

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd



Imunohistochemická detekce endoteliální dysfunkce u hypertenzních potkanů.

Immunohistochemical detection of endothelial dysfunction in hypertensive rats.

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce
Hradec Králové 2011

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.
Šárka Zajícová

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

Datum:

Podpis:

„Ráda bych poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a za příjemnou spolupráci při sestavování mé bakalářské práce. Děkuji také mé rodině a přátelům za podporu a povzbuzení.“

Abstrakt

Šárka Zajícová

Imunohistochemická detekce endoteliální dysfunkce u hypertenzních potkanů

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci králové

Zdravotní laborant

Cíl práce: Sledovali jsme expresi endoteliální NO syntázy v pravé femorální artérii u spontánně hypertenzních potkanů a normotenzních WKY potkanů po podávání léčiva sunitinibu.

Metody: Použili jsme samce SHR a WKY potkanů. Každý tento kmen potkanů byl rozdělen na dvě skupiny, z nichž jedné se podávalo léčivo sunitinib a druhé voda (kontrola). U SHR potkanů bylo léčivo podáváno ve schématu 8 týdnů/5 dnů pauza/8 týdnů. U WKY potkanů bylo schéma podávání sunitinibu 8 týdnů/5 dnů pauza/2 týdny. Byla provedena imunohistochemická analýza odebraných pravých femorálních artérií pomocí metody En Vision s detekcí pomocí DAB.

Výsledky: Imunohistochemická analýza ukázala expresi eNOS pouze v lumen endotelových buněk. Léčba sunitinibem neměla vliv na expresi eNOS v pravé femorální tepně u SHR potkanů. Naopak léčba sunitinibem snížila expresi eNOS u normotenzních WKY potkanů.

Závěr: Léčba sunitinibem nevyvolala imunohistochemicky zjistitelnou endoteliální dysfunkci zastoupenou změnami exprese eNOS v pravé femorální tepně u hypertenzních a normotenzních potkanů. Jedná se o pilotní studii, ve které je v plánu do budoucna vyzkoušet i jiné markery, které by měly popisovat účinky sunitinibu v cévní stěně.

Abstract

Šárka Zajícová

Immunohistochemical detection of endothelial dysfunction in hypertensive rats

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Medical Laboratory Technician

Background: We observed the expression of endothelial eNOS synthase in right femoral artery in the spontaneously hypertensive rats and normotensive WKY rats after Sunitinib treatment.

Methods: We used the male SHR and WKY rats. Each strain of the rats were divided into two groups, one of which received sunitinib and second just water (control). Both SHR and WKY rats were treated in with following design 8 weeks/5 days pause/8 weeks. . Immunohistochemical analysis was performed in right femoral artery by means of En Vision method with DAB detection.

Results: Immunohistochemical analysis showed the expression eNOS only in luminal endothelial cells. Sunitinib treatment did not affect the expression of eNOS in right femoral artery in SHR rats. On the contrary sunitinib treatment decreased the expression of eNOS in normotensive WKY rats.

Conclusions: Sunitinib treatment did not induce immunohistochemically detectable endothelial dysfunction represented by changes of eNOS expression in right femoral artery in hypertensive and normotensive rats. It is an experimental study in which it is plan to test other markers in the future which should describe effects of sunitinib in the vessel wall.

Obsah

1	ÚVOD	8
2	MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV	9
2.1	Obecná struktura cév	9
2.2	Kapiláry	10
2.3	Vény	11
2.4	Artérie	12
3	HYPERTENZE	13
3.1	Etiopatogeneze	13
3.1.1	Exogenní faktory	14
3.1.2	Endogenní faktory	15
3.2	Patofyziologie	16
3.2.1	Srdeční výdej a periferní cévní rezistence	17
3.2.2	Sympatický nervový systém.....	17
3.2.3	Systém renin-angiotensin-aldosteron	17
3.2.4	Faktory produkované endoteliálními buňkami.....	18
3.3	Následky hypertenze	18
3.3.1	Hypertrofie levé komory srdeční.....	19
3.3.2	Chronické srdeční selhání.....	19
3.3.3	Ischemická choroba srdeční	19
3.3.4	Cévní mozková příhoda.....	20
4	SHR POTKANI	21
5	ENDOTELIÁLNÍ NO SYNTÁZA	22
6	SUNITINIB	23
6.1	Sunitinib a hypertenze	25
7	CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE	27
8	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28

8.1	Použitá zvířata	28
8.2	Imunohistochemie	28
8.3	Statistická analýza	29
9	VÝSLEDKY	30
9.1	Imunohistochemické barvení eNOS v pravé femorální tepně	30
9.2	Stereologická analýza exprese eNOS v pravé femorální tepně	35
10	DISKUSE.....	36
11	ZÁVĚR	39
12	SEZNAM ZKRATEK	40
13	CITOVANÁ LITERATURA.....	41
14	Seznam obrázků.....	45
15	Seznam grafů	45

1 ÚVOD

Hypertenze neboli vysoký krevní tlak je multifaktoriální onemocnění a je známo mnoho faktorů, které mohou způsobit zvýšení krevního tlaku (1). Jedná se o výsledek vzájemné interakce genetických mechanismů, faktorů vnějšího prostředí a poruch endogenních regulačních procesů (2) (3). Vysoký krevní tlak patří v dnešní době k nejčastějším poruchám zdravotního stavu populace po celém světě. V časných stádiích se nemusí projevovat žádnými varovnými příznaky, a tudíž velmi často zůstane nerozpoznán. Její komplikace ale poté patří mezi významné příčiny úmrtí a invalidity (1).

Hypertenze patří vedle ischemické choroby srdeční k nejčastěji se vyskytujícím kardiovaskulárním onemocněním. Spolu s hyperlipoproteinémií, obezitou a kouřením je i jedním z nejzávažnějších rizikových faktorů ischemické choroby srdeční (4). Hypertenze je i rizikovým faktorem aterosklerózy, zvyšuje riziko vzniku cévních onemocnění mozku, srdečního selhání a komplikace onemocnění ledvin (1). Riziko cévních mozkových i koronárních příhod roste s výší krevního tlaku (5).

Pro svůj vysoký výskyt v dospělé populaci v průmyslově vyspělých zemích (20 - 30 %) představuje závažný zdravotní problém (2). Odhaduje se, že v České republice trpí hypertenzí 1 milion osob. Výskyt hypertenze stoupá s věkem a závisí také na pohlaví. Do 50 let je vysoký krevní tlak častější u mužů, po klimakteriu u žen výskyt hypertenze prudce stoupá (4).

Výška krevního tlaku je v asociaci s mnoha faktory: věk, pohlaví, národ a rasa, faktory vnějšího prostředí, intrauterinní prostředí a prenatální období. Zvýšení krevního tlaku souvisí se způsobem života, změnou tělesné hmotnosti, nadměrnou spotřebou alkoholu, malou tělesnou aktivitou a vysokou spotřebou NaCl. Všechny tyto faktory jsou ovlivnitelné v rámci primární prevence hypertenze u každého jedince v celé populaci (6)

V posledních 35 letech nastal velký pokrok v léčbě hypertenze. Objev účinných antihypertenziv je velkým posunem vpřed a vede ke změně prognózy hypertenze, protože neléčená hypertenze snižovala délku života (1) (2). V dnešní době existuje celá řada možností, jak nepříznivé dopady hypertenze odstranit nebo alespoň snížit (7).

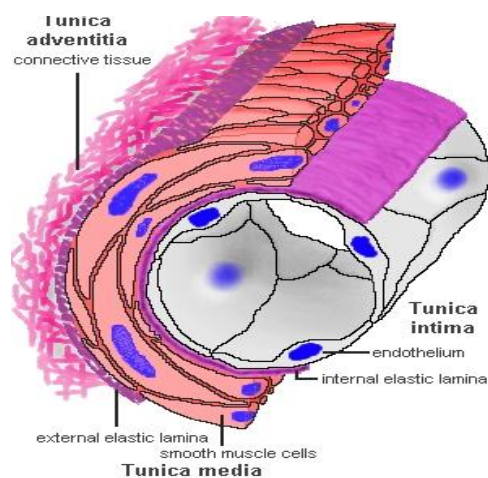
2 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

Krevní cévy se dělí podle funkce na arterie, vény a kapiláry a v lidském těle obstarávají cirkulaci krve vzájemným propojením tepen a žil pomocí krevních kapilár (8) (9).

2.1 Obecná struktura cév

Krevní cévy dělíme podle typu a velikosti. Stěnu cévy tvoří tři vrstvy neboli tuniky (10).

Obrázek 1: Stěna cévy



<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Vascular/Vascular.htm> (26. 3. 2011)

Tunica intima je nejnvnitřnější vrstva, která je tvořena vrstvou endotelových buněk (endotel) a subendotelovou vazivovou tkání. Endotel ohraničuje vnitřní povrch cévy a je tvořený jednovrstevným dlaždicovitým epitelem (10) (11). „Jednou z hlavních funkcí endotelu je zábrana srážení krve na jeho povrchu (9).“ Subendotelovou vrstvu tvoří řídké kolagenní vazivo a může obsahovat i hladké svalové buňky. Kapiláry jsou složeny pouze z endotelové vrstvy. V artériích je tunica intima od tunica media oddělená fenestrovanou vrstvou elastinu (membrána elastica interna) (10) (11).

Tunica media je střední vrstva, která je tvořena hladkými svalovými buňkami a pojivovou složkou. Pojivovou tkáň vytváří kolagenní a elastická vlákna. „Vzájemný poměr jednotlivých složek závisí na typu cévy (12).“ Elastická vlákna vytvářejí jemné sítě, ve kterých jsou vytvořené otvory (fenestrae), které umožní, že živiny mohou pronikat do hlubších partií stěny cév. Elastické struktury se mohou koncentrovat na hranicích tunica media a vytvářejí membrana elastica interna a membrana elastica externa, které oddělují tunica media od tunica intima i od tunica adventitia (8) (10) (11).

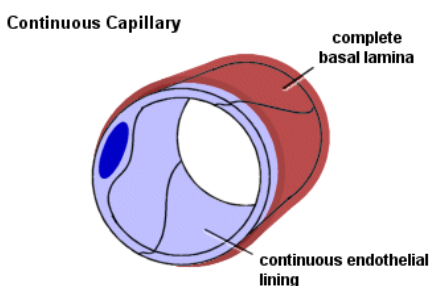
Tunica adventitia představuje vnější vrstvu, která připojuje cévu k okolním tkáním. Je tvořena kolagenovými vlákny typu I a elastickými vlákny. Ve velkých vénách může obsahovat hladké svalové buňky. Ve všech velkých cévách obsahuje tunica adventitia malé krevní cévy (vasa vasorum), které přivádí buňkám cévní stěny kyslík a živiny (10).

