

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmakologie a toxikologie

**Imunohistochemická detekce PECAM-1 exprese u hypertenzních potkanů.**

**Immunochemical detection of PECAM-1 expression in hypertensive rats.**

Rigorózní práce

Konzultant práce:  
Hradec Králové 2011

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD.  
Mgr. Erika Hocková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Děkuji Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení, připomínky a rady při vypracování této práce.

## ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Erika Hocková

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

Název rigorózní práce: Imunohistochemická detekce PECAM-1 exprese u hypertenzních potkanů

Hypertenze - vysoký krevní tlak je civilizační nemoc, která patří k nejčastějším kardiovaskulárním onemocněním. Svou prevalencí 25 – 30% v dospělé populaci představuje neinfekční epidemii a tím závažný zdravotnický problém.

PECAM - 1 je adhezní a signální molekula, exprimovaná na hematopoetických a endoteliálních buňkách, kde tvoří hlavní složku cévní stěny. Strukturně je členem imunoglobulinové „superrodiny“ adhezních molekul.

Sunitinib je biologická látka ze skupiny tyrozinkinázových inhibitorů používaný v léčbě generalizovaného karcinomu ledviny a gastrointestinálních stromálních tumorů. Patří do farmakologické skupiny antineoplastika – inhibitory proteinkinázy. Mezi jeho hlavní nežádoucí účinky patří hypertenze.

Tato rigorózní práce se zabývala popisem endoteliální exprese PECAM-1 v aortě u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) a jejich normotenzních kontrol (WKY potkanů) s ohledem na podávání léčiva sunitinibu za použití imunohistochemických metod a vyhodnocení pomocí stereologických metod.

V experimentu byly použity dva kmeny potkanů. Prvním z nich byl inbrední kmen spontánně hypertenzních potkanů - SHR a druhým inbrední kmen WKY potkanů s normotenzí . Oba kmeny byly rozděleny do dvou skupin. První skupině byl podáván sunitinib a druhé voda, která byla použita jako kontrola.

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 PECAM-1 pouze u endoteliálních buněk cévního lumina. Částečná exprese byla ještě detekována také v cévách adventitia.

Pozitivní reakce na barvení PECAM -1 byla zjištěna v téměř každé testované cévě ve všech 4 skupinách zvířat. Podávání sunitinibu vedlo k jistým změnám intenzity a plochy exprese PECAM-1. Podávání sunitinibu vedlo ke zvýšení exprese PECAM-1 (hodnoceno pouze

vizuálně) jak u SHR potkanů, tak i u WKY potkanů. Tyto výsledky byly dále podrobeny kvantifikační stereologické analýze.

Stereologická analýza exprese PECAM-1u SHR potkanů prokázala statisticky významný nárůst exprese PECAM-1 po podávání Sunitinibu. Podobně výsledky byly zjištěny i při kvantifikaci exprese PECAM-1 u WKY potkanů, kde byla rovněž nalezena signifikantně zvýšená exprese PECAM-1 po podání Sunitibu.

Imunohistochemická a stereologická analýza exprese PECAM-1 prokázala zvýšení exprese po podávání Sunitinibu u SHR i WKY potkanů, dále naznačila významný trend ve zvýšení exprese PECAM-1 u hypertenzních SHR potkanů ve srovnání s WKY potkany.

Tyto výsledky naznačují, že exprese PECAM-1 v aortě je indukována hypertenzí.

Podávání Sunitinibu by tedy mohlo vést k rozvoji nebo zhoršení endoteliální dysfunkce, což by mohlo představovat jeden z mechanismů jeho vaskulární toxicity.

## **ABSTRACT**

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Mgr. Erika Hocková

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

Title of Thesis: Immunochemical detection of PECAM-1 expression in hypertensive rats

Hypertension – abnormally high blood pressure - is a lifestyle disease, which belongs to the most frequent cardiovascular diseases. Hypertension seems to be a non-infectious epidemic with 25 to 30 % prevalence in adult population and presents a serious health problem.

PECAM-1 is an adhesive signal molecule expressed on hematopoietic and endothelial cells, creating the main component of the vascular tissue. Regarding its structure, it belongs to the immunoglobulin super-family of adhesive molecules.

Sunitinib is a biological treatment molecule of the group of tyrosine-kinase inhibitors used for treatment of generalised renal carcinoma and gastrointestinal stromal tumours. Pharmacologically, sunitinib is antineoplastic substance – protein-kinase inhibitor. The main adverse effect of sunitinib is hypertension.

The aim of this rigorous thesis was to define and to describe the expression of endothelial PECAM-1 in the aorta of spontaneously hypertensive rats (SHR) and their normotensive control group (Wistar - Kyoto rats - WKY) considering sunitinib treatment and using immunohistochemical methods and stereological evaluation.

Two strains of rats were used for the experiment – first inbred strain of spontaneously hypertensive rats (SHR) and second inbred strain of Wistar Kyoto normotensive rats. Both strains were divided into two groups – one was administered sunitinib and the other one water as a control.

Immunohistochemical staining was performed on 120 preparations, preparations were 5 random samples incisions from 6 animals of both groups. Immunohistochemical analysis showed PECAM-1 expression only on endothelial cells of vascular lumina. In addition, partial expression was detected on adventitia vessels. Positive reactions to PECAM-1 staining were observed in almost all tested vessels in all four groups of animals. Sunitinib administration led to increased expression of PECAM-1 (visual evaluation only) in SHR rats and WKY rats as well. Afterwards, these results underwent quantifying stereological analysis.

Stereological analysis of PECAM-1 expression in SHR group demonstrated statistically significant increase of PECAM-1 expression after sunitinib administration. Similar results were found in quantification of PECAM-1 expression in WKY group, which either showed significantly increased PECAM-1 expression after sunitinib expression.

Both immunohistochemical and stereological analysis of PECAM-1 expression demonstrated increased PECAM-1 expression after sunitinib administration in group of SHR rats and WKY rats and also suggested a significant trend in growing PECAM-1 expression in group of SHR rats when compared to WKY rats.

The results suggest that PECAM-1 expression in the aorta may induce hypertension.

Administration of sunitinib may lead to development or worsening of endothelial dysfunction which presents one of the mechanisms of sunitinib vascular toxicity.

## SEZNAM ZKRATEK

ACE	angiotenzin konvertující enzym
AT <sub>1</sub> receptory	receptory pro angiotenzin
ATP	adenozintrifosfát
DAB	diaminobenzidin
eNOS	NO -syntáza
EH	esenciální hypertenze
ICHS	ischemická choroba srdeční
Nf kb	nukleární transkripční faktor
PBS	fyzilogický roztok
PECAM – 1	adhezní a signální molekula
PDGFR	růstový faktor z destiček
PGE <sub>2</sub>	vazodilatační prostaglandiny
RAAS	system renin – angiotensin – aldosteron
SHR	spontánně hypertenzní potkani
TK	krevní tlak
TXA <sub>2</sub>	tromboxan
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
WKY	potkani kmene Wistar Kotyo

## OBSAH

1. ÚVOD.....	10
2. MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV.....	11
2.1    Obecná struktura cév.....	11
2.1.1    Artérie.....	12
2.1.2    Vény.....	14
2.1.3    Kapiláry.....	16
3. HYPERTENZE.....	20
3.1    Definice a klasifikace.....	20
3.2    Etiopatogeneze.....	21
3.2.1    Exogenní faktory.....	21
3.2.2    Endogenní faktory.....	22
3.3    Patofyziologie.....	24
3.4    Klinické symptomy.....	27
4. SUNITINIB.....	29
4.1    Struktura a mechanismus účinku.....	29
4.2    Sunitinib a hypertenze.....	32
5. SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍ POTKANI (SHR POTKANI).....	33
6. PECAM – 1.....	34
6.1    Prozánětlivý účinek.....	35
6.2    Protizánětlivý účinek.....	37
7. CÍL PRÁCE.....	38
8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	39
8.1    Použitá zvířata.....	39
8.2    Imunohistochemie.....	39
8.3    Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí.....	40
8.4    Statistická analýza.....	41
9. VÝSLEDKY.....	42
9.1    Imunohistochemické barvení PECAM - 1 v pravé femorální tepně.....	42
9.2    Stereologická analýza exprese PECAM-1 v aortě.....	47
10. DISKUSE.....	49
11. ZÁVĚR.....	51
12. LITERATURA.....	52

## 1. ÚVOD

Hypertenze - vysoký krevní tlak je civilizační nemoc, která patří k nejčastějším kardiovaskulárním onemocněním (1). Svou prevalencí 25 – 30% v dospělé populaci představuje neinfekční epidemii a tím závažný zdravotnický problém. Přibližně 95% jedinců s hypertenzí má tzv. esenciální etiologii, u zbývajících 5% se jedná o sekundární hypertenzi (2).

Zatímco v léčbě hypertenze bylo v posledních desetiletích dosaženo velkého pokroku, zůstává etiopatogeneze esenciální hypertenze nedostatečně objasněna. Je to dáno tím, že esenciální hypertenze je multifaktoriální onemocnění, na jehož vzniku se podílí řada mechanismů genetických, faktorů zevního prostředí a poruch endogenních regulačních procesů (3).

Hypertenze je spolu s diabetem, dyslipidemií a kouřením jedním z nejzávažnějších rizikových faktorů urychleného rozvoje aterosklerózy, vzniku ischemické choroby srdeční a cerebrovaskulárních příhod (4).

Krevní tlak souvisí s faktory, jako jsou věk, pohlaví, faktory vnějšího prostředí, intrauterinním prostředím a prenatálním obdobím.

Zvýšení krevního tlaku souvisí se způsobem života, změnou tělesné hmotnosti, nadměrnou spotřebou alkoholu, malou tělesnou aktivitou a vysokou spotřebou NaCl. Všechny tyto faktory lze ovlivnit v rámci primární prevence hypertenze u každého jedince (5).

V posledních 35 letech došlo k velkému pokroku v léčbě hypertenze, díky objevu účinných antihypertenziv. Kombinací nefarmakologických a farmakologických postupů lze nepříznivé dopady hypertenze odstranit nebo alespoň snížit (6).

## 2. MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

Cévní stěny odpovídají svou strukturou funkčním nárokům jednotlivých úseků cévního řečiště, k těmto úsekům patří **tepny – artérie**, které se postupně větví v tenčí **arterioly – arterioly**, ty přecházejí ve **vlásečnice, kapiláry – vassa capillaria** a ty pokračují do nejtenčích žil, nazývané **venuly – venulae**, tyto se sbírají v **žíly – venae** (7).

### 2.1 Obecná struktura cév

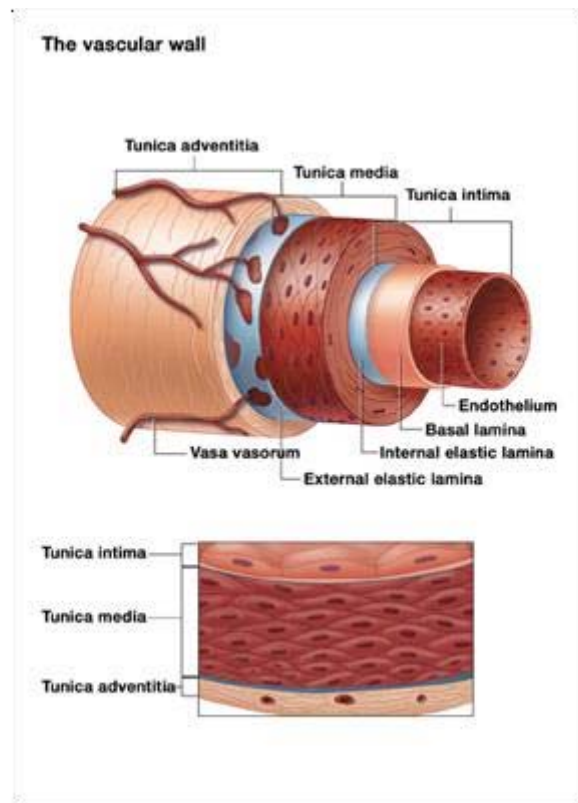
Všechny cévy jsou stavěny podle stejného základního stavebního plánu (8). Stěna každé tepny má 3 vrstvy, které se nazývají tunica intima, tunica media a tunica adventitia (7).

**Tunica intima** je vnitřní vrstva, skládá se z jedné vrstvy plochých endotelových buněk - endotel, které lemují vnitřní povrch cévy a jsou podloženy sítí elastických a kolagenních vláken – subendotelem (ten může obsahovat i jednotlivé hladké svalové buňky) nebo elastickými blankami, elastická vlákna a blanky se označují jako membrana elastica interna (7,9). Jednou z hlavních funkcí endotelu je zábrana srážení krve na jeho povrchu (10).

**Tunica media** je nejsilnější z vrstev stěny tepny, skládá se z hladké svaloviny, jejíž buňky probíhají cirkulárně, mezi nimi a kolem nich jsou sítě kolagenních a elastických vláken (7). Elastická vlákna vytvářejí jemné sítě, ve kterých jsou vytvořené otvory (fenestrae), tyto umožňují živinám pronikat do hlubších partií stěny cév (9,11).

