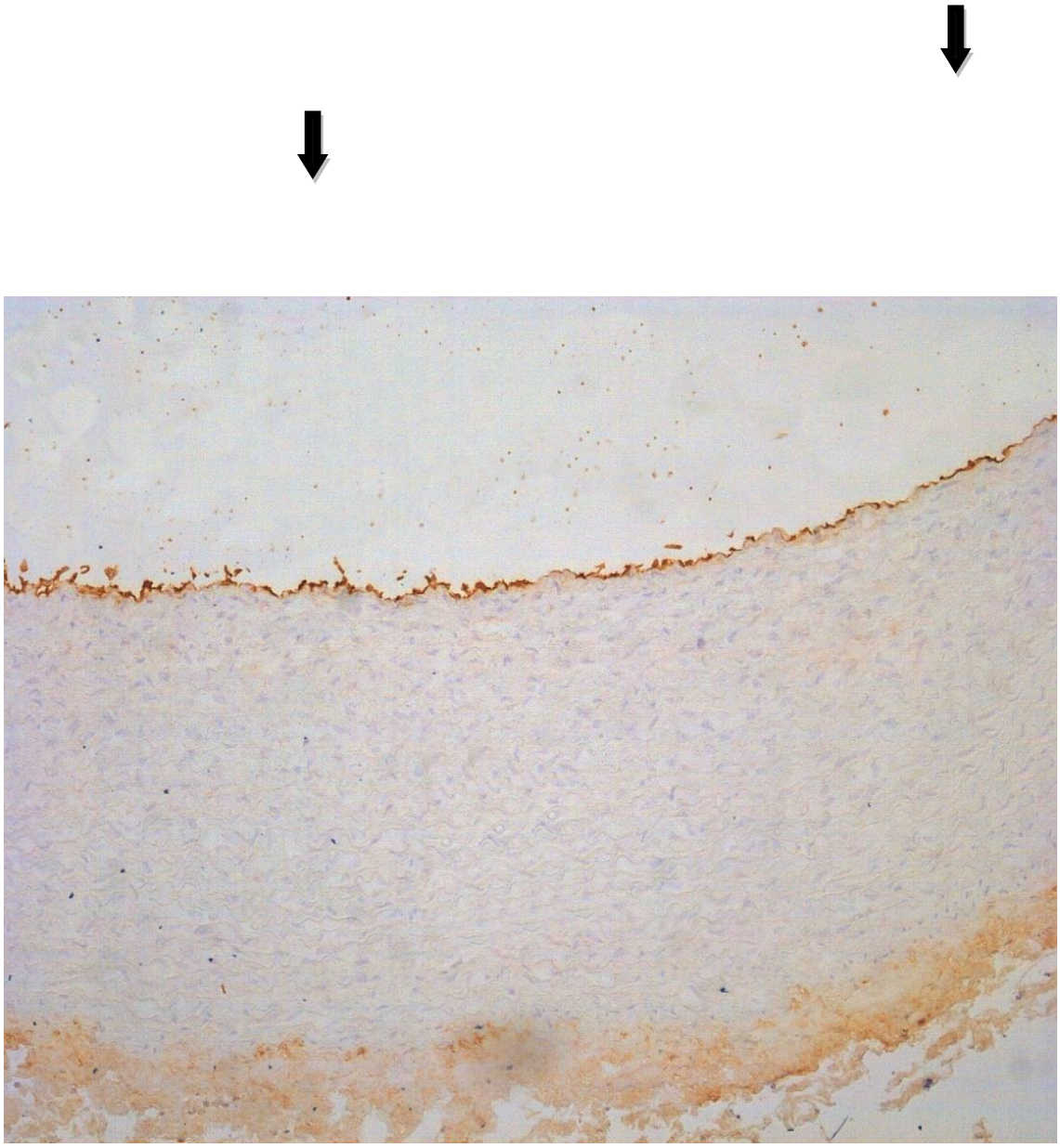
Výsledky analýzy činnosti myokardu byly hodnoceny na Farmakologickém ústavu Lékařské fakulty v Hradci Králové, kde byla prokázána indukce závažné kardiomyopatie po podání daunorubicinu.