2.2 Kapiláry

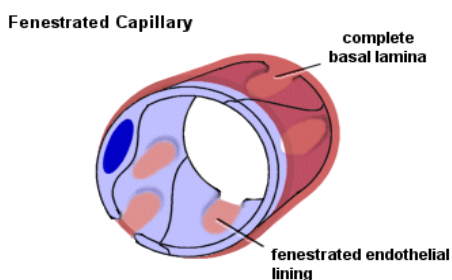
Kapiláry jsou nejmenší cévy tvořené jednou vrstvou plochého epitelu (endotelu). Průměr krevní kapiláry je 7 – 9 μm . Její stěna je tvořena jednou nebo více endotelovými buňkami. Buňky jsou navzájem spojeny mezibuněčnými spoji, které zahrnují zonulae occludentes a nexy. Ve výběžcích endotelových buněk se objevují pinocytotické vezikuly, které zajišťují transcelulární transport různých látek. Počet těchto vezikul je odrazem intenzity transportu makromolekul endotelovou buňkou. Další buňkou kapilár kromě endotelových buněk jsou pericyty, což jsou buňky s dlouhými cytoplazmatickými výběžky, kterými částečně obklopují endotelové buňky a tím přiléhají k povrchu kapiláry. Každý pericyt je obklopen svou vlastní bazální laminou. Tyto buňky představují první známku vývoje tunica media, protože ve své cytoplazmě obsahují aktin, myozin a tropomyozin, které způsobují schopnost kontrakce pericytu (10) (11).

Klasifikace kapilár podle struktury stěny a charakteru bazální laminy:

Obrázek 2: Kapilára se souvislou výstelkou.



Obrázek 3: Fenestrovaná kapilára

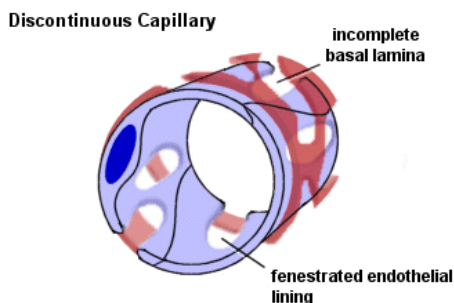


Kapiláry se souvislou výstelkou jsou lemovány vrstvou endotelových buněk, které se navzájem těsně spojují a leží na kontinuální bazální lamině. Tento typ se nachází ve svalech, v mozku a v periferních nervech.

Fenestrované kapiláry mají vrstvu endotelových buněk s vytvořenými fenestracemi (otvory o průměru 60 - 80 nm), které jsou přepažené diafragmou. Diafragma omezuje velikost makromolekul, které tudy procházejí. Endotelové buňky leží na kontinuální bazální lamině. Výskyt těchto kapilár je v orgánech, kde dochází k rychlé výměně látek mezi tkáněmi a krví. K těmto

orgánům patří střevo, ledviny a žlázy s vnitřní sekrecí (10) (11).

Obrázek 4: Kapilára s póry.



Obr. 2-4:

<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Vascular/Vascular.htm> (26. 3. 2011)

Kapiláry s póry jsou vystlány endotelovými buňkami, které mají vytvořené otvory (póry), které nejsou přepažené diafragmou. Endotelové buňky leží na kontinuální bazální lamině. Tento typ kapilár se nachází v glomerulech ledvin (11).

Sinusoidní kapiláry mají nepravidelně široké lumen a ve vrstvě endotelových buněk se nacházejí póry i fenestrace. Bazální lamina sinusoidních kapilár není kontinuální. Mezi endotelovými buňkami se mohou vyskytovat fagocytující buňky. Tento typ kapilár se nachází v játrech a v kostní dřeni (10) (11).

2.3 Vény

Vény (žíly) jsou trubicovité útvary rozličného průměru s variabilním složením stěny podle polohy žíly v těle (8). Podle jejich průměru je dělíme na venuly, malé, střední a velké vény. Nejtlustší vrstvou stěny u vén je tunica adventitia (11).

Venuly jsou nejmenšími zástupci cév o průměru 0,2 – 1 mm a představují sběrný systém krve z kapilár. Tunica intima je tvořená endotelovými buňkami. Tunica media je velmi tenká a skládá se z malého množství vrstev hladkých svalových buněk. Tunica adventitia je nejtlustší vrstva stěny venul a tvoří ji kolagenní vazivo (8) (11).

Malé a střední vény mají průměr 1 – 9 mm. Endotel vytváří chlopně, což jsou párové kapsevité výchlípky tvořené elastickou vazivovou tkání. Chlopně usměřňují tok krve směrem k srdci. Tunica media je slabší vrstvou oproti artériím a obsahuje pouze ploché svazečky hladkých svalových buněk. Mezi hladkými svalovými buňkami se nachází četná kolagenní vlákna a málo elastických vláken. Tunica adventitia je dobře vyvinutá s četným obsahem kolagenních vláken. Mohou se tu vyskytovat i hladké svalové buňky (11).

Velké vény mají dobře vyvinutou endotelovou a subendotelovou vrstvu. Tunica media je tenká a obsahuje jen několik vrstviček hladkých svalových buněk a četnou vazivovou tkáň. Tunica adventitia představuje nejsilnější vrstvu stěny velkých vén a obsahuje hladké svalové buňky (11).

2.4 Artérie

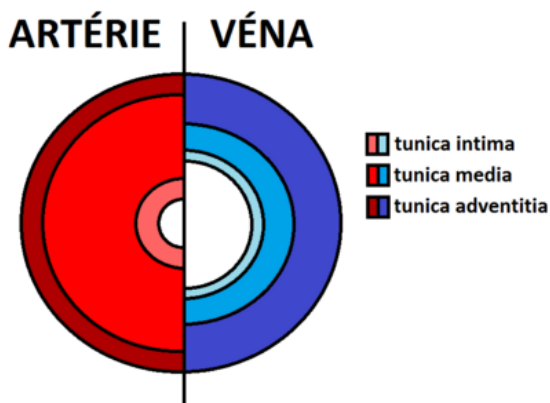
Artérie (tepny) mají tlustší tunica media než žíly a dělíme je podle průměru a histologického uspořádání jejich stěn na arterioly, artérie svalového typu (a. malého a středního průměru) a artérie elastického typu (a. velkého průměru) (8) (10) (11).

Arterioly jsou cévy s průměrem menším než 0,5 mm a s velmi tlustou stěnou. Tunica intima je tvořená vrstvou endotelových buněk, velmi tenkou vrstvou subendotelových buněk a membrana elastica interna v menších arteriolách chybí. Tunica media se skládá z jedné až pěti vrstev hladkých svalových buněk, které obkružují lumen cévy. Tunica adventitia je velmi tenká a je složená z kolagenních vláken (10) (11).

Artérie svalového typu mají vzhledem ke svému průsvitu poměrně tlustou stěnu a zajišťují distribuci krve k jednotlivým orgánům. Tunica intima se skládá z endotelu, subendotelové vrstvy a dobře vyvinuté membrana elastica interna. Tunica media je silná a v závislosti na průměru cévy obsahuje až 40 vrstev hladkých svalových buněk. Mezi hladkými svalovými buňkami se nachází různé množství elastických a kolagenních vláken a proteoglykany. Membrana elastica externa je vyvinutá pouze ve větších artériích svalového typu. Tunica adventitia je tvořená kolagenními a elastickými vlákny (11).

Artérie elastického typu mají v poměru k velikosti průsvitu poměrně tenkou stěnu a zajišťují kontinuální tok krve v průběhu diastoly srdce (např. aorta). Tunica intima je tlustší oproti artériím svalového typu a skládá se z vrstvy endotelových buněk a tlusté subendotelové vrstvy. Membrana elastica interna se nedá odlišit od ostatních elastických blanek, které se vyskytují v tunica media. Tunica media je nejsilnější vrstvou stěny a vyskytují se v ní, kromě elastických vláken, také hladké svalové buňky, retikulární vlákna a proteoglykany. Membrana elastica externa u artérií elastického typu není vyvinutá. Tunica adventitia je tenká a obsahuje elastická a kolagenní vlákna (11) (12).

Obrázek 5: Porovnání struktury arterie a veny.



<http://www.wikiskripta.eu/index.php/C%C3%A9vy>
(4. 4. 2011)

3 HYPERTENZE

Vysoký krevní tlak je podle kritérií WHO/ISH¹ (World Health Organisation/ International Society of Hypertension) definován hodnotami krevního tlaku rovnými nebo vyššími než 140/90 mm Hg, které jsou zjištěny opakovaně, tj. alespoň 2 z 3 na sobě časově nezávislých měřeních (1). Podle Evropské společnosti pro hypertenzi a Evropské kardiologické společnosti můžeme hypertenzi klasifikovat do několika kategorií:

Tabulka 1: Klasifikace hypertenze podle Evropské společnosti pro hypertenzi a Evropské kardiologické společnosti (2).

Kategorie	Systolický TK (mm Hg)	Diastolický TK (mm Hg)
Optimum	< 120	< 80
Normální TK	120 – 129	80 – 84
Vysoký normální TK	130 – 139	85 – 89
Mírná hypertenze	140 – 159	90 – 99
Středně těžká hypertenze	160 – 179	100 – 109
Těžká hypertenze	≥ 180	≥ 110
Izolovaná systolická hypertenze	≥ 140 a více	< 90

3.1 Etiopatogeneze

Hypertenzi dělíme podle etiopatogeneze na primární (esenciální), kde neznáme vlastní vyvolávající příčinu (90 – 95 % nemocných) a sekundární (symptomatickou), kde zvýšení krevního tlaku vzniká v důsledku známé příčiny (patologického stavu). Mezi tyto příčiny se řadí renální hypertenze, endokrinní hypertenze, hypertenze v těhotenství, renovaskulární hypertenze, zúžení průsvitu aorty, hypertenze vyvolaná podáním léku, atd. (2) (13).

Krevní tlak je udržován interakcí dvou základních mechanismů – minutového srdečního výdeje a periferní cévní rezistence (13). Pokud dojde ke zvýšení obou dějů, tak

¹ WHO – Světová zdravotnická organizace
ISH – Mezinárodní společnost pro hypertenzi

byl prokázán nárůst krevního tlaku (14). Oba mechanismy jsou ovlivňovány řadou endogenních i exogenních vlivů (13).

3.1.1 Exogenní faktory

Genetické faktory

Hypertenze je onemocnění, u kterého je důležitá interakce několika genů a životního prostředí (1). Celkový podíl genetických faktorů na vzniku esenciální hypertenze se odhaduje asi na 30 % (4). Mezi geny ovlivňující vznik vysokého krevního tlaku se zahrnují geny pro různé složky systému renin – angiotensin - aldosteron, geny systému kalikrein - kinin a geny sympatického nervového systému. Bylo zjištěno, že tato choroba má často familiární charakter (1).

Kouření

Nebyla prokázána přímá souvislost mezi kouřením a vysokým krevním tlakem, ale není pochyb o negativním vlivu kouření na ischemickou chorobu srdeční. Byl prokázán i bezprostřední vzestup krevního tlaku po vykouření cigarety (1).

Zvýšená tělesná hmotnost

Veškeré studie zabývající se vztahem tělesné hmotnosti a krevního tlaku prokázaly pozitivitu vzniku hypertenze (4). Zvýšení tělesné hmotnosti je jeden z nejvíce rizikových faktorů arteriální hypertenze. Nemusí to být pravidlem, protože existuje mnoho obézních osob, které mají hodnoty krevního tlaku normální (1).

Kuchyňská sůl

Pokud spotřeba kuchyňské soli (přívod sodíku) přesahuje potřebu organismu, tak se stává jedním z faktorů, které působí na zvýšení krevního tlaku. Každý jedinec může být jinak rezistentní na přísun sodíku. Vedle zvýšeného přívodu sodíku se uplatňuje i snížená schopnost eliminace sodíku ledvinami (1) (2).