**Tunica adventitia** je povrch cévy z fibrilárního vaziva s kolagenními a elastickými vlákny, které jsou longitudinálně uspořádané, ty se na povrchu cévy síťovitě překřížují a přecházejí do vaziva v nejbližším okolí cévy, tím ji pružně fixují k okolí. Proti svalové vrstvě je tunica adventitia oddělena elastickou vrstvičkou zvanou membrana elastica externa (7). Ve všech velkých cévách obsahuje tunica adventitia malé krevní cévy (vasa vasorum), které přivádí buňkám cévní stěny kyslík a živiny (9).

## Obrázek 1: Stěna cévy



<http://www.taramrusso.com/images/new/> ( 28.5.2011)

### 2.1.1 Artérie

Mají pevné a pružné stěny, které jsou adaptované na pulsové nárazy krve rytmicky vypuzované ze srdce (7). Podle průměru je dělíme na arterioly, artérie malého a středního průměru – svalového typu a velkého průměru – elastického typu (8).

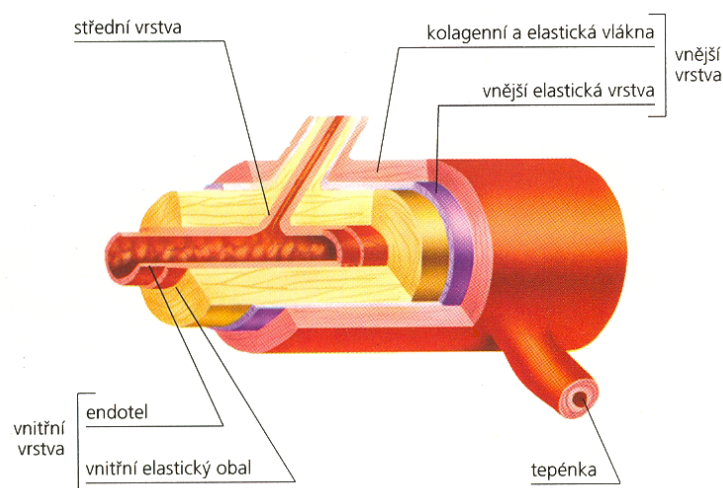
**Arterioly** jsou vlastně nejtenčí artérie, skládají se z endotelu ( tunica intima) a z tenké vrstvičky cirkulárně probíhajících hladkých svalových buněk ( tunica media), mezi endotelem a svalovými buňkami je membrana elastica interna složená ze sítí vláken, na povrchu svalových buněk je tenká fibroelastická vrstva. Arterioly mají poměrně silnou stěnu a malý

průsvit, jsou bohatě zásobeny nervovými vlákny, svou svalovinou pohotově mění průsvit a jsou proto hlavní oblastí regulace průtoku cévním řečištěm (7,8).

**Artérie malého a středního průměru** jsou většinou artériemi svalového typu. Vzhledem ke svému průsvitu mají poměrně tlustou stěnu, tunica intima je tvořena endotelovými buňkami, které mají stejnou strukturu jako v arteriolách a subendotelovou vrstvou, která je tlustší, membrana elastica interna je dobře vyvinuta. Tunica media je silná a v závislosti na průměru cévy obsahuje až 40 vrstev hladkých svalových buněk. Membrana elastica externa je vyvinutá pouze ve větších artériích svalového typu. Tunica adventitia je tvořena kolagenními a elastickými vlákny (8).

**Artérie velkého průměru** jsou artériemi elastického typu. V poměru k velikosti průsvitu mají poměrně tenkou stěnu a zajišťují kontinuální tok krve v průběhu diastoly srdce. Tunica intima se 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 elastická vlákna, hladké svalové buňky a retikulární vlákna. Membrana elastica externa u artérií elastického typu není vyvinutá. Tunica adventitia je tenká a obsahuje elastická a kolagenní vlákna (8,12).

## Obrázek 2: Stuktura artérie



[http://www.giobio.ic.cz/obrazky/clovek/clovek/obehova\\_soustava/](http://www.giobio.ic.cz/obrazky/clovek/clovek/obehova_soustava/) (28.5.2011)

## 2.1.2 Vény

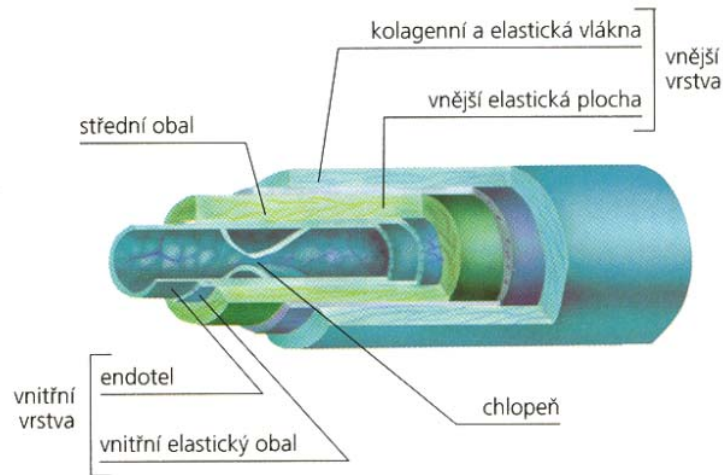
Stěny žil mají stejné tři vrstvy jako stěny tepen, od tepen se liší menší relativní tloušťkou vrstev a poměrem zastoupení jednotlivých tkáňových složek v nich (7).

Nejtlustší vrstvou stěny artérie je tunica media, zatímco u vén je to tunica adventitia. Podobně jako artérie, dělíme vény na na venuly a na malé, střední a velké vény.

**Venuly** jsou nejmenší cévy a představují sběrný systém krve z kapilár. Tunica intima je tvořena endotelem, pod kterým se nachází jen velmi málo subendotelového vaziva. Tunica media je velmi tenká a sestává se z několika málo vrstev hladkých svalových buněk. Tunica adventitia je nejtlustší vrstvou stěny venul a je složena z kolagenního vaziva (8,11).

**Malé a střední vény** měří v průměru 1 – 9 mm. Tunica intima je tvořena endotelem, subendotelová vrstvička je velmi tenká. Tunica media obsahuje ploché svazečky hladkých svalových buněk, mezi nimi nacházíme mnoho retikulárních vláken a jemnou síť elastických vláken. Tunica media je slabší než u artérií. Tunica adventitia je dobře vyvinutá, obsahuje mnoho kolagenních vláken a mohou se zde vyskytovat i hladké svalové buňky (8). V malých a středních vénách jsou vyvinuty chlopně, jsou to párové kapsovitě vychlípkovitě tunica intima tvořené elastickou vazivovou tkání, která je lemovaná po obou stranách endotelem. Chlopně se nejvíce nachází ve vénách dolních končetin, usměrňují tok krve směrem k srdci. Díky uspořádání hladkých svalových buněk v tunica adventitia a systému chlopní jsou vény schopny dopravovat krev proti působení gravitace zpět do srdce (8).

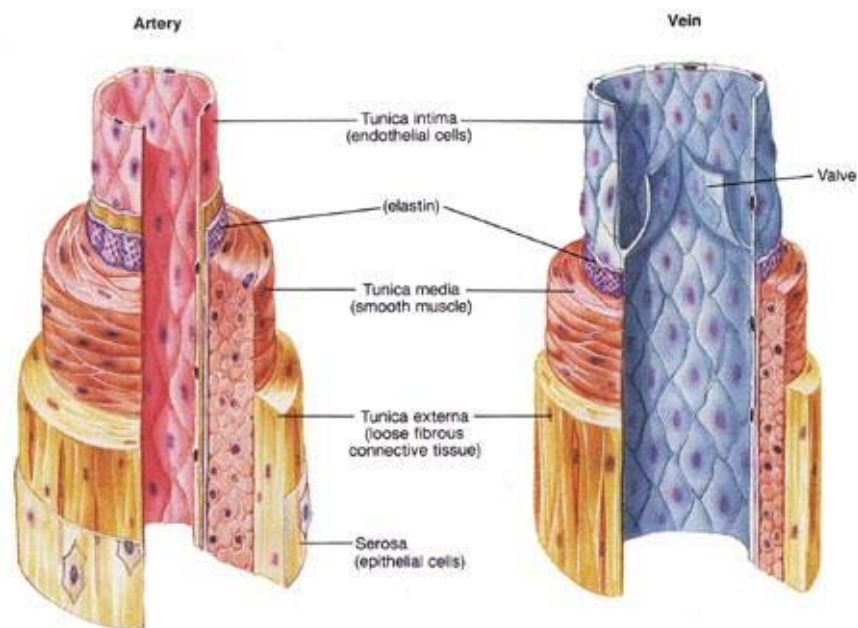
### Obrázek 3: Struktura vény



[http://www.giobio.ic.cz/obrazky/clovek/clovek/obehova\\_soustava/](http://www.giobio.ic.cz/obrazky/clovek/clovek/obehova_soustava/) (28.5.2011)

**Velké vény** – struktura jejich stěny se mění v závislosti na lokalizaci cévy v organismu. Tunica intima je dobře vyvinuta, tvoří ji endotel a subendotelová vrstva, ta je tlustší než u malých vén. Tunica media je tenká, obsahuje jen několik vrstviček hladkých svalových buněk, svalovina bývá více redukována, nachází se zde více tkáně vazivové. Tunica adventitia je nejtlustší vrstvou stěnou velkých vén. U těch, které leží pod úrovní srdce, obsahuje tunica adventitia svazky longitudinálně uspořádaných hladkých svalových buněk, tyto struktury zpevňují stěnu vén a zabraňují jejímu roztažení (8).

#### Obrázek 4: Porovnání struktury artérie a vény



<http://davidmullen.glogster.com/> (28.5.2011)

### 2.1.3 Kapiláry

Kapiláry jsou velmi úzké cévy, o průměru kolem 7  $\mu\text{m}$ , jejichž stěnu tvoří jen jediná vrstva endotelových buněk, k nim zvenčí přiléhá síť retikulárních vláken. Místy přiléhají na kapiláru zvenčí tzv. pericyty (proteiny s obsahem aktinu, myozinu a tropomyozinu), ty mohou být schopny určité kontrakce, představují první známku vývoje tunica media. Každý pericyt je obklopen svou vlastní bazální laminou a svými výběžky obemykají kapiláru. Šířka kapilár je proměnlivá, jejich nejběžnější průsvit odpovídá rozměru červených krvinek. Průsvit se mění jednak vlivem nervů (stejně jako průsvit arteriol), jednak přímým působením některých působků, např. adrenalin kapiláru zúží, histamin nebo oxid uhličitý ji rozšíří. Tenkými stěnami kapilár probíhá veškerá látková výměna v organismu (včetně výměny  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$  mezi krví a tkáněmi). Pro tuto výměnu je adaptovaná struktura endotelových buněk, které tvoří tenkou stěnu kapiláry (7,8,9).

Před systémem kapilár se nachází tzv. **prekapiláry**, ty jsou vystlány endotelovými buňkami a v jejich stěně můžeme najít nemnoho svalových buněk. Těsně před rozvětvením prekapilár

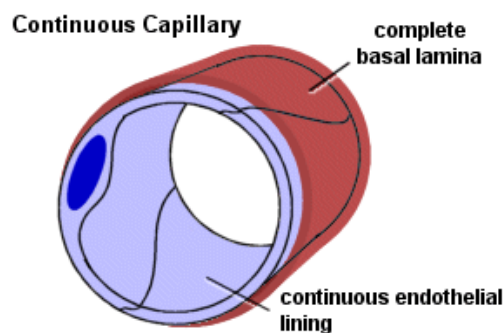
v jednotlivé kapiláry se nachází prstenec tvořený hladkými svalovými buňkami, který se nazývá *prekapilární sfinkter*. Kontrakce hladkých svalových buněk ve stěně prekapiláry reguluje průtok krve kapilárami, kontrakce prekapilárního sfinkteru může úplně uzavřít určitý úsek kapilárního řečiště.

Na konci kapilárního řečiště kapiláry pokračují jako tzv. **postkapiláry**, ty jsou širší, stejné stavby jako kapiláry a mají stejnou, místy i vyšší permeabilitu svých stěn ve srovnání s kapilárami. Postkapiláry pak pokračují do žil (7,8).

Podle struktury endotelových buněk a charakteru bazální laminy můžeme kapiláry rozdělit do 4 skupin. Rozeznáváme kapiláry se souvislou endotelovou výstelkou, fenestrované kapiláry, s póry a kapiláry sinusoidní (8).

**Kapiláry se souvislou výstelkou – somatického typu** jsou lemovány endotelovými buňkami, nejsou zde fenestrace ani póry. Buňky leží na kontinuální bazální lamině. Najdeme je v mozku či periferních nervech (8).