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

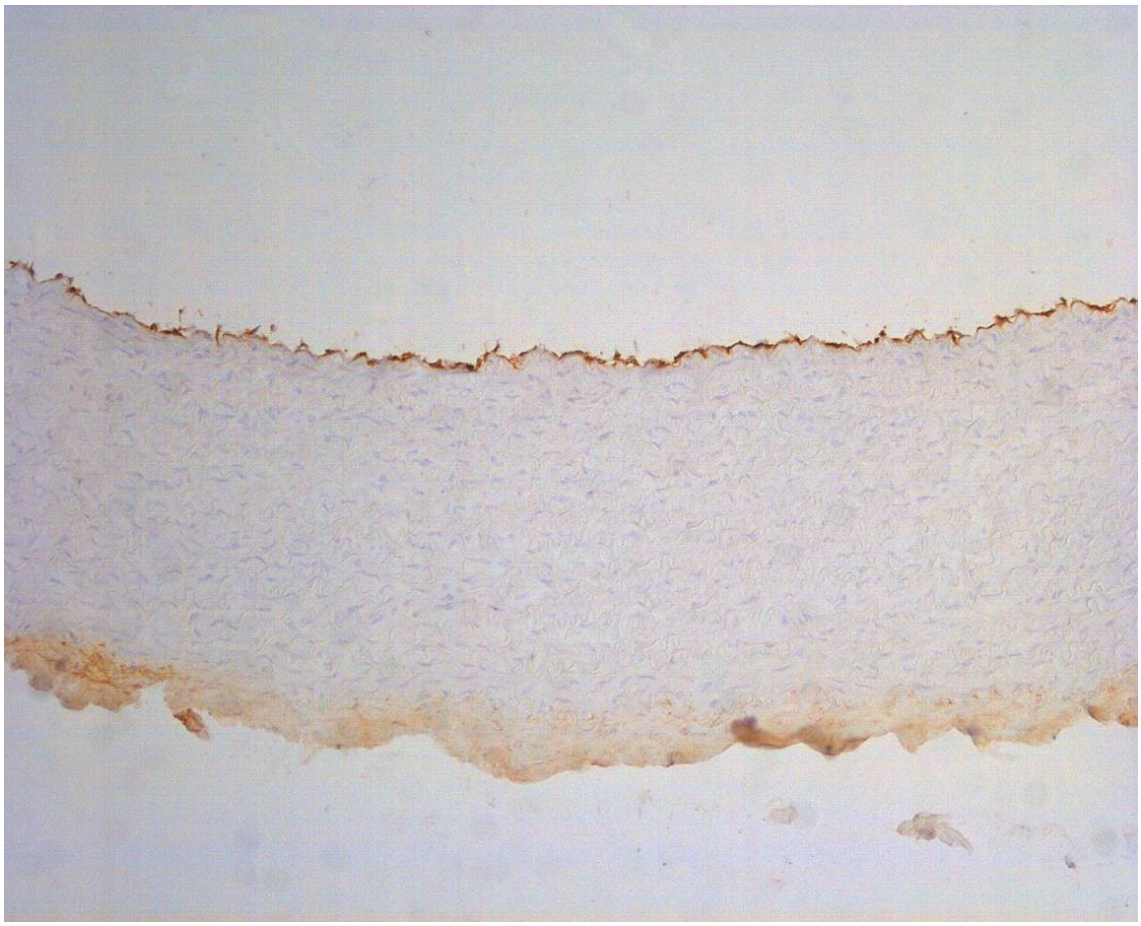
Imunohistochemické barvení v oblasti aortálního oblouku

Stěna cévy nevykazovala žádné známky patologie. Imunohistochemická analýza prokázala silnou expresi PECAM-1 téměř po celém lumen cévy bez ohledu na skupinu králíků (viz. Obr. 4, 5). Tyto výsledky potvrzují použití PECAM-1 jako markeru cévního endotelu. Detekce nitrotyrosinu byla prokázána u „pozitivní kontroly“, což bylo zvíře krmené 2 měsíce cholesterolovou dietou s obsahem 0.4% cholesterolu (viz. Obr. 6). Naproti tomu exprese nitrotyrosinu byla nalezena pouze u jednoho zvířete z daunorubicinových skupin (obrázek neuveden). Tato pozitivní reakce byla ovšem zcela výjimečná a nebyla pozorována u žádného jiného zvířete z daunorubicinové (viz Obr. 8), či kontrolní skupiny (viz. Obr. 7).