Alkohol

Nadměrná spotřeba alkoholu je u některých jedinců dávana do souvislosti s vysokým krevním tlakem. Účinek alkoholu na systémový krevní tlak je spojován s objemovým efektem a s působením na sympatický nervový systém a jeho aktivaci (1).

Stres

Stres se účastní na vzniku hypertenze, ale jeho průkaz v pozdějších stádiích hypertenze je obtížnější. Svými mechanismy vede ke zvýšení krevního tlaku a tepové frekvence i u zdravých lidí. U osob s genetickou predispozicí je výraznější a trvá déle. Stresová reakce se účastní geneze hypertenze, ale její průkaz v pozdějších stádiích je obtížnější (4).

3.1.2 Endogenní faktory

Hypertenze je stav, který je charakterizován poruchou rovnováhy presorických a depresorických mechanismů (4). Presorické působky stimulačně působí na hypertrofii cévní stěny a levé komory srdeční. U depresorických látek je tomu naopak (13).

Presorické vlivy

Mezi presorické vlivy se řadí katecholaminy (adrenalin a noradrenalin), renin-angiotensin-aldosteron systém, aldosteron a některé působky, které jsou uvolňovány endotelem cévní stěny (endotelin, tromboxan TXA₂, a další). Presorické působky mají stimulační účinek na růst svalstva cévní stěny a na myokard a zároveň vedou k zadržování sodíku a vody (1) (4).

Depresorické vlivy

Mezi depresorické vlivy patří kalikrein - kininový systém, dopamin, prostaglandin PGE₂, prostacyklin, atriální natriuretický peptid a endoteliální relaxační faktor (EDRF), který je uvolňován endotelem. Funkcí depresorických systémů je jejich dilatační působení (1). „Depresorické působky mají tlumivý vliv na růst svalstva cévní stěny a myokardu (4).“

Změny transportních mechanismů elektrolytů

Poruchy transportních mechanismů mohou vést ke zvýšení intracelulárního Na⁺ a Ca²⁺, což vede ke zvýšené citlivosti hladkého svalstva cév vůči presorickým vlivům a tím i k větší pohotovosti k vazokonstrikci a ke zvýšení krevního tlaku (1) (2).

Autokrinní a parakrinní vlivy

Systémový endokrinní účinek mají hormony, které cirkulují v krvi. Cévní endotel může měnit účinek cirkulujících působků na cévní stěnu a také uvolňovat řadu látek. Mezi

tyto látky se řadí endotelin s vazokonstrikčním působením a EDRF s výrazným dilatačním účinkem (4).

Porucha funkce autonomního nervového systému

V důsledku dysfunkce autonomního nervového systému dochází ke zvýšené aktivitě sympatického nervového systému, což vede k hyperdynamické cirkulaci. Tato cirkulace má za následek zvýšenou srdeční frekvenci s hypertenzí (1). Sympatický nervový systém je hlavním mediátorem akutních změn krevního tlaku a srdeční frekvence (2).

Ledviny

Ledviny se na regulaci tlaku krve podílí dvěma mechanismy. Jeden z nich souvisí s vylučovací funkcí ledvin, která ovlivňuje sodíkovou a objemovou homeostázu. Druhým mechanismem jsou vazoaktivní působky.

„Vztah mezi hypertenzí a renálním postižením je oboustranný.“ Renální postižení vede k hypertenzi a neléčená hypertenze zhoršuje vývoj renálního selhání (2).

Diabetes mellitus

Výskyt arteriální hypertenze má pozitivní vztah k diabetu (až 50 % nemocných) a je dvakrát vyšší než u osob, které netrpí cukrovkou. Současné působení vysokého krevního tlaku a cukrovky má za následek zvýšený výskyt aterosklerózy a tím i vyšší riziko ischemické choroby srdeční, ischemické choroby dolních končetin a cerebrovaskulárních komplikací. Počet nemocných s hypertenzí stoupá s trváním diabetu a vyskytuje se jak esenciální hypertenze, izolovaná systolická hypertenze, tak i sekundární hypertenze (při diabetické nefropatii). Vhodnou léčbou cukrovky se sníží riziko obezity, hypertenze a dyslipidemie (1).

3.2 Patofyziologie

Normální hodnoty tlaku krve jsou udržovány řadou fyziologických mechanismů. K těmto mechanismům patří srdeční výdej, periferní cévní rezistence, systém renin-angiotensin-aldosteron (RAAS), sympatický nervový systém, atriální natriuretický peptid a další faktory produkované endoteliálními buňkami. Pokud dojde pouze k malé odchylce od jednoho z těchto faktorů, může to vyvolat zvýšení tlaku krve (6).

3.2.1 Srdeční výdej a periferní cévní rezistence

Základními faktory, které ovlivňují krevní tlak, jsou srdeční výdej a periferní cévní rezistence, která souvisí s napětím hladkých svalů ve stěně malých arteriol (6) (15). Pokud dojde ke konstrikcí tohoto hladkého svalstva, tak jsou zaznamenány strukturální změny ve stěně cév a tím se zvýší periferní cévní rezistence. Změny kontrakce hladkého svalstva arteriol jsou vyvolány prostřednictvím vápenatých kanálů, které zajišťují vstup nebo výstup vápníku ze svalových buněk (6). Změřený krevní tlak je potom součinem srdečního výdeje při systémové cévní rezistenci (SVR). K mechanismům vyvolávajícím SVR patří neuro-hormonální faktory, cévní ředění a endoteliální dysfunkce spojená s poklesem tvorby oxidu dusnatého (NO) a zvýšením oxidačního stresu (15).

3.2.2 Sympatický nervový systém

Sympatický nervový systém (SNS) jako součást vegetativního nervového systému může působit jako krátkodobý i dlouhodobý regulátor tlaku krve (6) (16). SNS působí jak na vazokonstrikci, tak na vazodilataci. Pokud jsou oba děje v rovnováze, tak je udržován normální tlak krve. Při stresu, vyvolaném jak tělesnou, tak i psychickou zátěží, sympatický nervový systém způsobí jeho krátkodobé zvýšení (6). Prostřednictvím aktivace sympatických nervů v ledvinách dochází k dlouhodobé regulaci tlaku krve. Je to zapříčiněno nadměrnou aktivací těchto nervů, což vede k retenci sodíku, zvýšenému vylučování reninu a poškození tlakové natriurézy v ledvinách (16).

3.2.3 Systém renin-angiotensin-aldosteron

Systém renin-angiotensin-aldosteron (RAAS) se řadí k nejsilnějším hormonálním systémům v regulaci objemu tělesných tekutin a tlaku krve. Jeho nejdůležitější účinky při regulaci tlaku krve se uplatňují prostřednictvím angiotensinu II (ANG II) (16). ANG II je látka s vazokonstrikční aktivitou, která prostřednictvím svých 2 receptorů je schopná vyvolat řadu strukturálních změn ve stěně cév. Dochází k vazokonstrikci, vazodilataci, apoptóze, hyperplazii a hypertrofii endotelové buňky (6) (15). ANG II přes jeho receptor AT2 může vyvolat i aktivaci NO syntázy a tím tvorbu oxidu dusnatého (15). ANG II také stimuluje uvolňování aldosteronu z nadledvin, což má za následek další zvýšení tlaku krve, protože dochází k zadržování Na a H₂O (6).

3.2.4 Faktory produkované endoteliálními buňkami

V cévním endotelu vzniká řada vazoaktivních látek a jejich nerovnovážný stav vede k endoteliální dysfunkci (6). Tato dysfunkce se projevuje ztrátou schopnosti vazodilatace. Směřuje tedy k tomu, že cévy na podněty, na které zdravé cévy reagují vazodilatací, reagují vazokonstrikcí, protože je porušena rovnováha mezi vazodilatačními (NO) a vazokonstrikčními látkami (endotelin, angiotensin II) (2) (4).

Endotelin

Endotelin-1 (ET-1) je silná vazokonstrikční látka, která způsobuje vazokonstrikci a hypertenzi aktivací receptorů typu A (ETA) (16).

Oxid dusnatý

Oxid dusnatý je jedním z faktorů produkovaných endotelem a působí jako vazodilatátor. Vzniká při oxidaci aminokyseliny L-argininu na L-citrulin. Tato reakce je katalyzována pomocí enzymu NO syntázy (NOS). Vzniklý NO difunduje do sousední hladké svaloviny cév, kde způsobuje vazodilataci. Úkol NO je tedy snižovat periferní vasomotorické napětí a krevní tlak tím, že způsobí aktivní vazodilataci a zvýší centrální sympatickou vazokonstrikci (15).

Receptor pro endoteliální růstový faktor (VEGF) zvyšuje syntézu NO prostřednictvím stimulace endoteliální NO syntázy. Pokud dojde k inhibici VEGF, tak dojde ke snížené syntéze NO, zvýšené SVR a cévnímu ředění, které vede k hypertenzi (15).

3.3 Následky hypertenze

Další dělení hypertenzí souvisí s orgánovými komplikacemi a vychází z předpokladu, že orgánové postižení je přirozeným důsledkem neléčeného nebo nedostatečně léčeného vysokého krevního tlaku:

Stadium I, u kterého jde o prosté zvýšení krevního tlaku bez orgánových změn.

Stadium II, u kterého se nachází vyšší krevní tlak spolu s orgánovými změnami bez výraznější poruchy funkce postižených orgánů: hypertrofie levé komory srdeční, mikroalbuminurie, proteinurie, kalcifikace aorty nebo jiných tepen.

Stadium III, které představuje hypertenzi s těžšími orgánovými změnami s poruchou funkce těchto orgánů: levostranné srdeční selhání, cévní mozkové příhody, hypertenzní encefalopatie, renální insuficience, retinopatie až neuroretinopatie, atd. (1) (2) (13).

3.3.1 Hypertrofie levé komory srdeční

Trvalé zvýšení krevního tlaku vede k hypertrofii levé komory srdeční (zvětšení masы myokardu) (4). Jedná se o kompenzační mechanismus, při kterém dochází ke strukturální adaptaci srdce na větší dotížení při zvýšené systémové cévní rezistenci. Zvýšené napětí stěny myokardu se podílí na snížené systolické výkonnosti srdce, protože je větší spotřeba energie na rozvoj napětí, než na kontrakci, a proto se svalová vlákna méně zkracují. Na hypertrofii se může pohlížet jako na kompenzační proces, který pomáhá udržet systolickou funkci myokardu. Při vzniku hypertrofie levé komory srdeční se uplatňuje mnoho mechanismů. Patří mezi ně tlaková zátěž srdce, hemodynamická objemová zátěž, obezita, aktivita sympatiku a systému renin - angiotensin, viskozita krve (1).

Hypertrofie levé komory srdeční souvisí s vysokým rizikem vzniku náhlé smrti, infarktem myokardu, srdečním selháním, arytmií a ischemickými komplikacemi (1) (4).

3.3.2 Chronické srdeční selhání

„Srdeční selhání je stav, kdy srdeční funkce nezajistí při dostatečném žilním návratu a plicním tlaku potřebnou dodávku kyslíku periferním tkáním podle metabolických potřeb (1).“ Selhání srdce u hypertenze vzniká dvojím způsobem. Jedním z nich je vznik hypertrofie levé srdeční komory s následnou diastolickou dysfunkcí, která vede k diastolickému srdečnímu selhání. Druhý způsob vzniku srdečního selhání je systolická dysfunkce, která vede k systolickému srdečnímu selhání (2).