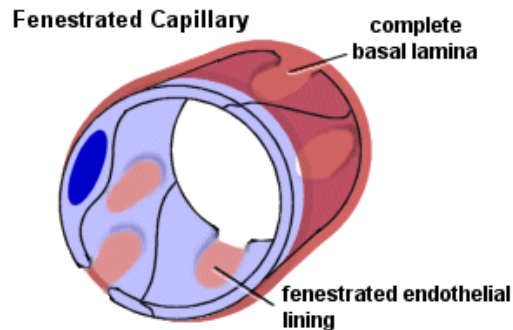
#### **Obrázek 5: Kapilára somatického typu**



<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Vascular/Vascular.htm> (30.5.2011)

**Kapiláry fenestrované – viscerálního typu**, jsou vystlány endotelovými buňkami, které mají ve svých výbězcích vytvořené fenestrace, jsou to otvory o průměru 60 – 80 nm v průměru, které jsou přepaženy diafragmou (membránou). Tyto kapiláry se nachází např. ve střevě a ve žlázách s vnitřní sekrecí - v orgánech kde dochází k rychlé výměně látek mezi krví a tkáněmi (8).

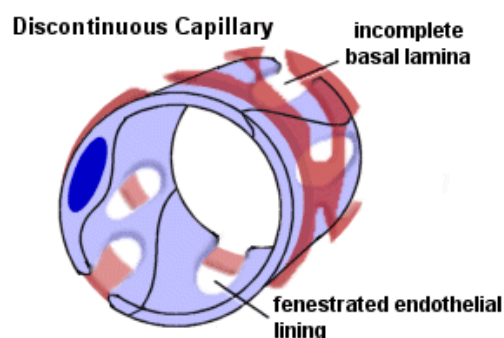
### Obrázek 6: Kapilára viscerálního typu



<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Vascular/Vascular.htm> (30.5.2011)

**Kapiláry s póry** jsou vystlány endotelovými buňkami, které mají ve svých výbězcích otvory, ty ale nejsou přepaženy diafragmou. Najdeme je v glomerulech ledvin.

### Obrázek 7: Kapilára s póry

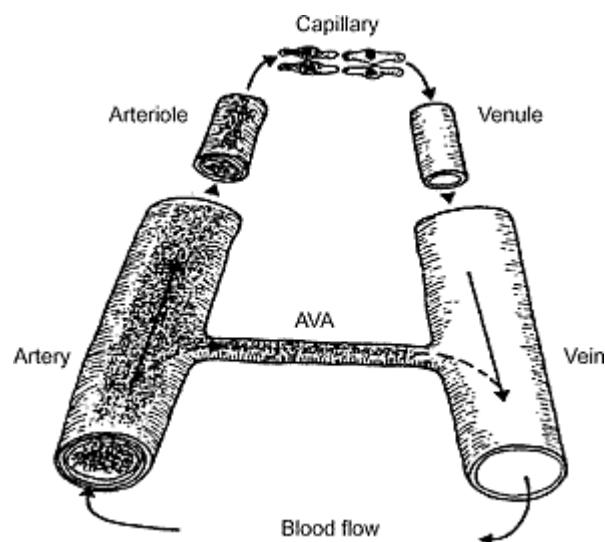


<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Vascular/Vascular.htm> (30.5.2011)

**Kapiláry sinusoidní – sinusoidy** mají nepravidelné lumen. Ve výbězcích endotelových buněk se nachází mnoho pórů a fenestrací. Bazální lamina není kontinuální. V okolí sinusoidních kapilár se vyskytují makrofágy. Najdeme je v játrech nebo kostní dřeni (8,9).

Kromě typického zapojení – artérie – kapilární síť – vény – existují také přímé komunikace mezi artériemi a vénami. Tato spojení se nazývají arteriovenózní anastomózy. Nacházíme je většinou mezi malými cévami. Arteriola, která přímo přechází do venuly, ztrácí membrana elastica interna a v její stěně přibývají koncentricky uspořádané hladké svalové buňky, kontrakcí této svalové vrstvy může dojít k dočasnému úplnému uzavření lumina cévy. Arteriovenózní anastomózy jsou bohatě zásobeny vegetativními nervovými vlákny. Zdá se, že jejich činnost je výhradně nervová. Arteriovenózní anastomózy hrají důležitou roli při regulaci krevní cirkulace v různých orgánech, termoregulaci a regulaci krevního tlaku (7,8).

**Obrázek 8: Zapojení cév**



[http://www.springerimages.com/Images/Biomedicine/1-10.1007\\_s00210-008-0322-7-1](http://www.springerimages.com/Images/Biomedicine/1-10.1007_s00210-008-0322-7-1)

(30.5.2011)

### 3. HYPERTENZE

#### 3.1 Definice a klasifikace

Vysoký krevní tlak je dle Světové zdravotnické organizace/mezinárodní společnosti pro hypertenzi (World Health Organisation/ International Society of Hypertension ) definován jako opakované zvýšení krevního tlaku nad 140/90 mmHg a to alespoň u dvou ze tří měření TK při minimálně dvou návštěvách lékaře (1,13). Evropská kardiologická společnost a Evropská společnost pro hypertenzi klasifikuje vysoký krevní do několika kategorií (1).

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

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

Podle orgánových komplikací hypertenzi klasifikujeme na:

**Stadium I** – prosté zvýšení TK bez orgánových změn, často bezpříznakové

**Stadium II** – přítomnost orgánových změn bez porušení jejich funkce, např. hypertrofie levé komory, proteinurie

**Stadium III** – těžší orgánové změny se selháváním jejich funkce, např. srdeční selhání, cévní mozkové příhody, retinopatie, neuroretinopatie

**Stadium IV** – maligní hypertenze, TK často nad 230/130 mmHg, dochází k rychlé progresi orgánových změn (13).

## 3.2 Etiopatogeneze

Etiopatogeneticky rozeznáváme **primární – esenciální hypertenzi** (95%), vzniklou z neznámé příčiny a **sekundární hypertenzi** (5 %), kdy je zvýšení TK důsledkem jiného, přesně definovaného patologického stavu, nejčastěji se jedná o renální a endokrinní hypertenzi a hypertenzi vyvolanou léky (1,14,13).

Esenciální hypertenze je multifaktoriální onemocnění, přesnou příčinu neznáme, známe však řadu faktorů, které se v patogenezi EH uplatňují (1).

### 3.2.1 Exogenní faktory

#### Genetické faktory

Při hypertenzi dochází k interakci několika genů a životního prostředí (15,17). Podíl genetických faktorů je odhadován asi na 30 % (16). Mezi geny, které ovlivňují vznik esenciální hypertenze, jsou zahrnovány geny pro různé složky systému renin – angiotensin - aldosteron, geny systému kalikrein - kinin a geny sympatického nervového systému. Bylo zjištěno, že hypertenze má velmi často familiární charakter (17).

#### Sůl

Sůl obsahuje přibližně 40 % sodíku ( $\text{Na}^+$ ) a 60 % chloru ( $\text{Cl}^-$ ). Sodík i chlor mají vliv na normální hladinu osmotického tlaku a správného množství vody v těle. V krevní plazmě pak spolu s draslíkem zajišťují hydrataci bílkovin a tím ovlivňují viskozitu krve. Přímá souvislost mezi vysokým krevním tlakem a zvýšeným příjmem sodíku je dnes zcela jednoznačná. Každý jedinec však může být jinak rezistentní na přísun sodíku. Odvod sodíku z těla ven regulují hlavně ledviny. Jejich nedostatečná funkce může být skrytou příčinou vzniku hypertenze (18,19,20).

#### Obezita

Pokles hmotnosti je provázen poklesem krevního tlaku. Tento účinek byl pozorován jak u mužů, tak u žen, u mladších i u starších nemocných při jakékoliv úrovni krevního tlaku, u obézních středního stupně i těžce obézních. Zvýšení tělesné hmotnosti je jeden z nejvíce rizikových faktorů arteriální hypertenze. Nemusí to být ale pravidlem, je totiž mnoho obézních osob, které mají hodnoty krevního tlaku normální (16,20).

## **Alkohol**

Pravidelné požívání 40g alkoholu nebo více za den zvyšuje riziko hypertenze. Mechanismem může být aktivace sympatického nervového systému a objemový efekt (16,20).

## **Stres**

Stres vede ke zvýšení krevního tlaku a tepové frekvence i u zdravých osob. U osob s genetickou predispozicí je presorická reakce na stres výraznější a trvá déle. Stres je nepochybně důležitým faktorem při vzniku hypertenze, ale jeho průkaz je v pozdějších stádiích daleko obtížnější (16).

## **Kouření**

Přímá souvislost mezi kouřením a vysokým krevním tlakem nebyla prokázána. S určitostí, ale můžeme říci, že kouření má negativní vliv na ischemickou chorobu srdeční (20).

### **3.2.2 Endogenní faktory**

V patogenezi esenciální hypertenze se kromě centrálního a periferního sympatoadrenálního nervového systému uplatňuje celá řada působků a metabolických odchylek (1). Dochází k poruše rovnováhy presorických a depresorických mechanismů (16).

#### **Presorické vlivy**

Mezi presorické působky řadíme katecholaminy – adrenalin, noradrenalin, renin – angiotenzinový systém, aldosteron, vazopresin a další látky uvolňované endotelem stěny cév, např. endotelin, tromboxan TXA<sub>2</sub> a jiné. Presorické působky stimulují růst svalstva cévní stěny a myokardu, některé zároveň vedou k retenci sodíku a vody (16).

#### **Depresorické vlivy**

Mezi depresorické působky patří kalikrein - kininový systém, dopamin, vazodilatační prostaglandiny PGE<sub>2</sub>, prostacyklin, atriální natriuretický peptid a endoteliální relaxační faktor (EDRF), uvolňovány cévním endotelem. Dilatační působky mají spíše diuretický účinek, např. natriuretický faktor uvolňovaný v síních srdce i komorách (1,16).

### **Autokrinní a parakrinní vlivy**

Cirkulující hormony mají systémový endokrinní účinek. Cévní endotel může měnit jejich účinek na stěnu cévy a také může uvolňovat celou řadu látek, z nichž jsou nejdůležitější endothelin s vazokontrikčním účinkem a oxid dusnatý s dilatačním účinkem. Tyto působky ovlivňují vazomotoriku cévy (1,16).

### **Změny transportních mechanismů elektrolytů**

Na patogenezi hypertenze se podílí i odchylky v elektrolytových transportních mechanismech přes buněčnou membránu. Jako je sodíková pumpa nebo Na – K kotransport, poruchy těchto mechanismů vedou ke zvýšení sodných iontů a druhotně vápníkových iontů intracelulárně, následkem je zvýšená citlivost hladkého svalstva cév vůči presorickým podnětům, vazokonstrikce a zvýšení krevního tlaku (1,16).

### **Ledviny**

Ledviny se na regulaci krevního tlaku podílí dvěma mechanismy, svou exretorickou funkcí ovlivňují sodíkovou a objemovou homeostázu a dále jako zdroj vazoaktivních působků a to hlavně působků renin – angiotenzin. Postižení ledvin vede ke zvýšení krevního tlaku a neléčená hypertenze zvyšuje riziko renálního selhání (1).

### **Porucha funkce autonomního nervového systému**

Díky dysfunkci autonomního nervového systému dochází ke zvýšené aktivitě sympatického nervového systému, to způsobí hyperdynamickou cirkulaci a ta má za následek zvýšenou srdeční frekvenci s hypertenzí (20).

### 3.3 Patofyziologie

Krevní tlak je udržován řadou fyziologických mechanismů, při jeho zvýšení dochází k odchylce od jednoho nebo více těchto mechanismů. Esenciální hypertenzi ovlivňují – srdeční výdej, periferní rezistence, systém renin – angiotensin – aldosteron (RAAS), sympatický nervový systém, a další faktory jako bradykinin, endotelin, oxid dusnatý, atriální natriuretický peptid aj. (15).

#### **Srdeční výdej a periferní cévní rezistence**

Krevní tlak je součinem minutového srdečního výdeje (množství krve, které jedna komora přečerpá za minutu) a periferní cévní rezistence. TK závisí na rovnováze mezi srdečním výdejem a periferní cévní rezistencí v arteriolárním řečišti a to hlavně na napětí hladkých svalů ve stěně malých arteriol. Při prolongované konstrikcii hladkého svalstva dojde ke strukturálním změnám ve stěně cév a tím ke zvýšení periferní cévní rezistence. Změny kontrakce hladkého svalstva jsou vyvolány prostřednictvím vápníkových kanálů, tedy vstupem a výstupem vápníku ze svalových buněk. Srdeční výdej závisí na frekvenci, kterou srdce tepe a na objemu krve v těle. K mechanismům, které vyvolávají systémovou cévní rezistenci patří neuro-hormonální faktory, cévní ředění a endoteliální dysfunkce, při které dochází ke snížení tvorby oxidu dusnatého a zvýšením oxidačního stresu (15,21).