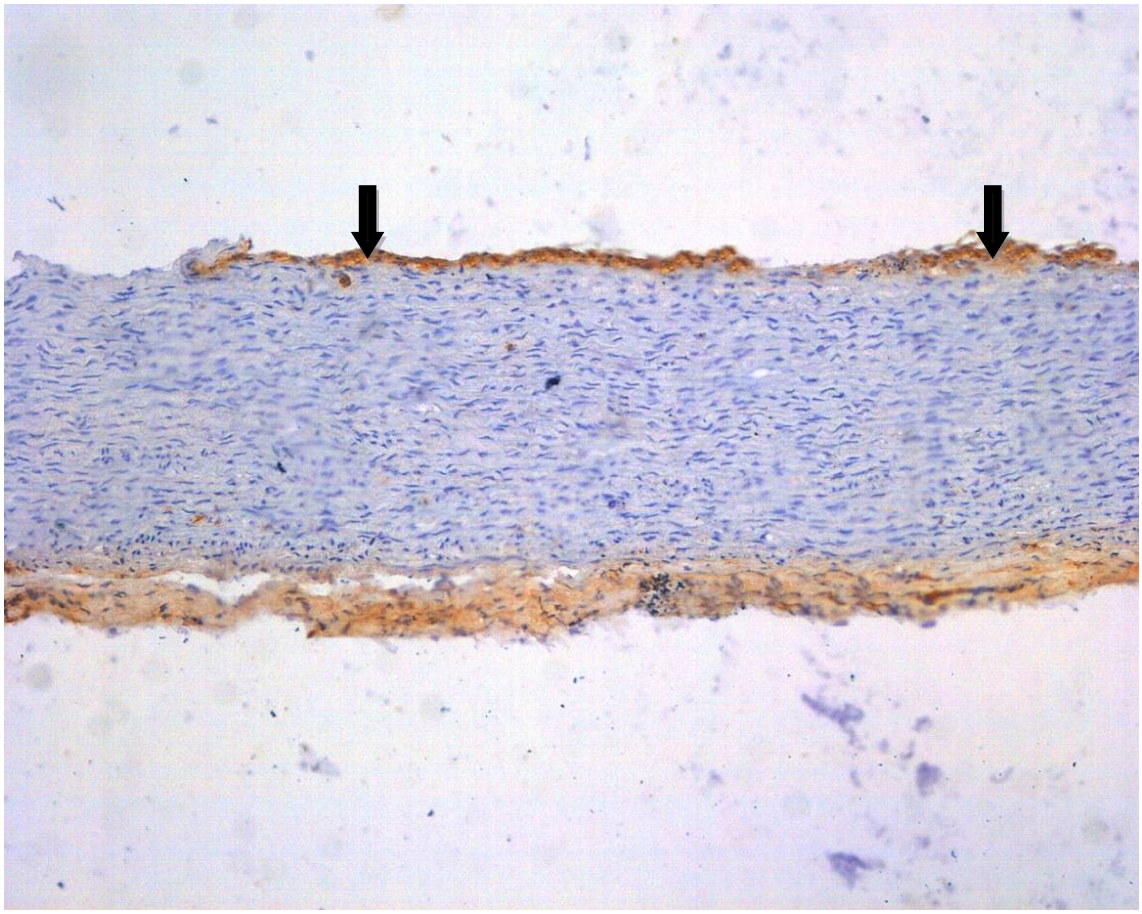
Obrázek 4. Endoteliální exprese PECAM-1 u kontrolní skupiny zvířat. Exprese byla pozorována u všech zvířat po celém lumen cévy. Šipky ukazují na hnědou barvu, která je důkazem detekce PECAM-1 exprese. Zvětšení 100x.