3.3.3 Ischemická choroba srdeční

Vysoký krevní tlak vede k většímu napětí cévní stěny, které způsobuje strukturální změny cév (remodelace). Remodelace je charakterizovaná hypertrofií tunica media a jiným uspořádáním svalových vláken medie. Tento proces podněcuje zvětšování tloušťky cévní stěny a zmenšování cévního lumen. Cévy ztrácejí schopnost vazodilatace a následně dochází ke zvyšování periferního cévního odporu. Proudění krve může zvyšovat stres

vyvolaný strukturální změnou cévní stěny a tím vyvolat poškození endotelu. V důsledku toho vzniká předpoklad ke ztluštění intimy a vzniku aterosklerotických plátů, které mohou postupně vést ke koronární nedostatečnosti (1) (4).

3.3.4 Cévní mozková příhoda

Hypertenze je hlavní rizikový faktor cévní mozkové příhody (CMP). CMP vzniká v důsledku poruchy prokrvení určité oblasti nebo celého mozku, která vede k hypoxii. Krvácení v mozku je způsobeno porušením cévní stěny chronickou arteriální hypertenzí až u 80 % případů (1).

4 SHR POTKANI

Spontánně hypertenzní potkan (SHR) spolu s Wistar Kyoto potkanem (WKY) jako normotenzní kontrolou patří k nejčastěji používaným modelům kardiovaskulárního onemocnění. SHR potkani jsou potomci mužského Wistar potkana se spontánní hypertenzí (145 - 175 mm HG) a samice se zvýšeným krevním tlakem (130 - 140 mm Hg). Jejich SHRs potomci se posléze nechávají pářit bratr X sestra a výsledkem je inbrední kmen SHR potkanů (>180 mm Hg). Hypertenze je u nich udržována zvýšenou periferní rezistencí (3) (17) (18).

Hlavní výhoda experimentálních modelů je jejich dostupnost, možnost standardizace podmínek, ve kterých probíhají pokusy a genetických vlastností použitých zvířat a také rychlost a reprodukovatelnost rozvoje hypertenze a jejích komplikací (3).

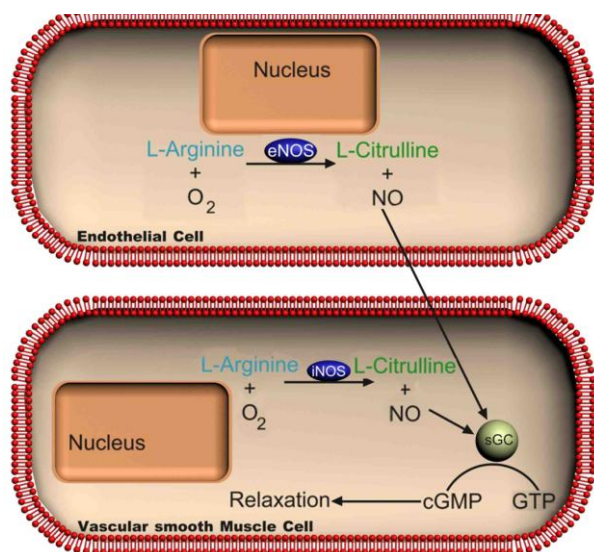
Stejně jako u lidí se hypertenze u SHR potkanů vyvíjí rychleji u mužů než u žen (17) (19). Samec SHR potkana se proto běžně používá jako model lidské hypertenze, ale může být použit pouze jako jedna z možných příčin lidské hypertenze. Lidskou hypertenzi je obtížné studovat, protože existují značné individuální rozdíly ve dvou spouštěcích prvcích hypertenze, kterými jsou polygenetická predispozice a vnější faktory životního prostředí (17) (20). I přesto jsou principy uplatňující se v patogenezi hypertenze u lidí a potkanů velmi podobné (3).

5 ENDOTELIÁLNÍ NO SYNTÁZA

Endoteliální NO syntáza (eNOS) je enzym, jehož exprese je modifikována v mnoha typech kardiovaskulárních chorob, ke kterým patří ateroskleróza, cukrovka a hypertenze. NOS spolupracuje s chaperonem proti proteinu tepelného šoku 90 (hsp90). Chaperon je důležitý pro správné složení a funkci enzymu (21).

Endoteliální NOS přispívá k normální regulaci vazomotorického napětí krevního tlaku (regulaci napětí cévní stěny) (15) (22). V cévním endotelu katalyzuje přeměnu L-argininu na NO, který posléze difunduje do hladké svaloviny cév, kde aktivuje enzym rozpustnou guanylátcyklázu (sGC), která katalyzuje přeměnu guanozintrifosfátu (GTP) na cyklický guanozinmonofosfát (cGMP). cGMP jako druhý posel posléze spouští řadu buněčných odpovědí, které vedou k uvolnění svalů (vazodilataci) (15). Jedna buněčná odpověď může být např. snížení intracelulární hladiny kalcia (22). sGC, eNOS a hsp90 existují jako trimerní komplexy v aortálních endoteliálních buňkách skotu.

Obrázek 6: Vznik NO a jeho účinek v hladké svalovině.



<http://www.editorialmanager.com/acd/download.aspx?id=44257&guid=0f13f7be-9059-43f7-9115-b6facd7a0849&scheme=1> (4. 4. 2011)

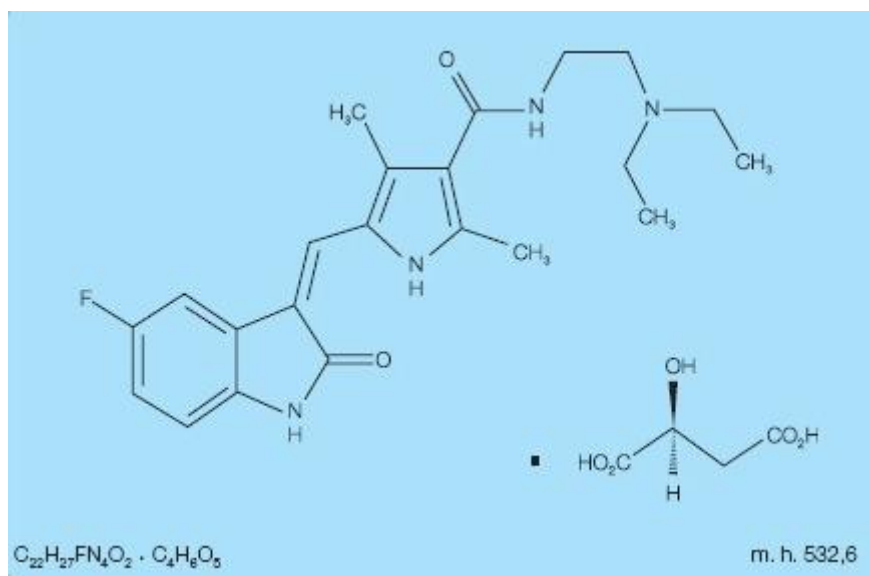
Regulace endoteliální NOS je dosaženo prostřednictvím protein-protein interakcí eNOS s proteinem tepelného šoku (hsp90) a caveolin-1 a mnoho dalších (21). NO a další endogenní vazodilátátoři, kteří jsou v endotelu syntetizováni NO syntázou, inhibují růst související s odpovědí na poškození endotelových buněk hypertenzí. Aktivita NOS je důsledkem a ne příčinou hypertenze (15).

Hypertenze je jedním z rizikových faktorů, která tlumí syntézu NO (22).

6 SUNITINIB

Sunitinib je nízkomolekulární inhibitor receptorů tyrozinkináz, který se vyskytuje ve formě soli jako sunitinib malát. Jedná se o protinádorové léčivo, které se řadí mezi tzv. malé molekuly. Jeho účinek byl prokázán v léčbě renálního buněčného karcinomu (RCC) a gastrointestinálního stromálního tumoru (GIST) (23) (24).

Obrázek 7: Chemický vzorec sunitinibu.

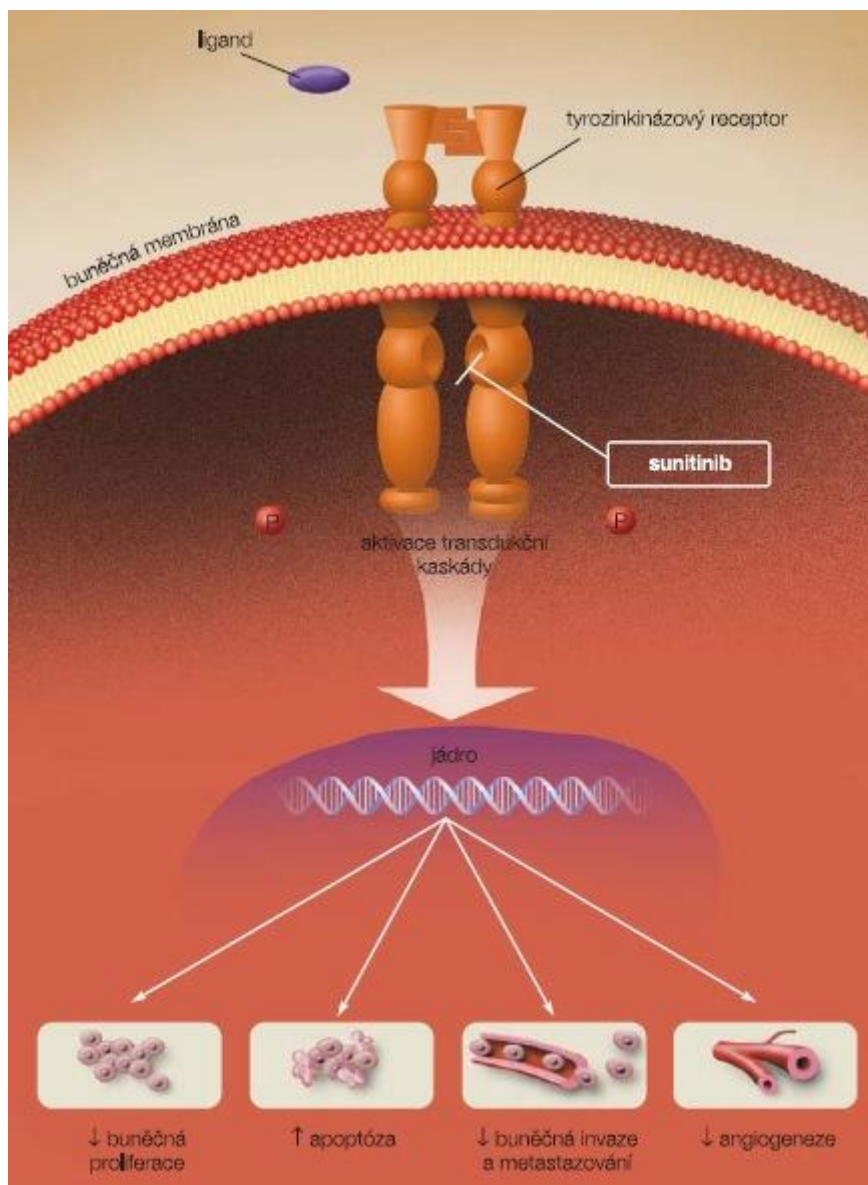


<http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2008/3-2008/Sunitinib/e-9q-a3-jp.magarticle.aspx>
(28. 3. 2011)

Tyrozinkinázy jsou buněčné enzymy, které zprostředkovávají vazbu fosfátových skupin na aminokyselinu tyrozin. Proces fosforylace umožňuje vzájemnou vazbu růstových faktorů, čímž dochází ke spuštění kaskády přenosu signálů z vnějšího prostředí buňky k jejímu jádru. Zdrojem fosfátu pro kinázy je adenzinotrifosfát (ATP). Pokud se naváže na tyto enzymy inhibitor místo ATP, tak nedochází k fosforylaci proteinů a je přerušen přenos signálu.