#### **Systém renin – angiotenzin**

RAS představuje jeden z nejdůležitějších regulačních mechanismů v organismu, jeho hlavní funkcí je zesílení účinku sympatického nervového systému.

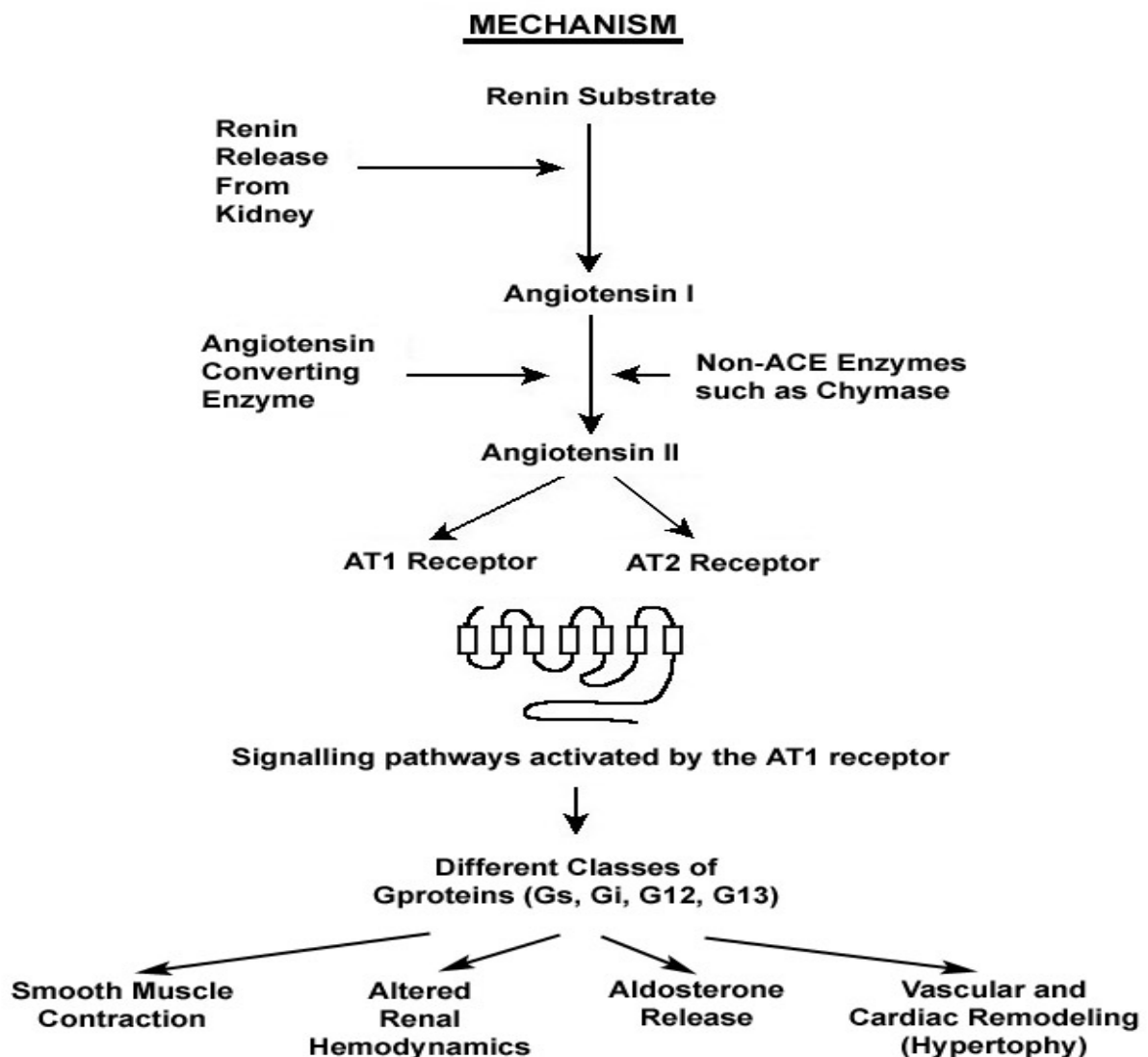
Primárním podnětem pro jeho aktivaci je vyplavení reninu z juxtaglomerulárních buněk ledvin. Syntéza **reninu** je ovlivněna především poklesem průtoku ve vas afferens, snížením přívodu chloridu sodného do macula densa distálního tubulu, aktivací  $\beta_1$ -adrenoreceptorů v oblasti juxtaglomerulárních buněk ledvin a prostaglandiny PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> (14,22).

**Renin** po uvolnění z ledvin působí na **angiotenzinogen**, což je alfa dva globulin, který vzniká v játrech, tak že ho rozštěpí na **angiotenzin I**. Cirkulující **angiotenzin I** se pomocí **angiotenzin konvertujícího enzymu (ACE)** mění na aktivní **angiotenzin II**, tato přeměna se uskuteční i alternativními cestami a to hlavně chymázovou cestou. **ACE** je identický s **kinázou II**, která štěpí **bradykinin** s vasodilatačním účinkem na neúčinné fragmenty.

**Angiotenzin II** vede k vazokonstrikci a stimulaci sekrece **aldosteronu** z kůry nadledvin, uvolnění aldosteronu vede k retenci sodíku a vody a ztrátám draslíku. Ke klinicky dominantním účinkům **Angiotenzinu II** dochází stimulací **AT<sub>1</sub>** receptorů.

Angiotenzin II má i renální účinek - způsobuje retenci vody a sodíku, stimuluje tvorbu prostaglandinů a podporuje uvolňování katecholaminů z nervových zakončení. V srdci pak podporuje vznik srdeční hypertrofie a vede ke koronární vazokonstrikci (14,23).

**Obrazek 9: Systém renin – angiotenzin**



[www.mc.uky.edu/.../pha824dr/pha824dr.html](http://www.mc.uky.edu/.../pha824dr/pha824dr.html) (31.5.2011)

### **Sympatický nervový systém**

Sympatický nervový systém je hlavním mediátorem akutních změn krevního tlaku a srdeční frekvence. Podílí se na vzniku a udržování arteriální hypertenze. Zvýšení sympatické aktivity se na hypertenzi podílí vazokonstrikcí, podporou retence sodíku ledvinami, trofickým účinkem na cévy a tím strukturálními změnami včetně hypertrofie levé srdeční komory a narušením iontového transportu (1).

### **Endotel a cévní stěna**

V počátečních i pozdějších stádiích hypertenze hraje důležitou roli tloušťka intimy a medie a poměr stěny cévy k šíři lumina, funkce cévního endotelu a hladkého svalstva cév. V tomto procesu se uplatňují především cirkulující vazokonstrikční katecholaminy, angiotenzin II, endotelin aj., cévní stěna hypertonika produkuje méně vasorelaxačního oxidu dusnatého a dochází k narušení vasoaktivní rovnováhy (1).

**Endotelin-1** je látka, která aktivuje receptory typu A (ETA) a tím způsobí vazokonstrikci a hypertenzi (24).

**Oxid dusnatý** je vytvářen cévním endotelem enzymem NO – syntézou při oxidaci aminokyselin L – argininu a L – citrulinu (25). V cévním endotelu NO – syntáza přeměňuje L – arginin na oxid dusnatý, který pomocí difúze přechází do hladké svaloviny, kde dojde k vasodilataci (26). Zajišťuje tedy bazální relaxaci artérií a arteriol (14), snižuje vasomotorické napětí a krevní tlak (27).

### **Ostatní humorální regulační faktory**

**Natriuretický peptid** je hormon, který hraje důležitou roli v regulaci vylučování sodíku a exkrece vody ledvinami. Dále vasorelaxační a antiproliferativní účinky (14).

**Bradykinin** patří mezi tkáňové hormony, působící hlavně v místě svého vzniku. Je složený z 9 aminokyselin a tvořený kalikrenin - kininovým systémem (kalikrein přeměňuje kininogen na kinin). Je degradován enzymem, který je totožný s ACE kinázou II na neaktivní fragmenty. Mezi jeho účinky patří vasodilatace, zvýšení cévní permeability a zvýšení diurézy (28).

### **3.4 Klinické symptomy**

Vysoký krevní tlak v počátku, a někdy po mnoho let nepůsobí žádné potíže, subjektivní příznaky často chybí nebo jsou nevýrazné, jedná se např. o bolest hlavy, zaujatost, palpitace nebo tlak na hrudi. Asi 1/3 osob o své hypertenzi vůbec neví. Neléčená hypertenze vede k orgánovým komplikacím a k orgánovému poškození (1).

#### **Hypertrofie levé srdeční komory**

Trvalejší zvýšení tlaku má za následek vznik hypertrofie levé komory srdeční, ta bývá často provázena známkami diastolické dysfunkce. Při hypertrofii dochází ke strukturálním změnám srdce na větší dotížení při zvýšené systémové cévní rezistenci. Díky zvýšenému napětí stěny myokardu dochází ke snížené systolické výkonnosti srdce. Na rozvoj napětí je třeba více energie než na kontrakci a svalová vlákna se zkrátí méně. Hypertrofie je tedy vlastně kompenzační proces, který pomáhá udržet systolickou funkci myokardu. Při hypertrofii hraje primární roli presorická zátěž, dalšími faktory podílející se na zvětšení levé komory jsou: pohlaví, genetické faktory, úroveň stimulace sympatoadrenergního systému, stimulace renin – angiotenzin systému, přívod soli, inzulinová rezistence, alkohol, obezita aj. (1).

#### **Ischemická choroba srdeční**

Hypertenze obecně zdvojnásobuje riziko kardiovaskulárních onemocnění a významně akceleruje rozvoj aterosklerózy. Vysoký krevní tlak způsobí větší napětí stěny cévy, díky tomu dojde ke změně struktury cévy – remodelaci. Ta je charakterizovaná zbytněním tunica media a jiným uspořádáním svalových vláken medie. Tloušťka cévní stěny se zvětší a cévní lumen zmenší, cévy tak postupně ztrácí schopnost vazodilatace a dochází ke zvyšování periferní cévní rezistence. Při proudění krve se zvyšuje stres vyvolaný strukturální změnou cévní stěny, díky tomuto může dojít k poškození endotelu. Vzniká tak předpoklad ke ztluštění intimy a vzniku aterosklerotických plátů, ty mohou postupně vést ke koronární nedostatečnosti (1,10,18). Častější výskyt ischemie myokardu u hypertoniků může mít i jiný důvod – nepoměr mezi přívodem kyslíku a požadavky srdečního svalu při hypertrofii levé komory. Protože ateroskleróza je difúzní proces postihující celý arteriální systém, lze si představit, že ateroskleróza může zásadním způsobem přispět k rozvoji nebo udržení hypertenze nebo jiných syndromů zvýšené vazoreaktivitu (24).

### **Cévní mozková příhoda**

Vysoký krevní tlak působí poškození drobných cév v mozku, díky tomu dochází ke špatnému prokrvení mozku a hypoxii (20).

### **Srdeční selhání**

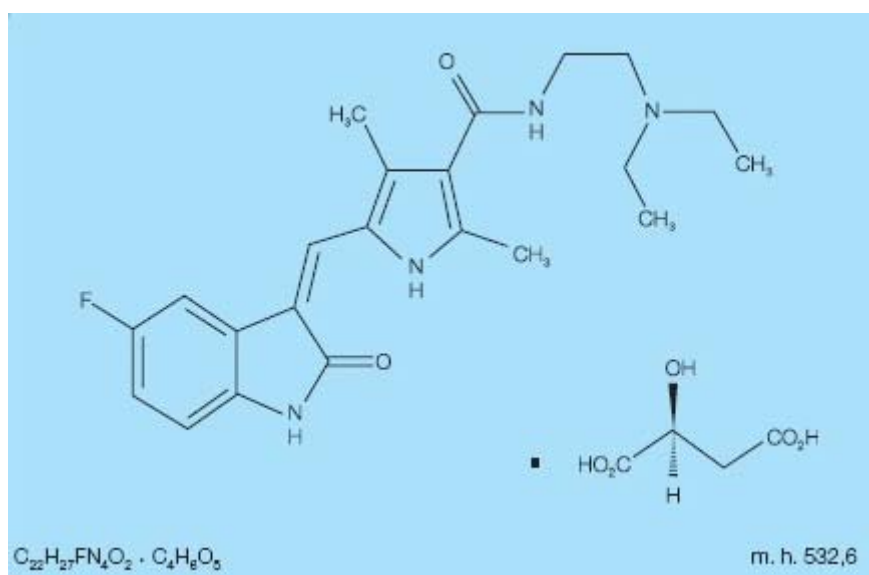
Při srdečním selhání není srdce schopno přečerpávat dostatečné množství krve, která je potřebná pro metabolismus tkání v organismu. U hypertenze vzniká dvojitým způsobem. Při prvním dochází ke vzniku hypertrofie levé srdeční komory s následnou diastolickou dysfunkcí, která vede k diastolickému srdečnímu selhání. Druhý způsob vede k systolickému srdečnímu selhání vznikem systolické dysfunkce při následné ICHS, hlavně infarktu myokardu (1).