Obrázek 5. 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.

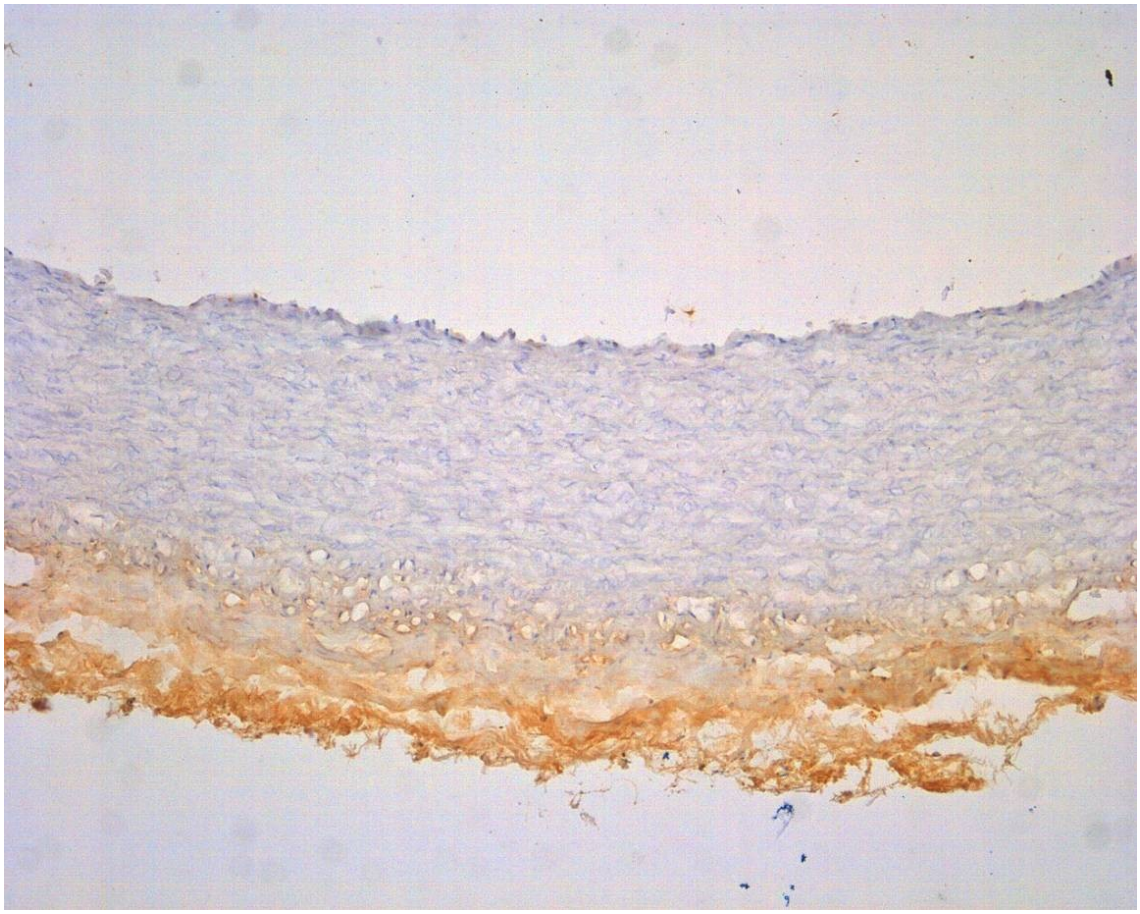


Obrázek 6. Exprese nitrotyrosinu u „pozitivní kontroly“, zvířete s přítomností tzv. lipidního proužkování (šipky). Zvětšení 100x.