Inhibitory tyrozinkináz působí cíleně na specifické receptory nádorové buňky (24). Mají antiangiogenní účinek, čímž snižují krevní zásobení nádorových buněk, antiproliferační účinek a zvyšují apoptózu (23) (24).

Obrázek 8: Schéma mechanismu účinku sunitinibu



<http://www.remedia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2008/3-2008/Sunitinib/e-9q-a3-jp.magarticle.aspx>
(28. 3. 2011)

Sunitinib inhibuje aktivaci intracelulární domény několika receptorů růstových faktorů: receptory pro růstový destičkový faktor (PDGFR - alfa, PDGFR - beta), receptory pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR - 1, VEGFR - 2, VEGFR - 3), receptory faktoru kmenových buněk (Kit), Fms podobné tyrozinkinázy 3 (Flt3, Fms-like tyrosine kinase-3), receptory kolonie stimulujícího faktoru (CSF - 1R) a receptory pro neurotrofický faktor odvozený od gliálních buněk (RET, glial cell - line derived neurotrophic factor receptor) (23) (24). VEGF a PDGF se váží na receptory tyrozinkinázy

na endoteliálních buňkách a cévních pericytech a podporují nádorovou angiogenezi. Proti ní působí sunitinib se svojí protinádorovou aktivitou, který vyvolává utlumení nádoru a inhibici jeho růstu (25).

„Sunitinib je metabolizován cytochromem P450 (23).“ Primární aktivní metabolit sunitinibu, desethyl-sunitinib, je vytvořený izoenzymem CYP3A4, který primární aktivní metabolit dále odbourává (23) (24). Inhibitory CYP3A4 zvyšují koncentraci sunitinibu v plazmě a induktory jeho koncentraci v plazmě snižují (23). Sunitinib a jeho primární aktivní metabolit se vážou na lidské plazmatické proteiny (24).

Při podávání sunitinibu pacientům byly zaznamenány některé závažné nežádoucí účinky. Mezi nežádoucí účinky patří plicní embolie, trombocytopenie, krvácení do tumoru, neutropenie, hepatitida a jaterní selhání. Mezi nejčastějšími nežádoucími účinky provázející léčbu jsou únava, průjem, nevolnost, zvracení, stomatitida, dyspepsie, změna barvy kůže (souvisí se žlutým zbarvením účinné látky), depigmentace kůže nebo vlasů, dysgeuzie, hypertenze a další (24).

6.1 Sunitinib a hypertenze

Mezi hlavní nežádoucí účinky léčby sunitinibem (inhibitor angiogeneze) patří hypertenze. U pacientů užívajících tento lék byl prokázán výskyt všech kategorií zvýšeného krevního tlaku. Příznaky hypertenze začínají zvýšením systolického krevního tlaku o 20 % a diastolického krevního tlaku o 10 %. K tomuto nežádoucímu účinku, který se musí léčit příslušnými antihypertenzivy, může dojít po zahájení léčby a během prvního roku léčby. Výskyt a závažnost hypertenze u pacientů s nádorovým onemocněním je závislá na typu léčiva, plánu jeho užívání, na věku pacienta a na přítomnosti současného srdečního onemocnění. Nedostatečně kontrolovaná hypertenze při užívání léčiva může vést k vážným kardiovaskulárním příhodám.

Hypertenze vyvolaná antiangiogenními léky pravděpodobně souvisí s nárůstem systémové cévní rezistence. Důkaz spojitosti mezi hypertenzí a poruchou angiogeneze byl prokázán snížením počtu arteriol a kapilár, změnami v mikrovaskulární síti, poklesem poddajnosti a pružnosti cévní stěny, snížením aktivity NO a zvýšením VEGF v plazmě (15). Inhibice dráhy VEGF může snížit biologickou dostupnost NO a tak podporovat

rozvoj hypertenze (26). Výsledné snížení cévní plochy vede ke zvýšení periferního cévního odporu.

Inhibitory angiogeneze působí dvěma mechanismy. Jedním z nich je blokování extracelulární vazby vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) k jeho receptoru (VEGFR) přes anti-VEGF protilátky. Druhým mechanismem inhibice angiogeneze je blokování intracelulární signální dráhy receptoru pro VEGF potlačením přenosu signálu přes receptor tyrozinkináz. Sunitinib je tímto procesem schopen zablokovat odesílání signálů z VEGFR k cévní stěně uvnitř buňky a tím brání odpovídajícím specifickým odpovědím (proliferace, angiogeneze a vaskulogeneze). Předpokládá se, že sunitinib působí inhibicí účinku VEGFR a PDGFR, které vedou k poškození endotelu kapiláry (15).

7 CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této práce bylo zjistit a popsat expresi endoteliální NO syntázy v pravé femorální artérii u spontánně hypertenzních potkanů a WKY potkanů s ohledem na podávání léčiva sunitinibu za použití imunohistochemických metod.

8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Použitá zvířata

K experimentu byli použité dva kmeny potkanů. Jedním z nich byl inbrední kmen spontánně hypertenzních potkanů a druhým inbrední kmen WKY potkanů, kteří jsou na rozdíl od SHR normotenzní. Každý kmen byl rozdělen na 2 skupiny. První skupině byl podáván sunitinib a druhé voda, jakožto kontrola. Voda i léčivo u SHR byly podávány denně 8 týdnů, pak byla 5 dnů pauza na zotavení z celkové toxicity. Poté následovalo opětovné podávání 8 týdnů (schéma aplikace: 8 týdnů/5 dnů pauza/8 týdnů). U kmene SHR v průběhu podávání sunitinibu došlo u potkanů k nárůstu jejich váhy. Podávání vody a léčiva u WKY potkanů bylo obdobné a probíhalo denně 8 týdnů, pak byla 5 dnů pauza na zotavení z celkové toxicity. Poté následovalo opětovné podávání 2 týdny (schéma aplikace: 8 týdnů/5 dnů pauza/2 týdny). V tomto případě nešlo pokračovat v aplikaci sunitinibu, protože se zde objevila výrazná celková toxicita a úbytek na tělesné hmotnosti potkanů.

8.2 Imunohistochemie

Veškerá imunohistochemická barvení byla provedena na pravých femorálních artériích potkanů. Tyto preparáty byly ponořeny do zmrazovacího média (tissue freezing medium) (Leica, Praha, Česká Republika), poté byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C.

Pro detekci exprese endoteliální NO syntázy byla použita metodika En Vision s detekcí pomocí DAB, který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci.

Pracovní postup – En Vision

Zmražené tkáňové řezy na sklíčku byly nejprve 30 minut sušeny na vzduchu. Po rozmrazení se na 30 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v minus 20°C. Poté se řezy nechaly 30 minut usušit. Tímto procesem jsme docílili fixace řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Po usušení se sklíčka s řezy vložily do fosfátového pufru (roztok PBS) na 5 minut.

Před nanesením primární protilátky bylo nutné nejprve zablokovat nescifická vazebná místa inkubací s 10% roztokem goat séra (kozí sérum) (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo) v PBS (30 minut).

Teprve poté se mohla pro detekci exprese eNOS použít primární protilátka NOS3 (eNOS) - rabbit anti rat (Santa Cruz Biotechnology), která se ředí v BSA v poměru 1/100. Inkubace s primární protilátkou probíhala 60 minut. Poté se řezy vložili do roztoku PBS (2x5 minut) a následně na 15 minut do 3% H₂O₂.

Po oplachu v roztoku PBS (2x5 minut) se aplikovala sekundární protilátka Anti rabbit - HRP (Dako). Inkubace s touto protilátkou trvala 30 minut. Poté se sklíčka s řezy opět opláchly roztokem PBS (2x5 minut).

Pro vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu jsme použili chromogen diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, Dako, Carpinteria, USA). Tato vizualizace probíhala po dobu 45 sekund. Nakonec byly řezy opláchnuty v roztoku PBS.

Poté se provedlo dobarvení jader v hematoxylinu po dobu 10 sekund s následným modráním pod tekoucí vodou z kohoutku (1 minuta).

Na závěr byly sklíčka s řezy opláchnuty v acetonu a odvodněny v aceton-xyleny (10:1) a aceton-xyleny (1:10). Oba trvaly 3 minuty. Ukončeno to bylo xylenem (3 x 2 minuty). Poté byla sklíčka zamontována do Eukitu.

8.3 Statistická analýza

Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 6 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u SHR a WKY potkanů byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha = 0,05$. K výpočtu byl použit GraphPad Prism software (verze 4.0).

9 VÝSLEDKY

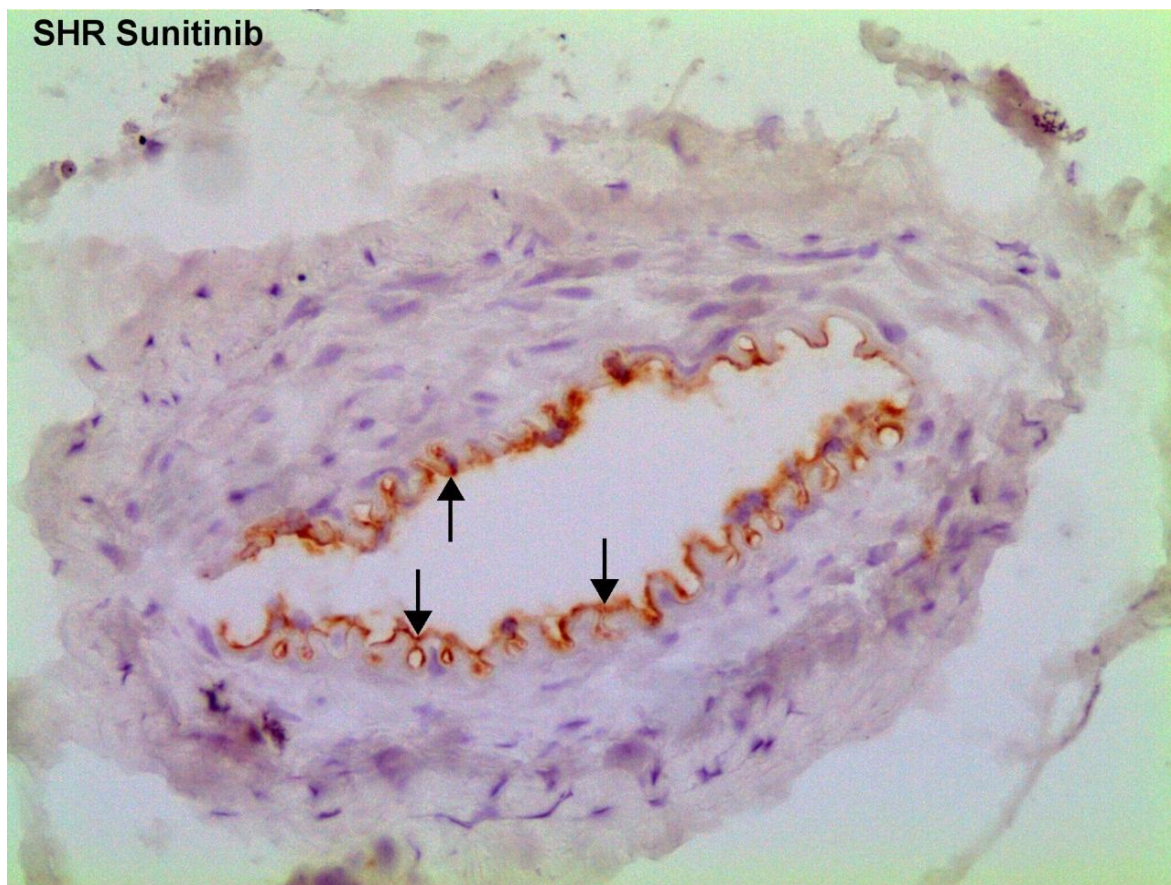
9.1 Imunohistochemické barvení eNOS v pravé femorální tepně

Imunohistochemické barvení bylo provedeno u 120 preparátů. 120 preparátů zahrnovalo 5 preparátů systematicky náhodně vybraných řezů ze 6 zvířat pro každou skupinu. Imunohistochemická analýza ukázala expresi eNOS pouze v lumen endotelových buněk.