## 4. SUNITINIB

### 4.1 Struktura a mechanismus účinku

Sunitinib je biologická látka ze skupiny tyrozinkinázových inhibitorů používaný v léčbě generalizovaného karcinomu ledviny a gastrointestinálních stromálních tumorů. Patří do farmakologické skupiny antineoplastika – inhibitory proteinkinázy (29,30).

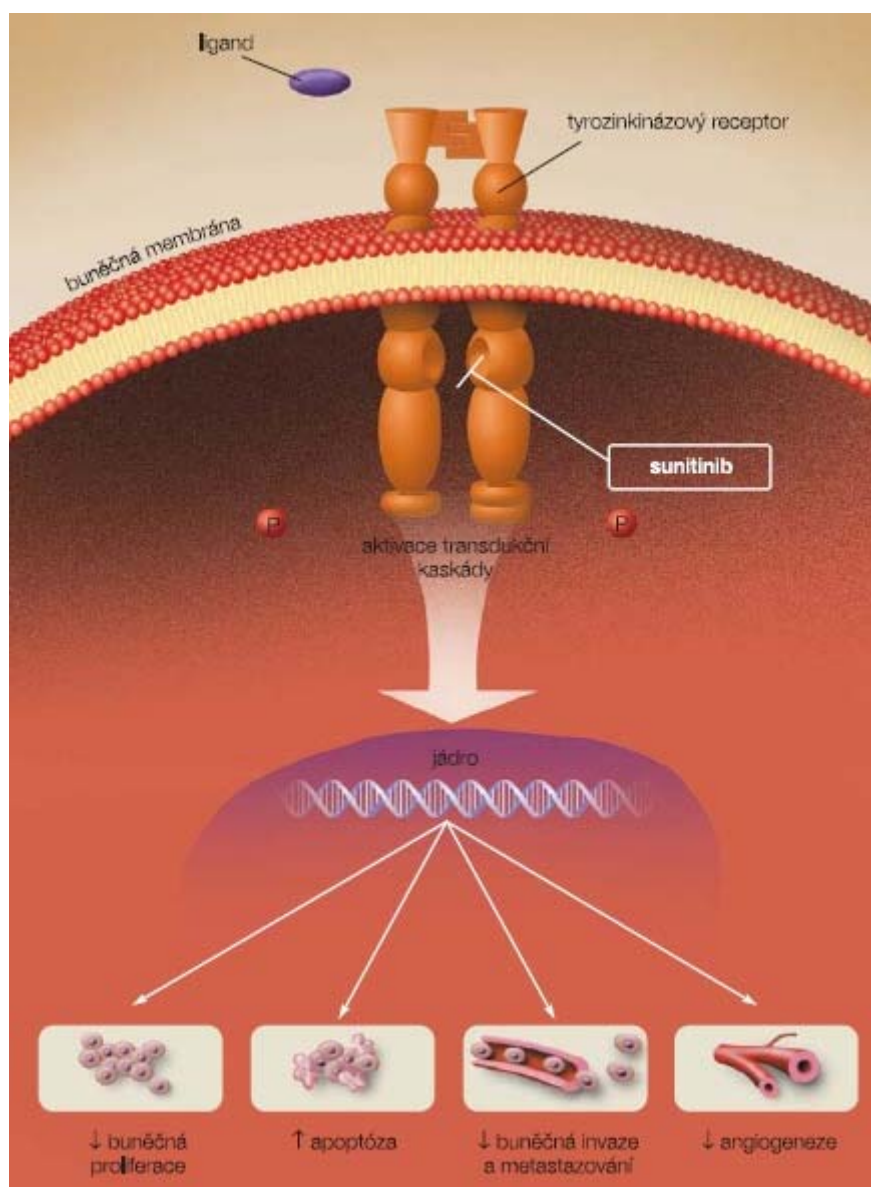
Obrázek 10: Chemický vzorec



<http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Sunitinib/6-I-jp.magarticle.aspx> (5.6.2011)

Tyrozinkinázy jsou buněčné enzymy, které umožňují vazbu fosfátovým skupinám na aminokyselinu tyrozin. Díky fosforylaci dojde k vazbě růstových faktorů (např. hormonů, růstových proteinů) a tím ke spuštění kaskády přenosu signálu ze zevního prostředí buňky k jejímu jádru. Zdrojem fosfátu pro kinázy je adenosin trifosfát (ATP), pokud se ale na tyto enzymy naváže místo ATP příslušný inhibitor, k fosforylaci proteinů nedojde a přenos signálu se přeruší. Inhibitory tyrozinkinázy působí cíleně na specifické receptory nádorové buňky a umějí zasáhnout několik cílů najednou. Dále brzdí neoangiogenezi (novotvorbu cév) a tím snižují krevní zásobení nádorových buněk, schopnost proliferace a růstu a zvyšují apoptózu (29,30).

**Obrázek 11: Mechanismus účinku**

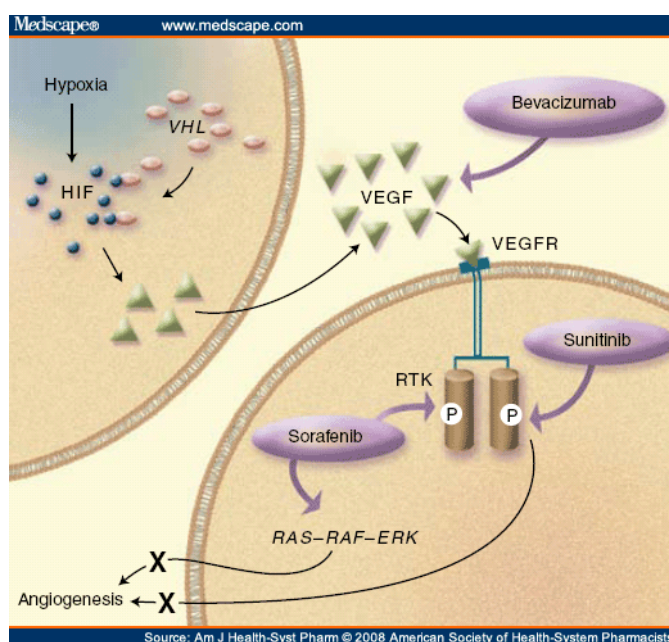


<http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Sunitinib/6-I-jp.magarticle.aspx> (5.6.2011)

Sunitinib inhibuje tyrozinkinázoové receptory (RTKs) pro růstový faktor z destiček (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) (31,32).

VEGF je stimulátor růstu endoteliálních cév, který na povrchu endoteliálních buněk aktivuje tyrozinkinázy a tím reguluje růst normálních i patologických cév (33). PDGFR najdeme v trombocytech, při jejich aktivaci se uvolní. Kromě destiček je obsažen i v dalších buňkách (makrofágy, hladký sval, fibroblasty, nádorové buňky). Má výrazný proliferační účinek na buňky mezenchymového původu, má rovněž chemoatraktivní a angiogenetické účinky. Stimuluje k proliferaci buňky (34). Sunitinib v nádorové buňce působí proti nim tak, že vyvolává utlumení nádoru a inhibici jeho růstu (33).

### Obrázek 12: Tyrozinkinázové receptory



<http://www.medscape.com/viewarticle/571655> (6.6.2011)

Sunitinib je metabolizován enzymem cytochromu P450 na primární aktivní metabolit desethyl-sunitinib, tento je dále metabolizován rovněž enzymem CYP3A4. Sunitinib a desethyl-sunitinib se váží na lidské plazmatické proteiny (24). Podání sunitinibu s induktory (rifampin, dexamethason, fenobarbital aj) enzymu CYP3A4 může snižovat jeho plazmatické koncentrace a naopak současné podání s inhibitory (ketokonazol, klaritromycin, ritonavir aj.) enzymu CYP3A4 může jeho plazmatické koncentrace zvýšit (29,30).

Nejčastějšími pozorovanými nežádoucími účinky spojenými s podáváním sunitinibu byly celkové symptomy jako únavnost, gastrointestinální symptomy - nevolnost, průjemy, stomatitida, dyspepsie, dermatologické projevy - dermatitida, kožní diskolorace, vlasová

depigmentace, myelosuprese, neutropenie, trombocytopenie a *hypertenze*. Dále hepatitida a jaterní selhání, embolie, krvácení do tumoru aj. (33,34).

## 4.2 Sunitinib a hypertenze

Hypertenze je jedním z hlavních nežádoucích účinků hlášených ve třetí fázi klinických studií, které srovnávaly sunitinib s jinými léčivými látkami používanými v léčbě renálního buněčného karcinomu. Mezi pacienty, kteří užívali sunitinib byla incidence hypertenze různých stupňů 21,6%, u 6,8 % z nich bylo signifikantně zvýšené riziko vysokého stupně hypertenze. Hypertenze vyvolaná sunitinibem se nejčastěji vyskytovala na začátku léčby a v prvním roce léčby. Klinickými projevy bylo zvýšení systolického tlaku o 20% a diastolického o 10%. Incidence a závažnost hypertenze je závislá na použitém schématu léčby, věku pacientů a přítomnosti souběžných srdečních onemocnění. Nedostatečně kontrolovaná hypertenze může vézt k závažné kardiovaskulární příhodě.

Hypertenze způsobená sunitinibem má pravděpodobně souvislost s nárůstem systémové cévní rezistence, kdy dochází k poruše angiogeneze, snížení počtu arteriol a kapilár, pružnosti cév, aktivity oxidu dusnatého a zvýšení VEGF v plazmě (35). Snížením aktivity VEGF dráhy může dojít ke snížené biologické dostupnosti oxidu dusnatého. Zmenšením plochy cévy dochází ke zvýšení periferní cévní rezistence a podpoře rozvoje hypertenze (36).

Sunitinib působí dvěma mechanismy. A to buď zablokováním extracelulární vazby vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) k jeho receptoru (VEGFR) pomocí anti-VEGF protilátek nebo zablokováním intracelulární signální dráhy receptoru pro VEGF potlačením přenosu signálu přes tyrozinkinázový receptor. 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 inhibiči účinku VEGFR a PDGFR, které vedou k poškození endotelu kapiláry (37). Nejnovější studie předpokládají, že down regulace nebo neutralizace cirkulujícího VEGF může přispívat k indukci hypertenze.

Pacienti, kteří užívají sunitinib by měli být sledováni pro hypertenzi nejlépe v domácích podmínkách, zejména v průběhu prvních šesti týdnů léčby. Před zahájením léčby je nutno provést vhodnou kontrolu arteriálního tlaku, u pacientů se zvýšeným tlakem by měla být zahájena standardní antihypertenzivní terapie (38).

## 5. SPONTÁNNĚ HYPERTENZNÍ POTKANI (SHR POTKANI)

Nejvíce používanými modely kardiovaskulárního onemocnění jsou spontánně hypertenzní potkani (SHR) široce používaní po dobu téměř 30let. SHR potkani jsou potomky samice se zvýšeným krevním tlakem a mužského Wistar potkana z Kyótské kolonie se spontánní hypertenzí. Jejich potomci se páří bratr x sestra, vzniká tak imbrední kmen potkanů s krevním tlakem nad 150mmHg trvajícím déle než jeden měsíc - SHRs potomci.

*In vivo* studie ukázaly, že v raném stádiu hypertenze mají SHR potkani vyšší srdeční výdej a normální periferní resistenci, s progredující nemocí se hypertenze mění na trvalý stav s normálním srdečním výdejem, ale zvýšeným periferním odporem v hypertrofovaných cévách (39). Jako normotenzní kontrola se používají potkani kmene Wistar Kotyo (WKY).

Jako model lidské hypertenze se používá samec SHR potkana, u lidí se hypertenze vyvíjí rychleji u mužů než u žen a stejně tak je tomu u SHR potkanů. Spontánně hypertenzní potkan (samec) může být použit i jako model pro zkoumání některých z možných příčin lidské hypertenze, a také pro studium hypertenzí indukovaných změn v signálních procesech nebo testování nových antihypertenziv. Výhoda SHR modelu spočívá také v podobné progresi onemocnění jako u lidí – pre-hypertenzní fáze je následována fází rozvoje hypertenze a fází trvalé hypertenze, přičemž každá fáze trvá minimálně několik týdnů (40,41).

Protože jsou mezi lidmi rozdíly ve dvou spouštěcích prvcích a to polygenetické predispozici a faktorech zevního prostředí, je obtížné lidskou hypertenzi studovat. Principy, které se v patogenezi vysokého krevního tlaku u lidí a potkanů uplatňují, jsou ale velice podobné.

## 6. PECAM – 1

Platelet endothelial cell adhesion molecule – 1 (PECAM – 1, CD 31) je adhezní a signální molekula, exprimovaná na hematopoetických a endoteliálních buňkách.