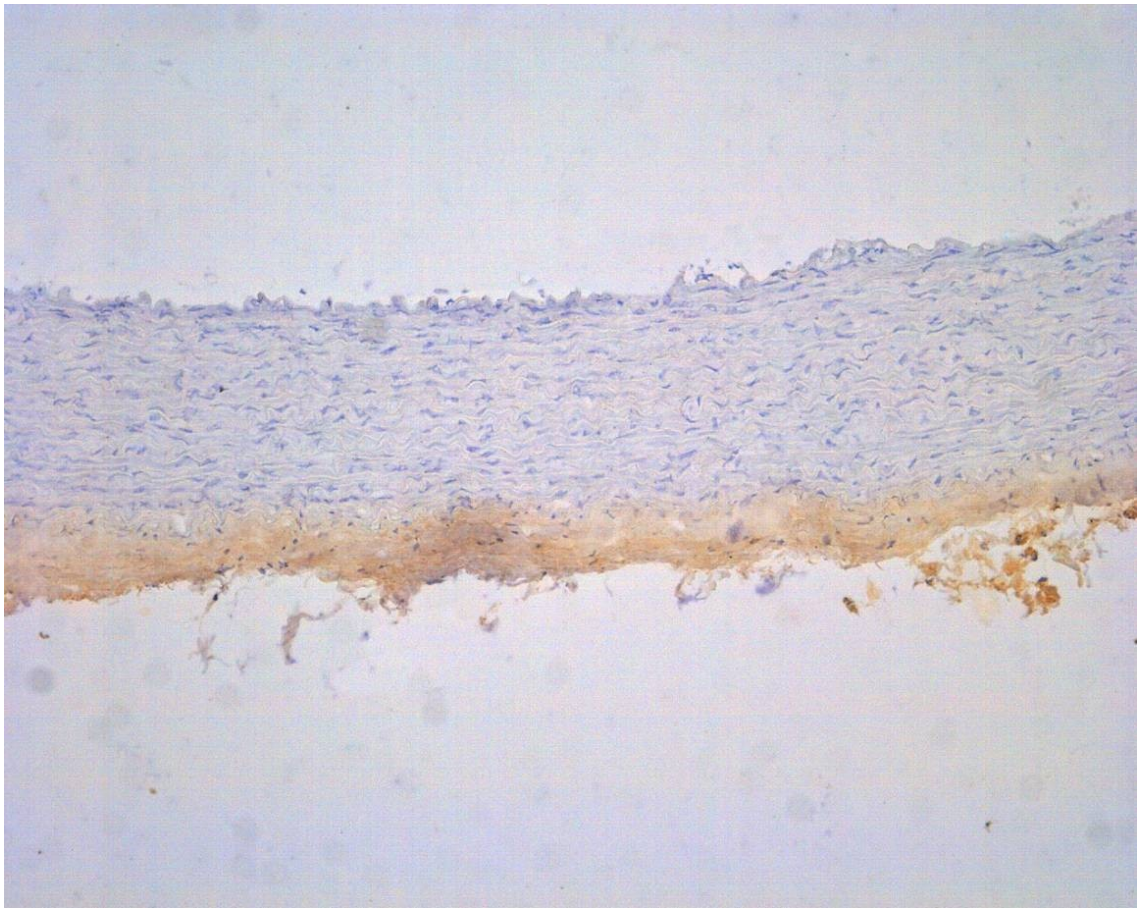


Obrázek 7. Endoteliální exprese nitrotyrosinu u kontrolní skupiny zvířat. Exprese

nitrotyrosinu nebyla pozorována u žádného zvířete z kontrolní skupiny. Zvětšení 100x.



Obrázek 8. Endoteliální exprese nitrotyrosinu u daunorubicinové skupiny zvířat. Exprese nitrotyrosinu nebyla pozorována u žádného zvířete z daunorubicinové skupiny. Zvětšení 100x.



7 DISKUSE

Antracyklinová antibiotika patří mezi jedny z nejčastěji užívaných cytostatik. Již na začátku 60-tých let byl z hub Streptomyces peucetilus a Streptomyces ceruleorubidus izolován daunorubicin (též zvaný daunomycin, rubidomycin) a vzápětí i dosud nejvýznamnější antracyklinový derivát – doxorubicin (adriamycin). 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 [19].