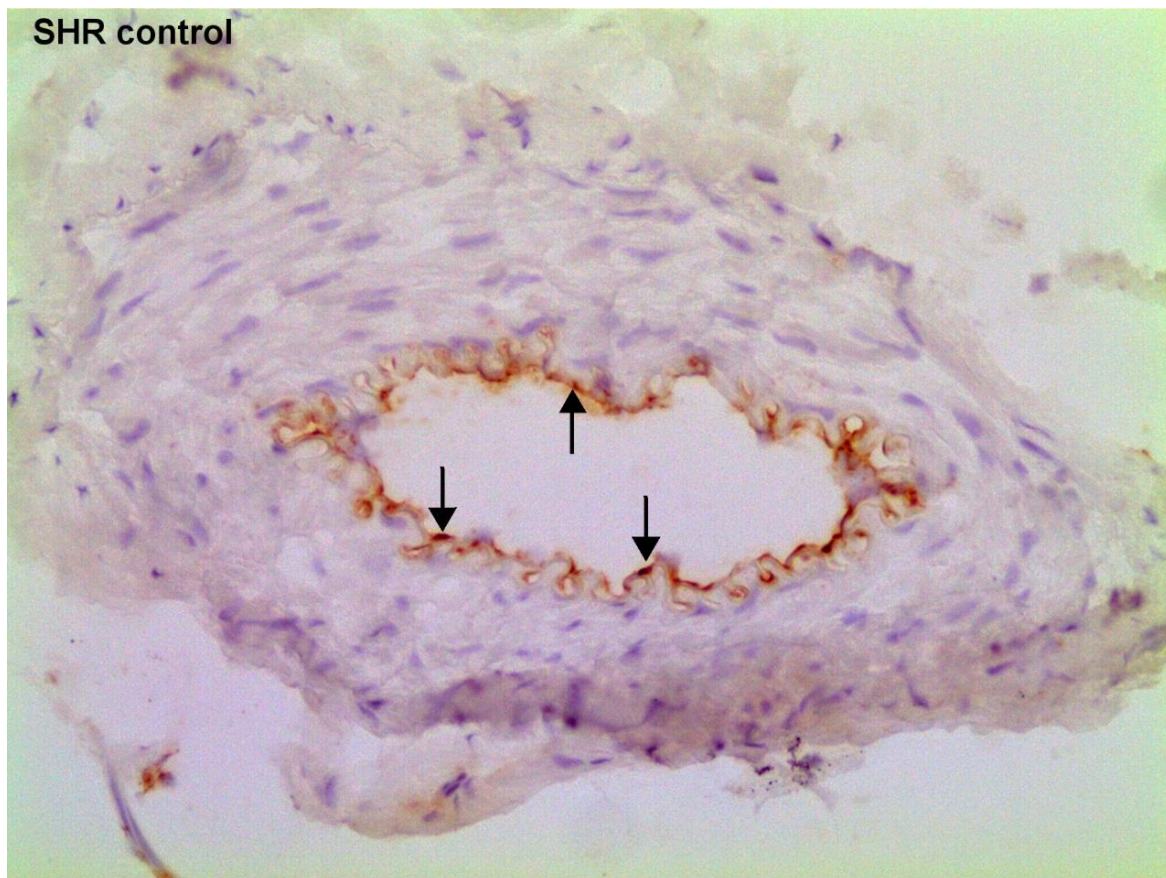
Pozitivní reakce na barvení eNOS byla zjištěna v téměř každé testované cévě ve všech 4 skupinách zvířat. Léčba sunitinibem u SHR potkanů neovlivnila expresi eNOS (obr. 9). Na druhou stranu, léčba sunitinibem u WKY potkanů pravděpodobně snížila expresi eNOS (obr. 11).

Obr. 9 – 10: Reprezentativní obrázky preparátů po imunohistochemickém barvení exprese eNOS ve femorální tepně u SHR potkanů. Exprese eNOS byla detekována v lumen endotelových buněk v obou skupinách (šipky). Pokud se srovnalo barvení u obou skupin, tak se nezdálo, že by léčba sunitinibem ovlivňovala expresi eNOS u SHR potkanů. Zvětšeno 10x.

Obrázek 9: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení eNOS u SHR potkanů po podání sunitinibu.

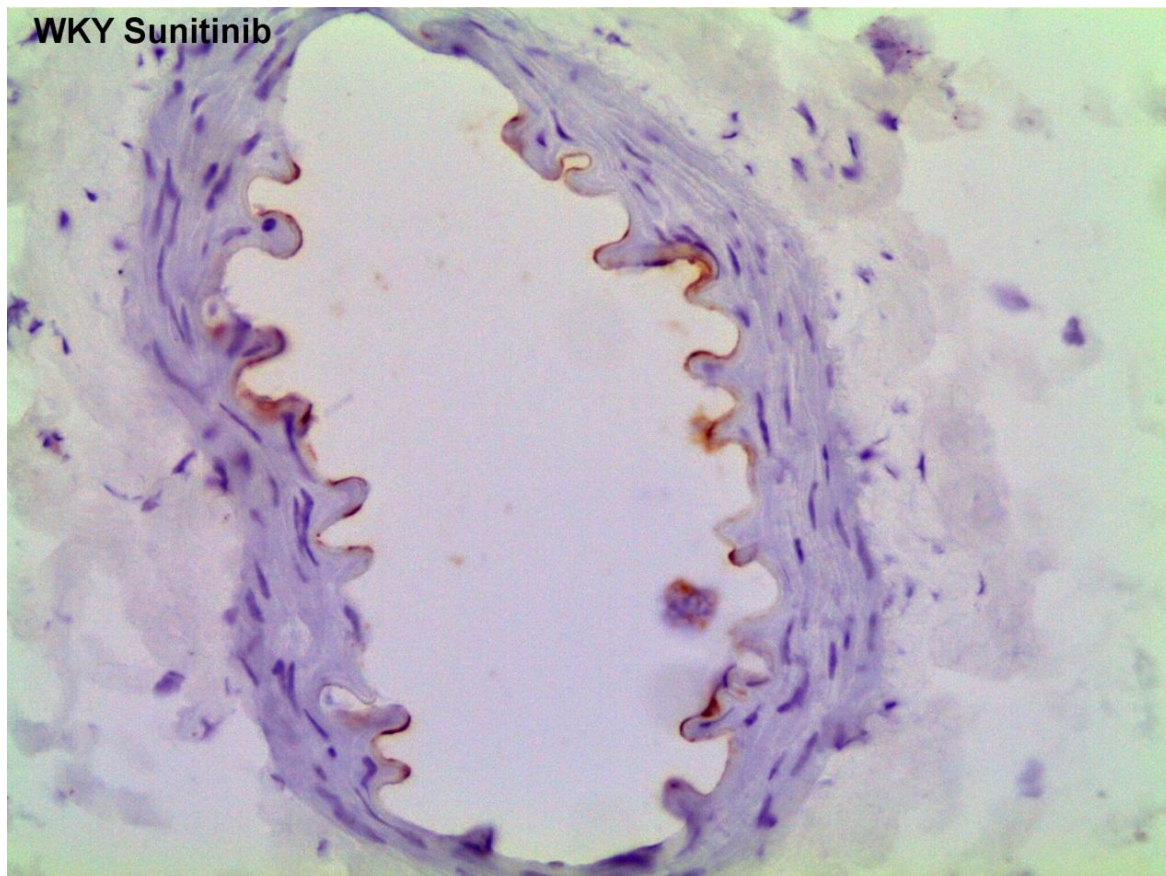


Obrázek 10: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení eNOS u SHR potkanů po podání vody (kontrola).

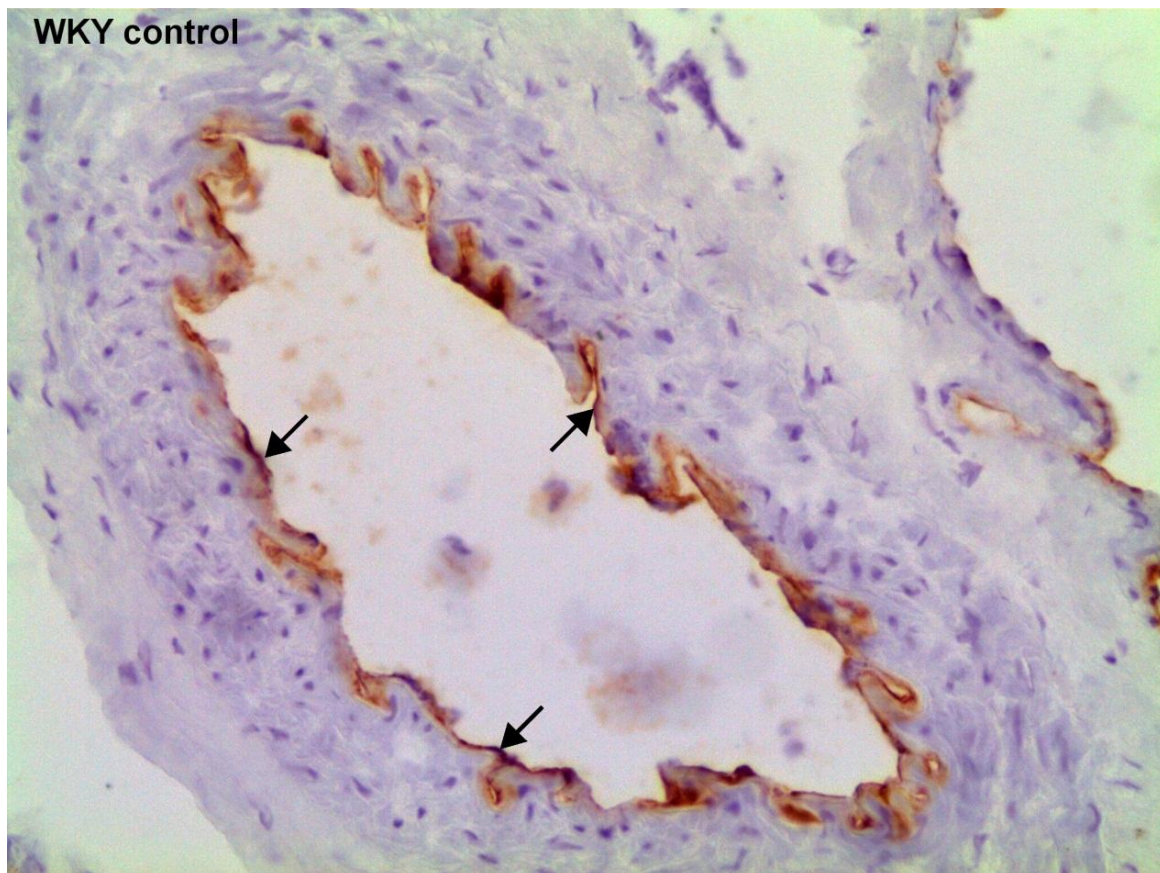


Obr 11 – 12: Reprezentativní obrázky preparátů po imunohistochemickém barvení exprese eNOS ve femorální tepně u WKY potkanů. Exprese eNOS byla detekována v lumen endotelových buněk v obou skupinách (šipky). Pokud se srovnalo barvení u obou skupin, tak se zjistilo, že léčba sunitinibem vedla ke snížení exprese eNOS. Zvětšeno 10x.