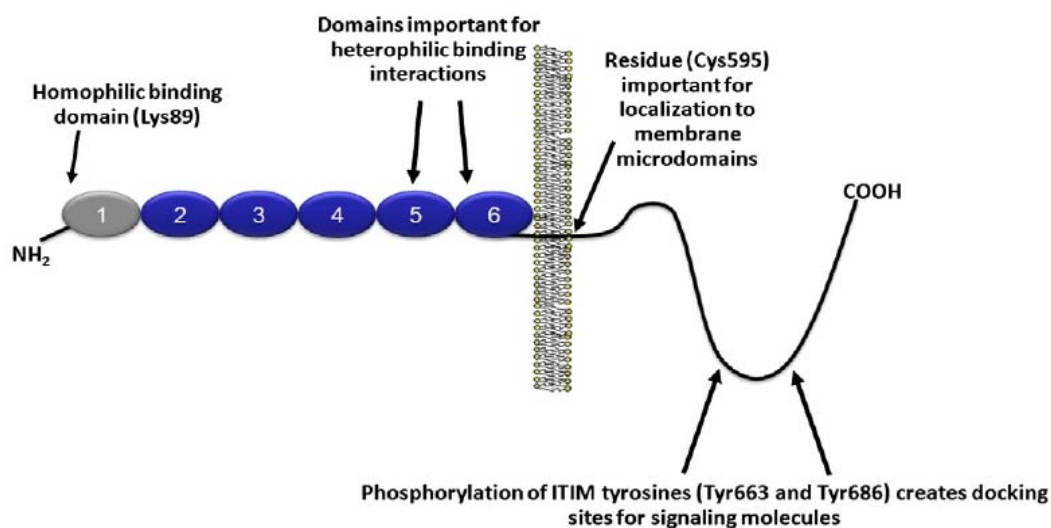
Strukturně je členem imunoglobulinové „superrodiny“ adhezních molekul. Exprimuje se na většině buněk hematopoetického systému včetně destiček, monocytů, neutrofilů a lymfocytech (42,43). Výrazně se exprimuje také na endoteliálních buňkách, kde tvoří hlavní složku cévní stěny (44,45).

PECAM – 1 je transmembránový glykoprotein, skládající se z extracelulární části se šesti imunoglobulinu podobným doménám, transmembránové domény a cytoplazmatického ukončení (46).

Extracelulární doména 1 obsahuje části důležité pro homofilní interakce PECAM – 1 / PECAM – 1 (47). Většina heterofilních vazebných interakcí je pravděpodobně zprostředkováná dusíkatými zbytky lokalizovanými v Ig homologní doméně 5 a 6. Jediný heterofilně se vázající partner PECAM – 1 s fyziologicky relevantním významem je neutrofilní specifický antigen CD 177 (48). Ostatní heterofilně se vázající molekuly zůstávají zatím nedostatečně prozkoumané (glykosaminoglykany CD 38 na lymfocytech a integriny) (49,50). Cytoplazmatické ukončení PECAM -1 obsahuje zbytky umožňující potenciální místo fosforylace, palmitoylace a ukotvení cytosolických signálních molekul (46). Nejlépe popsanou částí PECAM – 1 cytosolické domény jsou dvě vazebná místa pro inhibitory tyrozinových imunoreceptorů Tyr 663 a Tyr 686. Důležitou roli v regulaci buněčné signalizace hraje další zbytek cytoplazmatické domény (Cys 595), který slouží jako subjekt posttranslační modifikace a při palmytoylaci může nasměrovat PECAM – 1 k membránové mikrodoméně (51).

Díky expresi PECAMU – 1 na vaskulárních a hematopoetických buňkách a signalizační a adhezivní schopnosti hraje PECAM – 1 hlavní roli v zánětlivém procesu. Podle nedávných výzkumů má PECAM – 1 prozánětlivou i protizánětlivou roli.

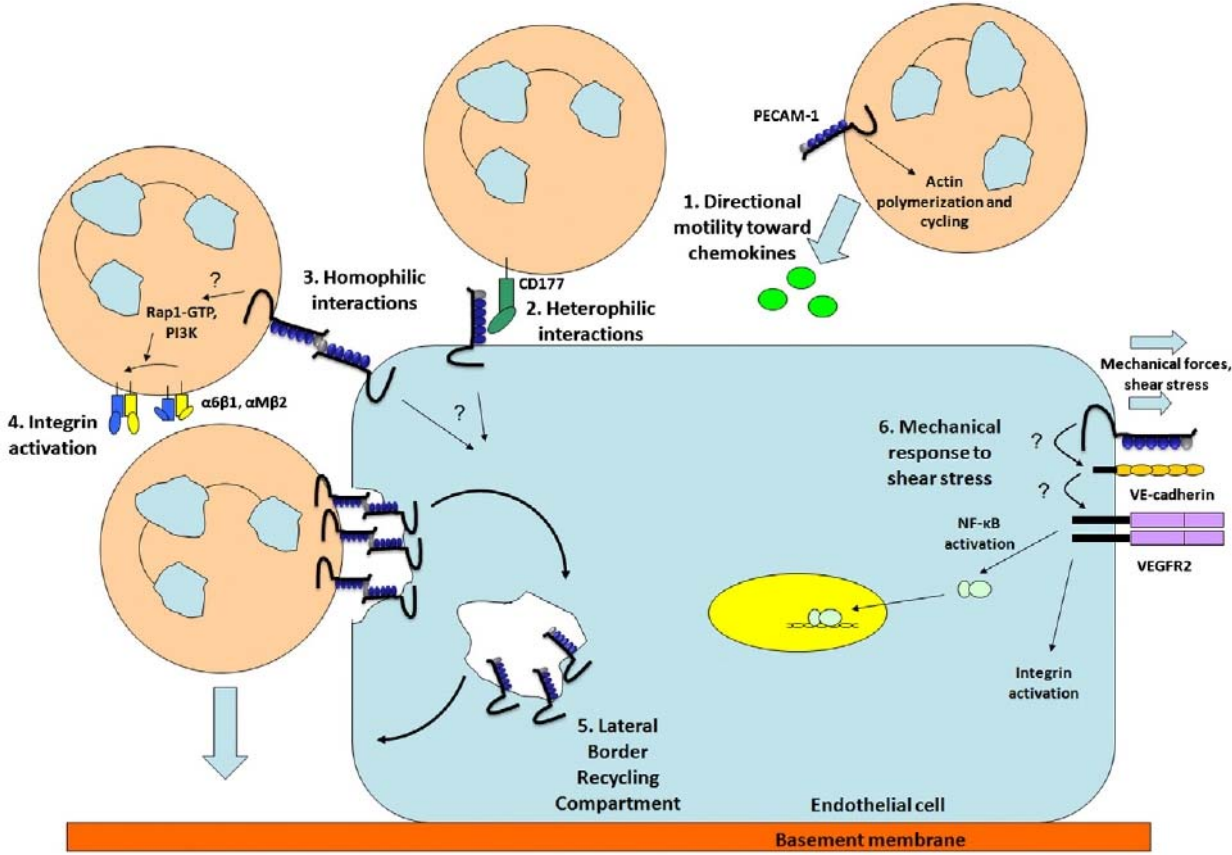
Obrázek 13: Struktura PECAM – 1 (54)



## 6.1 Prozánětlivý účinek

V literatuře je dobře popsáno, že PECAM – 1 je velmi důležitý pro proces leukocytární transeendoteliální migrace. PECAM – 1 usnadňuje leukocytární migraci pomocí adhezivní interakce, aktivace integrinů a modulace LBRC koloběhu. Přesné mechanismy tohoto usnadnění nejsou zatím přesně známy. PECAM – 1 také prokázal účinek jako přenašeč usnadňující odpověď endoteliální buňky na námahový stres (52). PECAM – 1 aktivuje prozánětlivou transkripci faktoru Nfkb, čímž může usnadnit aterosklerotický proces v cévním endotelu vystavenému námahovému stresu. Další oblastí pro výzkum zůstává otázka jak PECAM – 1, rozezná tento mechanický stres a zapojí ho do signalizace (52).

Obrázek 14: Prozánětlivý účinek (54)



## 6.2 Protizánětlivý účinek

PECAM – 1 je schopen zmírnit aktivaci leukocytů pomocí posílení inhibitorové fosfatázy na cytoplazmatická vazebná místa pro tyrozinové imunoreceptory.

PECAM – 1 také zmírňuje prozánětlivou produkci cytokinů a obnovuje integritu vaskulární bariéry pomocí zatím neznámého mechanismu (53).

Na úrovni celého organismu má souhra pro - a protizánětlivých funkcí PECAMu význam pro tvorbu a rozvoj aterosklerotických lézí, ale také pro ochranu před progresí těchto lézí. V budoucích studiích by bylo potřeba stanovit, která z těchto biologických funkcí PECAM - 1 převažuje a zda-li exprese specifické isoformy PECAMu – 1 anebo genetická rozdílnost použitých myších kmenů ovlivňuje tyto procesy. Bližší pochopení účasti PECAMu na zánětlivých odpovědích organismu může přinést nový pohled do biologie zánětu a také pomoci odhalit nové terapeutické možnosti léčby akutních a chronických zánětlivých onemocnění (54).

## **7. CÍL PRÁCE**

Cílem této práce bylo zjistit a popsat expresi endoteliální PECAM-1 v aortě u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) a jejich normotenzních kontrol (WKY potkanů) s ohledem na podávání léčiva sunitinibu za použití imunohistochemických metod a vyhodnocení pomocí stereologických metod.

## 8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 8.1 Použitá zvířata

V experimentu byly použity dva kmeny potkanů. Prvním z nich byl inbrední kmen spontánně hypertenzních potkanů - SHR a druhým inbrední kmen WKY potkanů s normotenzí. Oba kmeny byly rozděleny do dvou skupin. První skupině byl podáván sunitinib a druhé voda, která byla použita jako kontrola.

SHR potkanům byly sunitinib a voda podávány každý den po dobu 8 týdnů, následovala pauza 5 dnů k zotavení potkanů z celkové toxicity. Po 5 denní pauze byly léčivo a voda znovu podávány 8 týdnů (schéma: 8 týdnů / 5 dnů pauza / 8 týdnů). U tohoto kmene došlo po podávání sunitinibu k nárůstu tělesné hmotnosti.

WKY potkanům byla voda a sunitinib podávány obdobným způsobem, tedy 8 týdnů každý den, 5 dnů pauza na zotavení a 2 týdny podávání sunitinibu a vody (schéma: 8 týdnů / 5 dnů pauza / 2 týdny). U tohoto kmene došlo k úbytku váhy a silné celkové toxicitě, proto bylo podávání sunitinibu ukončeno.

### 8.2 Imunohistochemie

Imunohistochemická barvení byla provedena na pravých femorálních artériích potkanů. Tyto preparáty byly ponořeny do zmrazovacího média (tissue freezing medium) (Leica, Praha, Česká Republika), poté následovalo zmrazení v tekutém dusíku a uskladnění při minus 80°C. Pro detekci exprese PECAM - 1 byla použita metodika En Vision s detekcí pomocí DAB, tento vytváří v místě detekce antigenu hnědou barevnou reakci ve tkáni.

#### Pracovní postup – En Vision

Zmražené tkáňové řezy na sklíčku byly nejdříve 30 minut sušeny na vzduchu. Poté se na 30 minut vložily do roztoku acetonu, který byl uchovávaný v minus 20°C. Následně se řezy nechaly 30 minut sušit. Tímto došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Následovalo sušení a vložení sklíčka s řezy do fosfátového pufru (roztok PBS) na 5 minut.

Než jsme nanесли primární protilátku museli jsme 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 PECAM - 1 použít primární protilátka PECAM-1 rabbit anti-rat (Santa Cruz Biotechnology), naředěná v BSA v poměru 1/100. Inkubace

s primární protilátkou probíhala 60 minut. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut) a následně na 15 minut do 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Po oplachu v roztoku PBS (2x5 minut) jsme nanесли sekundární protilátku Anti rabbit - HRP (Dako). Inkubace trvala 30 minut. Sklíčka s řezy se opět opláchly roztokem PBS (2x5 minut). Pro vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu jsme použili chromogen diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, Dako, Carpinteria, USA). Vizualizace trvala 45 sekund. Nakonec jsme řezy opláchli v roztoku PBS.

Po dobarvení jader v hematoxylinu po dobu 10 sekund následovalo modránění pod tekoucí vodou z kohoutku (1 minuta).

Na závěr jsme sklíčka s řezy opláchli v acetonu a odvodnili v aceton-xyleny (10:1) a aceton-xyleny (1:10). Oba procesy trvaly 3 minuty. Poslední úkonem byl oplach v xyleny (3 x 2 minuty). Následně jsme sklíčka zamontovali do Eukitu.