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. V preklinických experimentech byla u hlodavců a králíků zaznamenána poměrně výrazná nefrotoxicita antracyklinů. Ačkoliv podstata tohoto jevu nebyla dosud vysvětlena, některé práce dokumentují podíl ROS na tomto druhu toxicity. Tomu by též nasvědčoval protektivní účinek dexrazoxanu nejen vůči kardiotoxickým, ale i nefrotoxickým účinkům antracyklinů [20]. Nejznámějším nežádoucím účinkem je však zřejmě kardiotoxicita antracyklínů. První zmínky o kardiotoxickém působení antracyklinů se objevily již krátce po jejich zavedení do klinické praxe [21]. Vzhledem k nástupu a charakteru klinických projevů lze rozdělit antracyklinovou kardiotoxicitu na akutní, subakutní, chronickou a pozdní [22]. Kardiotoxicita antracyklinů se ukázala být významným omezením jejich klinického užití, a proto je možnost redukce tohoto závažného nežádoucího účinku intenzivně studována. Jedním z mechanizmů, 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 [23].

Kromě indukce oxidačního stresu se v kardiotoxicitě antracyklinů uplatňuje také tzv. nitrační stres. Za indukci nitračního stresu je obecně zodpovědná vysoká produkce NO zejména díky zvýšené aktivitě iNOS. Takto vzniklý NO poté reaguje se

superoxidem za vzniku peroxynitritu [24]. Mezi enzymy, které se podílejí na rozvoji zánětlivých onemocnění patří také nitrotyrosin. Nitrotyrosin je markerem společného působení reaktivních substancí kyslíku a dusíku v organismu, proto se stal běžně používaným indikátorem radikálového poškození tkání. Vzniká nitrací volného nebo v proteinu vázaného tyrosinu, in vivo se na jeho vzniku podílí nejpravděpodobněji peroxynitrit a myeloperoxidáza. Koncentrace nitrotyrosinu jsou zvýšeny u jedinců, u kterých se rozvíjí ateroskleróza [25]. Kromě některých studií, které popsaly indukci zánětu v cévách v souvislosti s podáváním antracyklinů, indukce nitračního stresu v extrakardiálních cévách nebyla popsána. Proto jsme se v této rigorózní práci chtěli detekovat změny endoteliální exprese markeru nitrace proteinů nitrotyrosinu ve stěně aortálního oblouku králíků, kterým bylo podáváno antracyklínové cytostatikum daunorubicin. Sledovali jsme případné změny exprese nitrotyrosinu po různých dávkových intervalech podávání daunorubicinu.

Výsledky imunohistochemické analýzy však neprokázaly indukci exprese nitrotyrosinu v aortě ani u kontrolní ani u žádné z antracyklinových skupin. Tyto výsledky jsou v současnosti v souladu s dalšími výsledky, ve kterých zatím nebyla prokázána exprese markerů zánětu ani oxidačního stresu v aortě.

Lze tedy konstatovat, že daunorubicin zřejmě neindukuje morfologicky detekovatelnou endoteliální dysfunkci v aortálním oblouku králíka u modelu antracyklínové cardiotoxicity a ukazuje na větší obrannou schopnost endoteliálních buněk ve srovnání s kardiomyocyty.

8 ZÁVĚR

Tato rigorózní práce 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 markeru nitračního stresu nitrotyrosinu ani u kontrolní a ani u žádné z daunorubicinových skupin.

Lze tedy konstatovat, že daunorubicin zřejmě neindukuje morfologicky detekovatelnou endoteliální dysfunkci v aortálním oblouku králíka u modelu antracyklínové kardiotoxicity a ukazuje na větší obrannou schopnost endoteliálních buněk ve srovnání s kardiomyocyty.

9 SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ

[27] Arteries, dostupné z www:
http://www.teachpe.com/anatomy/arteries.php

[28] Antracykliny, dostupné z www:
http://en.wikipedia.org/wiki