Obrázek 11: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení eNOS u WKY potkanů po podání sunitinibu.



Obrázek 12: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení eNOS u WKY potkanů po podání vody (kontrola).



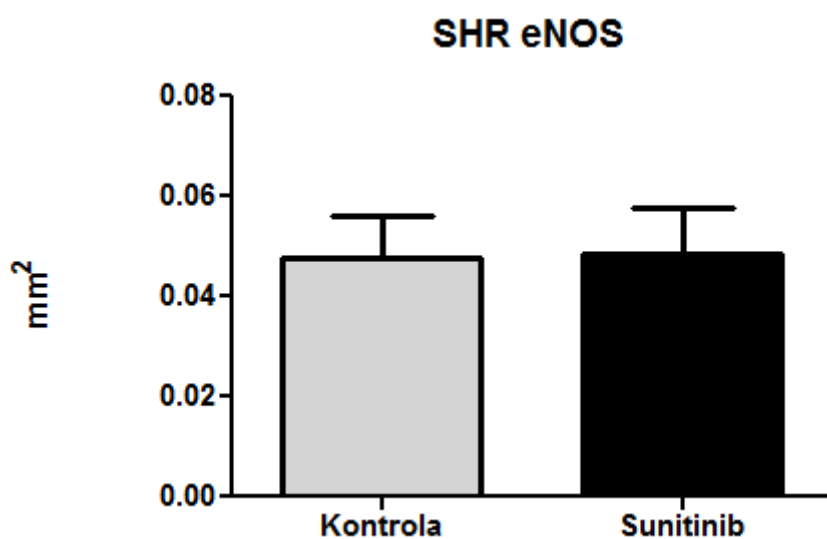
9.2 Stereologická analýza exprese eNOS v pravé femorální tepně

Cílem této kvantifikace bylo zjistit účinek léčby sunitinibem prostřednictvím exprese eNOS u SHR a WKY potkanů.

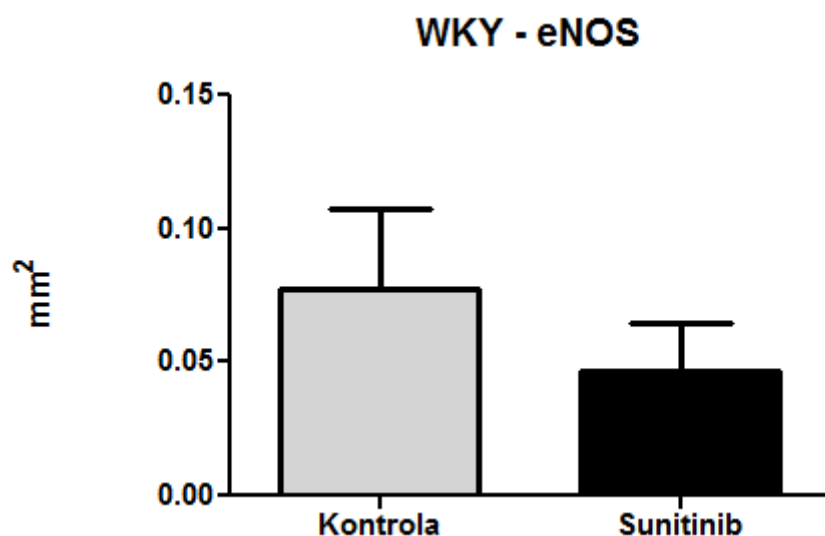
Stereologická analýza exprese eNOS u SHR potkanů neprokázala žádný účinek léčby sunitinibem, a proto nebyla ovlivněna exprese eNOS v endotelu (graf 1).

Stereologická analýza exprese eNOS u WKY potkanů ukázala na silné, ale nevýznamné snížení exprese eNOS v endotelu po léčbě sunitinibem (graf 2).

Graf 1: Stereologická analýza exprese eNOS ve femorální tepně u SHR potkanů.



Graf 2: Stereologická analýza exprese eNOS ve femorální tepně u WKY potkanů.



10 DISKUSE

Sunitinib a jeho aktivní metabolit (SU012662) jsou selektivními inhibitory více receptorů tyrozinkináz (RTKs) a jejich účinek souvisí s nádorovým růstem a angiogenezí. Sunitinib se používá k léčbě gastrointestinálního stromálního tumoru (GIST) u pacientů s rozvojem tohoto onemocnění nebo u pacientů po neúčinné léčbě imatinibem (15). Sunitinib také ukazuje protinádorovou aktivitu u pacientů s rozvinutým renálním buněčným karcinomem (RCC) po neúspěšné cytokinové terapii. Sunitinib byl účinnější než interferon- α jako první linie léčby u pacientů s metastazujícím RCC (27).

Sunitinib je účinný inhibitor více receptorů tyrozinkináz, jehož prostřednictvím je zprostředkována jeho protinádorová a antiangiogenní aktivita. Cílové RTKs zahrnují receptory pro růstový destičkový faktor (PDGFR- α , PDGFR- β), receptory pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR-1, VEGFR-2 (Flk-1/KDR) a VEGFR-3), receptory faktoru kmenových buněk (KIT), FMS protein tyrozinkinázy-3 (FLT3), receptory kolonie stimulujícího faktoru typu 1 (CSF-1R) a receptory pro neurotrofický faktor odvozený od gliálních buněk (RET). Obecně lze říci, že je důležitý pro inhibici angiogeneze (28). Inhibitory angiogeneze působí na jedné straně blokování extracelulární vazby vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) k jeho receptoru přes anti-VEGF protilátky, a na druhé straně blokuje intracelulární signální dráhu VEGFR potlačením přenosu signálu přes receptor tyrozinkináz (29).

Tyto účinky jsou alespoň částečně odpovědné za jeden z nejvýznamnějších klinických nežádoucích účinků, kterým je indukce arteriální hypertenze. Mezi pacienty užívajícími sunitinib byl prokázán výskyt všech kategorií a vysoký stupeň hypertenze u 21,6 %. Z toho 6,8 % bylo spojeno s významně zvýšeným rizikem vysokého stupně hypertenze (15).

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv podání sunitinibu spontánním hypertenzním potkanům a normotenzním potkanům Wistar Kyoto. Zaměřili jsme se na expresi eNOS v pravé femorální tepně.

Nejčastěji používaný model kardiovaskulárního onemocnění, s více než 4000 odkazů v Medline za posledních 10 let, je spontánně hypertenzní potkan (SHR) s potkanem Wistar Kyoto (WKY) jako normotenzní kontrola (30). SHR potkani jsou potomci mužského outbredního Wistar potkana se spontánní hypertenzí z kolonie v japonském Kyotu a samice se zvýšeným krevním tlakem. Jejich potomci se pak nechávají pářit bratr x sestra a páření pokračuje s výběrem potkanů se spontánní hypertenzí, která je

definovaná hodnotou systolického krevního tlaku více než 150 mm Hg, která trvá déle než jeden měsíc (31). Samec SHR potkana se běžně používá jako model lidské hypertenze. Například definuje hypertenzí indukované změny v signálních mechanismech a testování nových antihypertenziv a nežádoucích účinků léků (30).

Endotel tvoří vnitřní výstelku cév. Na rozdíl od prvotního názoru, že funkcí endoteliální výstelky cév je sloužit jako mechanická bariéra, dnes víme, že endotel vnímá a reaguje na fyziologické a patologické podněty. Produkuje vazoaktivní látky, včetně oxidu dusnatého (NO), prostacyklinu a endoteliny. NO může být syntetizován různými syntázami oxidu dusnatého, včetně typu 3 NOS (eNOS), indukibilní NOS (iNOS) a neuronální NOS (nNOS) (32).

eNOS je hlavní syntáza oxidu dusnatého produkovaná endotelem v krevních cévách. eNOS odvozená od NO vykonává důležité funkce včetně regulace napětí cév a průtoku krve, potlačení proliferace cévních hladkých svalových buněk, formování endotelových interakcí leukocytů a formování trombózy. Tyto funkce jsou dokázány prostřednictvím fenotypů myši. Snížená exprese eNOS vede k hypertenzi, zvýšené cévní proliferaci buněk hladkého svalstva v reakci na zranění cévy, zvýšení endoteliálních interakcí leukocytů, hyperkoagulaci a zvýšení rizika aterosklerózy (33).

Oxid dusnatý je zásadní pro udržení normálního krevního tlaku, a proto úloha NO v esenciální hypertenzi byla oblastí intenzivního výzkumu. NO zprostředkovává vazodilataci cév a její porucha byla prokázána u zvířecích modelů hypertenze (34).

V této bakalářské práci jsme ukázali expresi eNOS u obou sledovaných kmenů potkanů. Léčba sunitinibem neměla vliv na expresi eNOS v pravé femorální tepně. Naopak léčba sunitinibem snižuje expresi eNOS u normotenzních potkanů WKY. Tento pokles však nebyl statisticky významný.

Navzdory skutečnosti, že exprese eNOS je snížena u hypertenze, se nám v této studii nepodařilo prokázat naznačenou skutečnost, že jakmile je hypertenze vyvolaná sunitinibem, není navozená endoteliální dysfunkce v těchto cévách ve srovnání se zvířaty, kterým se nepodával sunitinib.

Všechna získaná data prezentovaná zde v této bakalářské práci ukazují, že navrhované zvýšení krevního tlaku po léčbě sunitinibem nevedlo k závěru imunohistochemicky zjištělné změny v endotelu. Na druhou stranu je to pilotní studie, ve které je v plánu do budoucna vyzkoušet i jiné markery, které by měly popisovat účinky

sunitinibu v cévní stěně u těchto potkanů. Navíc potenciální studie bude zaměřená na endotel aorty, kde budou studovány i další markery, včetně zástupců kaskády VEGF.

11 ZÁVĚR

Imunohistochemická analýza ukázala expresi eNOS pouze v lumen endotelových buněk.

Léčba sunitinibem nemá vliv na expresi eNOS u SHR potkanů. Na druhou stranu, léčba sunitinibem pravděpodobně snížila expresi eNOS u WKY potkanů.