### 8.3 Kvantitativní analýza imunohistochemie

Plocha velikosti endoteliální exprese PECAM-1 byla kvantifikována pomocí stereologických metod (55). Nejprve se nakrájela série 50 řezů o tloušťce 7 $\mu$ m. Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé barvení byl vybrán náhodně a pak se vybral každý 5. řez, takže se hodnotilo pět řezů pro expresi PECAM-1. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 100 průsečíků mezi body sítě a pozitivitou PECAM-1 barvení na jednu cévu. Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočetla podle vzorce:

$$\text{estA} = a * P,$$

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

Fotodokumentace a digitalizace snímků z fluorescenčního mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA) za pomoci softwaru NIS elements verze 3.22 (Laboratory Imaging Prague, Česká republika). Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

## 8.4 Statistická analýza

Hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM (střední chyba průměru) pro 6 zvířat v každé skupině. K 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**

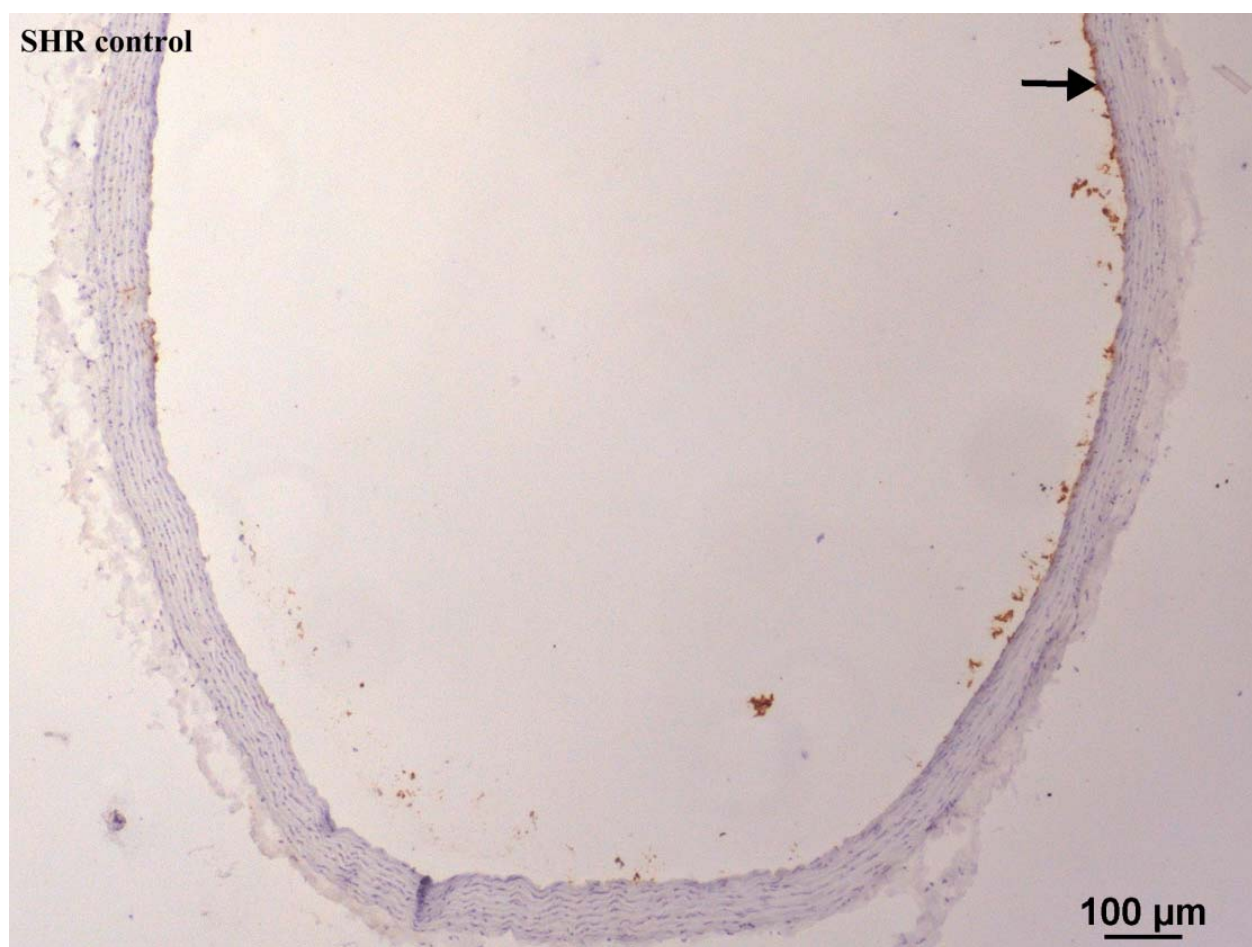
### **9.1 Imunohistochemické barvení PECAM-1 v pravé femorální tepně**

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 PECAM-1 pouze u endoteliálních buněk cévního lumina. Částečná exprese byla ještě detekována také v cévách adventitia.

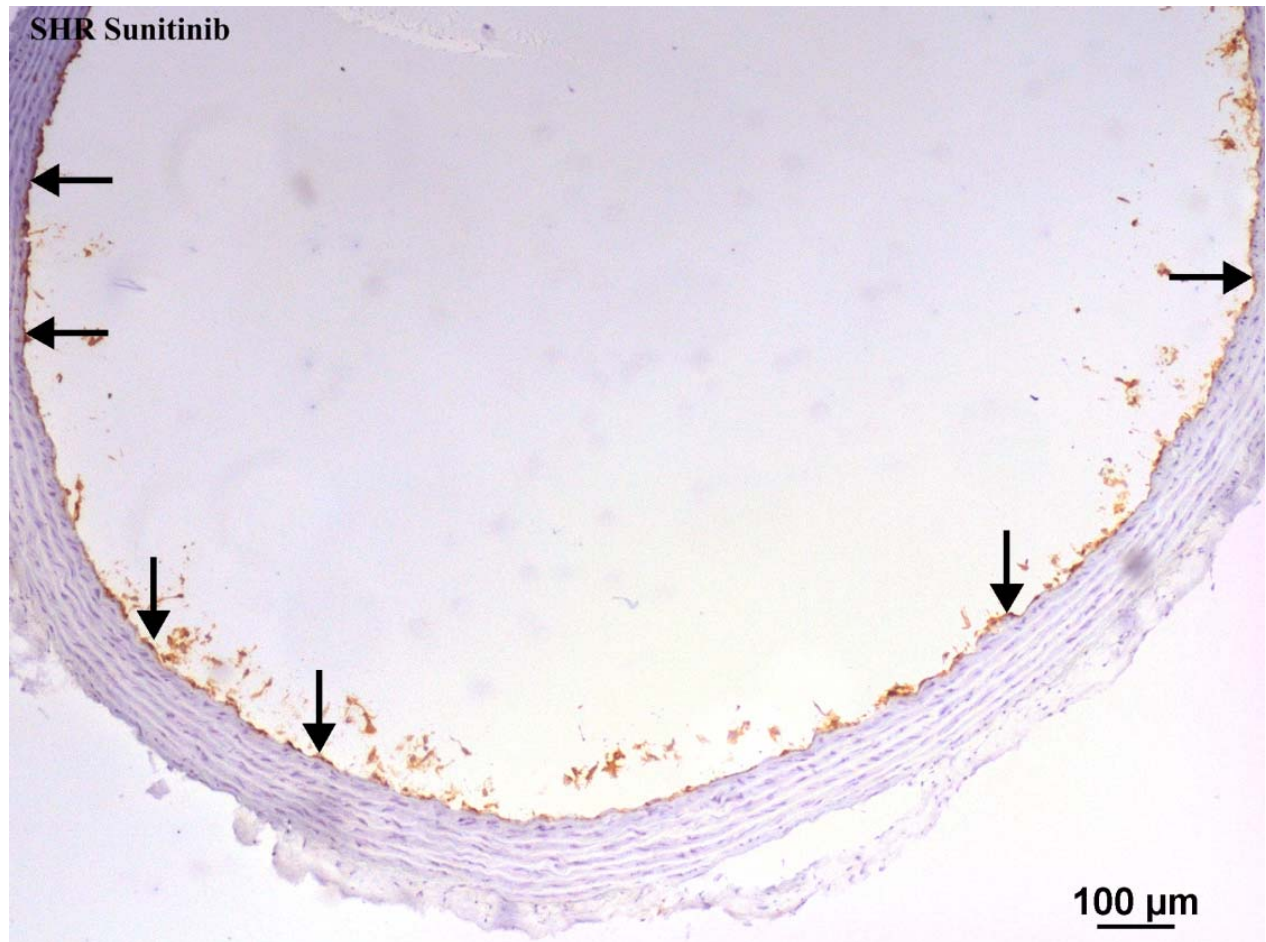
Pozitivní reakce na barvení PECAM - 1 byla zjištěna v téměř každé testované cévě ve všech 4 skupinách zvířat. Podávání sunitinibu vedlo k jistým změnám intenzity a plochy exprese PECAM-1. Podávání sunitinibu vedlo ke zvýšení exprese PECAM-1 (hodnoceno pouze vizuálně) jak u SHR potkanů (obr. 15) tak i u WKY potkanů (obr. 17). Tyto výsledky byly dále podrobeny kvantifikační stereologické analýze.

Obr. 15 – 16: Reprezentativní obrázky preparátů po imunohistochemickém barvení exprese PECAM-1 u SHR potkanů. Exprese PECAM-1 byla detekována pouze u endoteliálních buněk cévního lumina (šipky). Vizuální hodnocení exprese PECAM-1 naznačuje vyšší expresi tohoto markeru po podávání Sunitinibu. Zvětšeno 40x.

**Obrázek 15 : Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení PECAM-1 u SHR potkanů bez Sunitinibu (kontrola).**