Stereologická analýza exprese eNOS u SHR potkanů neprokázala žádný účinek léčby sunitinibem. Stereologická analýza exprese eNOS u WKY potkanů ukázala silné, ale nevýznamné snížení exprese endoteliální eNOS po léčbě sunitinibem.

Léčba sunitinibem nevyvolala imunohistochemicky zjistitelnou endoteliální dysfunkci zastoupenou změnami exprese eNOS v pravé femorální tepně u hypertenzních a normotenzních potkanů.

12 SEZNAM ZKRATEK

ANG II – angiotensin II
ATP – adenzin trifosfát
cGMP – cyklický guanozinmonofosfát
CMP – cévní mozková příhoda
EDRF - endoteliální relaxační faktor
eNOS – endoteliální NO syntáza
GIST – gastrointestinální stromální tumor
GMP - guanozinmonofosfát
NOS – NO syntáza
PDGF – růstový faktor destiček
PDGFR - receptor pro růstový faktor destiček
RAAS – systém renin-angiotensin-aldosteron
RCC – renální buněčný karcinom
RTK – receptor tyrozinkinázy
sGC – rozpustná guanylátcykláza
SEM – střední chyba průměru
SHR – spontánně hypertenzní potkan
SNS – sympatický nervový systém
SVR – systémová cévní rezistence
TK – tlak krve
VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR – receptor pro endoteliální růstový faktor
WKY – Wistar Kyoto potkan

13 CITOVANÁ LITERATURA

1. **Špinar Jindřich, Vítovec Jiří, Zicha Jiří, a kol.** *Hypertenze; Diagnostika a léčba*. 1. vydání. Praha 7 : Grada Publishing, spol. s.r.o., 1999. ISBN 80-7169-736-2.
2. **Widimský Jiří, a kol.** *Hypertenze*. 2. vydání. Praha : Nakladatelství TRITON s.r.o., 2004. ISBN 80-7254-515-9.
3. **Souček Miroslav, Tomáš Kára, a kol.** *Klinická patofyziologie hypertenze*. 1. vydání. Praha : vydala Grada Publishing, spol. s.r.o., 2002. stránky 17, 28, 32, 34. ISBN 80-247-0227-4.
4. **Widimský, Jiří.** *Hypertenze; Diagnóza a léčba*. 1. vydání. Jinočany : Nakladatelství a vydavatelství H&H, 1998. ISBN 80-86022-32-3.
5. **Widimský Jiří, jr.** *Sekundární hypertenze*. 1. vydání. Praha : Nakladatelství TRITON, 2003. str. 13. ISBN 80-7254-419-5.
6. **Šimon Jaroslav, Šípová Ivana.** *Novinky v léčbě hypertenze*. 1. vydání. Praha 1 : Nakladatelství GEUM Praha, s.r.o., 2004. stránky 10, 18. ISBN 80-86256-36-7.
7. **Jedlička, Pavel.** *Vysoký krevní tlak...nic se neděje?* 1. vydání. Havlíčkův Brod : vydala HYPERTENZE.EU, s.r.o., 2007. stránky 7 - 9. ISBN 978-80-239-9943-3.
8. **Paleček, Jiří.** *Biologie buňky, II. Základy mikroskopické histologie*. Oběhový (cirkulační) systém. 1. vydání. Praha : Univerzita Karlova, vydavatelství Karolinum, 1996, stránky 118-121. ISBN 382-141-96.
9. **Elišková Miloslava, Naňka Ondřej.** *Přehled anatomie*. Obecná angiologie. 1. vydání. Praha : Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2007, stránky 86-88. ISBN 978-80-246-1216-4.
10. **Paulsen, Douglas F.** *Histologie a buněčná biologie*. Oběhový systém. 1. vydání. Praha : Nakladatelství H & H vyšehradská, s.r.o., 2004, stránky 156-165. ISBN 80-7319-024-9.

11. **Konrádová Václava, Uhlík Jiří, Vajner Luděk.** *Funkční histologie. Kardiovaskulární systém.* 2. vydání. Jinočany : nakladatelství H & H Vyšehradská, s.r.o., 2000, stránky 115-126. ISBN 80-86022-80-3.
12. **Martínek Jindřich, Vacek Zdeněk.** *Histologický atlas. Srdce a cévy.* 1. vydání. Praha 7 : vydala Grada Publishing, a.s., 2009, stránky 11 - 17. ISBN 978-80-247-2393-8.
13. **Widimský Jiří, jr.** *Arteriální hypertenze - minimum pro praxi.* 1. vydání. Praha : Nakladatelství TRITON, 1998. stránky 9, 11, 17-19. ISBN 80-85875-59-4.
14. **Cheitlin M. D., Sokolow M., McIlroy M. B.** Systémová hypertenze. In Maurice Sokolow, Malcolm B. McIlroy Melwin D. Cheitlin. *Klinická kardiologie.* 1. české vydání. Jinočany : Nakladatelství H & H Vyšehradská, s.r.o., 2005, str. 295. ISBN 80-7319-005-2.
15. **Aparicio Gallego Guadalupe, a kol.** *Molecular basis of hypertension side effects induced by Sunitinib.* Anticancer drugs., 2011, roč. 22, č. 1, stránky 1-8.
16. **Hall Michael E., Hall John E., Gragner Joey P., Jones Daniel W.** Systémová hypertenze - patogeneze a etiologie. In Walsh Richard A., Fuster Valentin, a kol. O'Rourke Robert A. *Kardiologie; Hurstův manuál pro praxi.* 1. české vydání. Praha 7 : Grada Publishing, a.s., 2010, stránky 349 - 361. ISBN 978-80-247-3175-9.
17. **Sheila A. Doggreall, Lindsay Brown.** *Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.* Cardiovascular research, 1998, roč. 39, č. 1 stránky 89-105.
18. **Okamoto K., Aoki K.** *Development of a strain of spontaneously hypertensive rats.* Japan circulation journal, 1963, roč. 27, č. 3, stránky 282-293.
19. **Iams SG, Wexler BC.** *Inhibition of the development of spontaneous hypertension in SH rats by gonadectomy or estradiol.* The Journal of laboratory and clinical medicine, 1979, roč. 94, č. 4, stránky 608-616.
20. **Lindpaintner K., Kreutz R., Ganten D.** *Genetic variation and hypertensive and 'control' strains. What are we controlling for anyway?.* Hypertension, 1992, č. 19, stránky 428-430.

21. **Anuran Chatterjee, John D. Catravas.** *Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation.* Vascular Pharmacology, 2008, roč. 49, stránky 134-140.
22. **Bultas, Jan.** Endoteliální dysfunkce. In Cífková Renata, Češka Richard, a kol. Bultas Jan. *Od endoteliální dysfunkce k ischemické chorobě srdeční.* 1. vydání. Praha 5 : Nakladatelství Galén, 1999, stránky 11-41. ISBN 80-7262-026-6.
23. **Kocák, Ivo.** *Sutent, profil léčiva.* Nové léky v onkologické praxi, 2010, stránky 35-42. Dostupné také z WWW: http://www.eonkologie.cz/cs/images/stories/NL_2010/NL_2010_PDF/NL_2010_Kocakov_a.pdf.
24. **Brančíková D., Adámková Krákorová D.** *Sunitinib.* Remedia, 2008. Dostupné také z WWW: <http://www.remédia.cz/Archiv-rocniku/Rocnik-2008/3-2008/Sunitinib/e-9q-a3-jp.magarticle.aspx>.
25. **Deeks Emma D., Keating Gillian M.** *Sunitinib.* Wolters Kluwer Health, 2006, roč. 66, č.17, stránky 2256-2266.
26. **Dhaun Neeraj, Webb David J.** *Receptor Tyrosine Kinase Inhibition, Hypertension and Proteinuria.* Hypertension, 2010, roč. 56, č. 4, stránky 575-577.
27. **Mena A. C., Pulido E. G. and Guillen-Ponce C.** *Understanding the molecular-based mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitor: sunitinib.* Anticancer drugs, 2010, roč. 22, č. 1, stránky 3-11.
28. **Faivre S., Demetri G., Sargent W. and Raymond E.** *Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development.* Nature reviews drug discovery, 2007, roč. 6, stránky 734-745.
29. **Papaetis G. S., Syrigos K. N.** *Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies.* BioDrugs, 2009, roč. 23, stránky 377-389.
30. **Stoll M., Jacob H. J.** *Genetic rat models of hypertension: relationship to human hypertension.* Current hypertension reports, 2001, roč. 3, stránky 157-164.

31. **Kumarasamy S., Gopalakrishnan K., Shafton A., a kol.** *Mitochondrial polymorphisms in rat genetic models of hypertension*. Mammalian genome, 2010, roč. 21, stránky 299-306.

32. **P., Marson B.** *eNOS polymorphisms in hypertension*. Clinica chimica acta, 2008, roč. 390, str. 161.

33. **C., Sessa W.** *eNOS at a glance*. Journal of cell science, 2004, roč. 117, stránky 2427-2429.

34. **Mungruel I. N., Bredt D. S., Stewart D. J., Husain M.** *From molecules to mammals: what's NOS got to do with it?* Acta physiologica scandinavica, 2003, roč. 179, stránky 123-135.

14 Seznam obrázků

OBRÁZEK 1: STĚNA CÉVY	9
OBRÁZEK 2: KAPILÁRA SE SOUVISLOU VÝSTELKOU.....	10
OBRÁZEK 3: FENESTROVANÁ KAPILÁRA	10
OBRÁZEK 4: KAPILÁRA S PÓRY.....	11
OBRÁZEK 5: POROVNÁNÍ STRUKTURY ARTERIE A VENY.	12
OBRÁZEK 6: VZNIK NO A JEHO ÚČINEK V HLADKÉ SVALOVINĚ.....	22
OBRÁZEK 7: CHEMICKÝ VZOREC SUNITINIBU.....	23
OBRÁZEK 8: SCHÉMA MECHANISMU ÚČINKU SUNITINIBU.....	24
OBRÁZEK 9: REPREZENTATIVNÍ OBRÁZEK IMUNOHISTOCHEMICKÉHO BARVENÍ eNOS U SHR POTKANŮ PO PODÁNÍ SUNITINIBU.	31
OBRÁZEK 10: REPREZENTATIVNÍ OBRÁZEK IMUNOCHEMICKÉHO BARVENÍ eNOS U SHR POTKANŮ PO PODÁNÍ VODY (KONTROLA).....	32
OBRÁZEK 11: REPREZENTATIVNÍ OBRÁZEK IMUNOHISTOCHEMICKÉHO BARVENÍ eNOS U WKY POTKANŮ PO PODÁNÍ SUNITINIBU.	33
OBRÁZEK 12: REPREZENTATIVNÍ OBRÁZEK IMUNOCHEMICKÉHO BARVENÍ eNOS U WKY POTKANŮ PO PODÁNÍ VODY (KONTROLA).....	34

15 Seznam grafů

GRAF 1: STEREOLOGICKÁ ANALÝZA EXPRESE eNOS VE FEMORÁLNÍ TEPNĚ U SHR POTKANŮ.....	35
GRAF 2: STEREOLOGICKÁ ANALÝZA EXPRESE eNOS VE FEMORÁLNÍ TEPNĚ U WKY POTKANŮ....	35