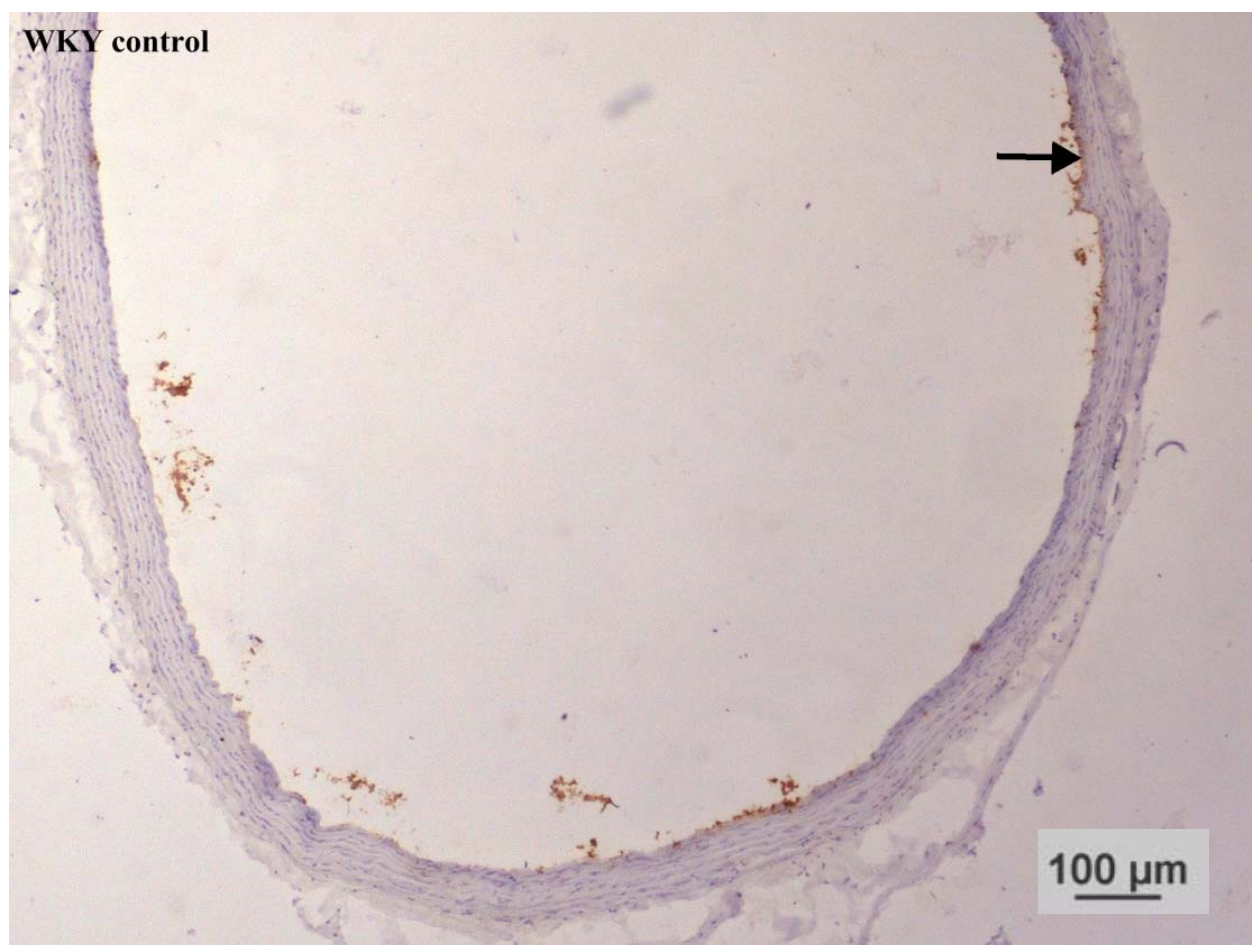


**Obrázek 16: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení PECAM-1 u SHR potkanů po podání Sunitinibu.**

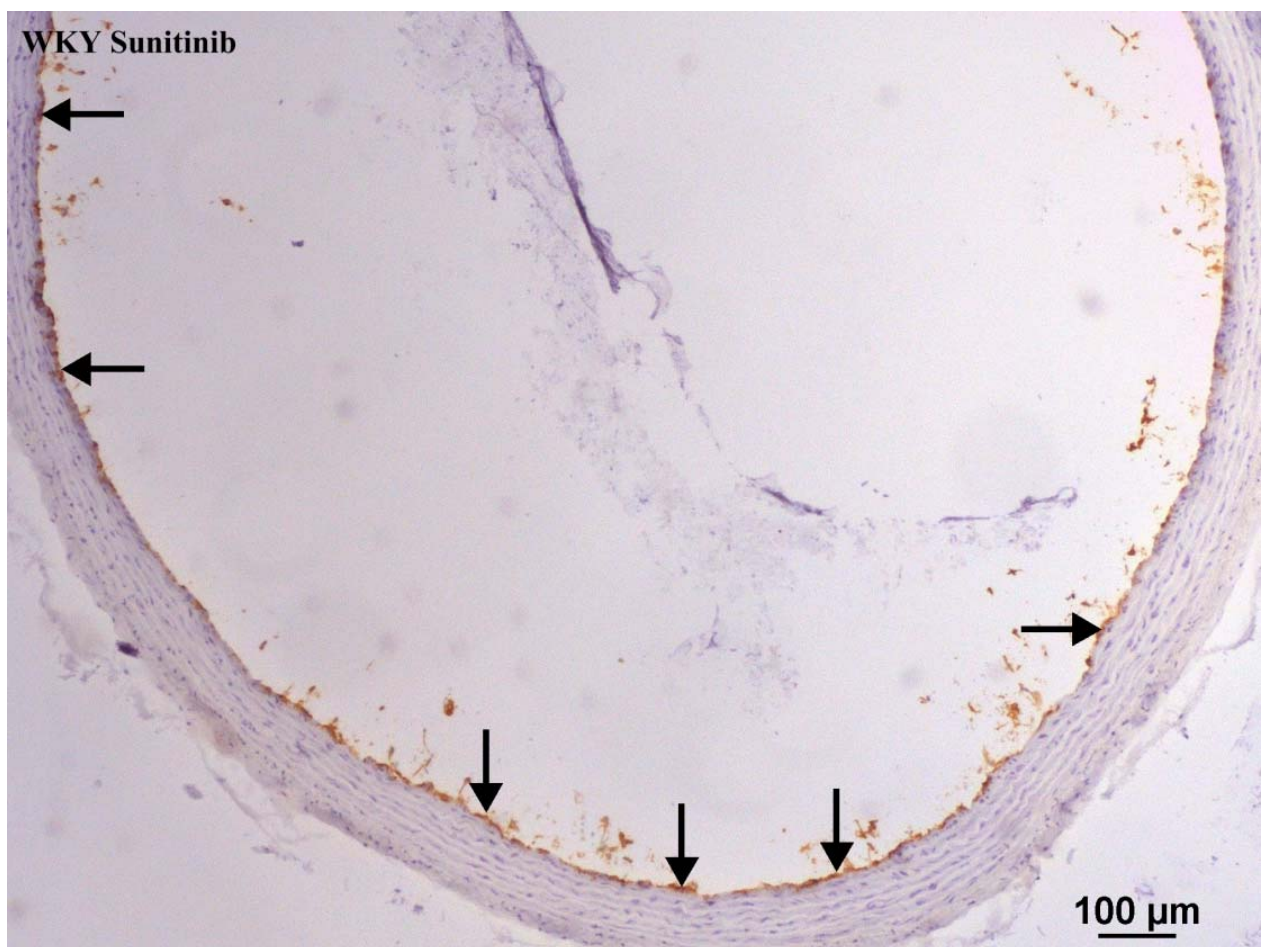


Obr 17 – 18: Reprezentativní obrázky preparátů po imunohistochemickém barvení exprese PECAM-1 v aortě u WKY potkanů. Expresce PECAM-1 byla detekována opět pouze u endoteliálních buněk obou skupinách (šipky). I zde se zdá, že exprese PECAM-1 je výraznější po podávání Sunitinibu. Zvětšeno 40x.

**Obrázek 17: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení PECAM-1 u WKY potkanů bez Sunitinibu (kontrola).**



**Obrázek 18 : Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení PECAM-1 u WKY potkanů po podání Sunitinibu.**



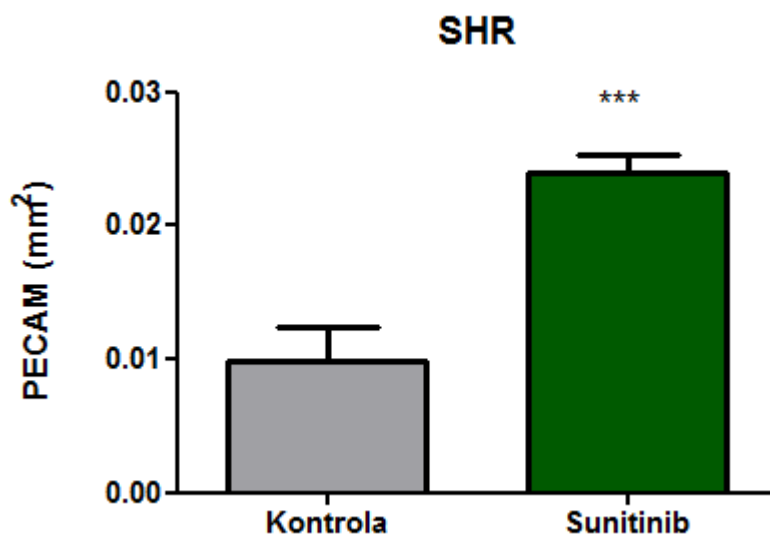
## 9.2 Stereologická analýza exprese PECAM-1 v aortě

Stereologická analýza PECAM-1 byla provedena za účelem kvantifikace exprese PECAM-1 na cévním endotelu s cílem statisticky vyhodnotit imunohistochemické barvení u SHR a WKY potkanů.

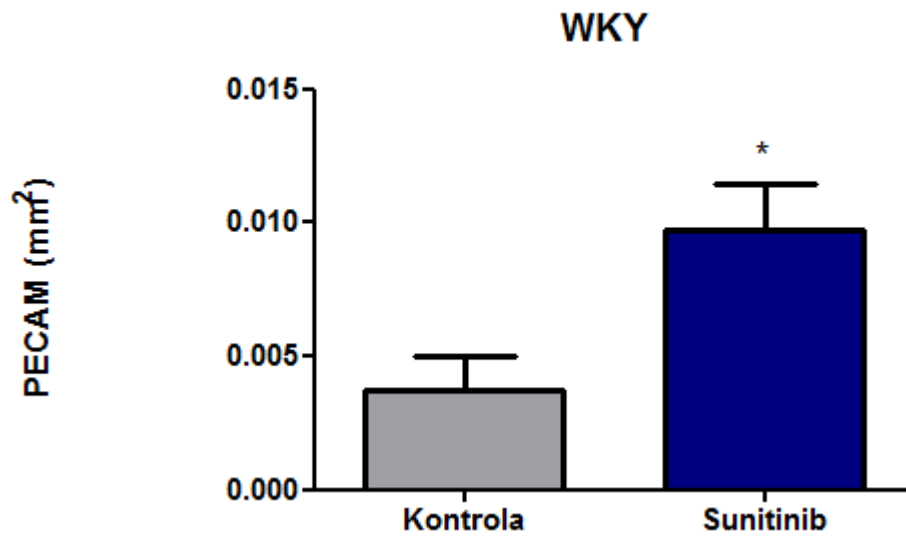
Stereologická analýza exprese PECAM-1u SHR potkanů prokázala statisticky významný nárůst exprese PECAM-1 po podávání Sunitinibu (graf 1). Podobně výsledky byly zjištěny i při kvantifikaci exprese PECAM-1 u WKY potkanů, kde byla rovněž nalezena signifikantně zvýšená exprese PECAM-1 po podání Sunitibu (graf 2).

Srovnáním exprese mezi kmeny SHR a WKY bez podávání Sunitinibu jsme našli významný trend z hlediska nárůstu exprese PECAM-1 u SHR potkanů nicméně tento nárůst nebyl statisticky významný (graf 3).

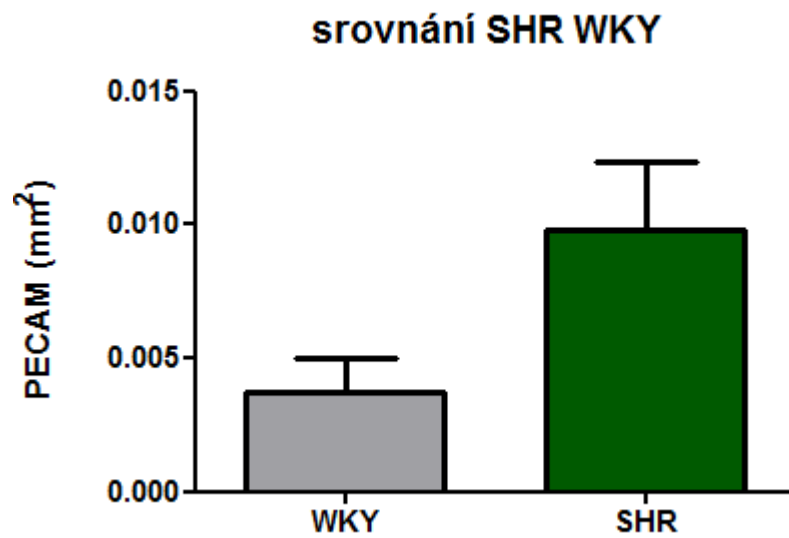
**Graf 1: Stereologická analýza exprese PECAM-1u SHR potkanů. \*\*\*P < 0.001.**



Graf 2: Stereologická analýza exprese PECAM-1u WKY potkanů. \*P < 0.05.



Graf 3: Stereologická analýza exprese PECAM-1 u SHR a WKY potkanů.



## 10. DISKUSE

Sunitinib a jeho aktivní metabolit (SU012662) jsou selektivními inhibitory skupiny tyrozinkinázových receptorů spojených s růstem tumoru a angiogenezí. Sunitinib je používán v léčbě gastrointestinálních stromálních tumorů (GIST) u pacientů s progresí onemocnění, anebo u pacientů netolerujících léčbu imatinibem (56). Sunitinib prokázal protinádorovou aktivitu také u pacientů s pokročilým buněčným karcinomem ledvin (RCC), u kterých nebyla úspěšná cytokinová terapie. Sunitinib byl efektivnější než interferon- $\alpha$  jako první volba u pacientů s metastazujícím RCC (57).

Sunitinib je silným inhibitorem mnoha tyrozinkinázových receptorů (RTKs), které ovlivňují jeho protinádorovou aktivitu a angiogenezi. Cílové molekuly jsou PDGFR- $\alpha$  a - $\beta$ , VEGF receptory (VEGFR-1, VEGFR-2 (Flk-1/KDR) a VEGFR-3), KIT, Fms protein tyrozinkináza-3 (FLT3), receptor kolonií stimulujícího faktoru typu 1 (CSF-1R) a receptor neutrofického faktoru odvozený od gliových buněk (RET). Všeobecně je důležitý pro inhibici angiogeneze (58). Inhibitory angiogeneze působí buď cestou blokady extracelulární vazby VEGF (cévní endoteliální růstový faktor) k jeho receptoru pomocí VEGF-protilátek, anebo cestou blokady intracelulární signální cesty VEGF receptoru inhibicí přenosu signálu tyrozinkinázovým receptorem (59).

Tyto děje jsou částečně zodpovědné za jeden z klinicky nejzávažnějších nežádoucích účinků sunitinibu, kterým je navození arteriální hypertenze. Incidence všech stupňů hypertenze a těžké hypertenze u pacientů užívajících sunitinib byla 21,6%, resp. 6,8%, přičemž bylo signifikantně zvýšené riziko vzniku těžké hypertenze (56).

Cílem této práce rigorózní práce bylo zhodnotit vliv podání sunitinibu spontánně hypertenzním potkanům a normotenzním potkanům Wistar Kyoto. Zaměřili jsme se na expresi PECAM-1 v aortě.

Nejpoužívanější model pro kardiovaskulární onemocnění, s více než 4000 referencemi v databázi Medline za posledních 10 let, je model spontánně hypertenzních potkanů (SHR) s Wistar Kyoto normotenzními potkany (WKY) jako kontrolou (38,60). SHR potkani jsou potomci outbreedních Wistar samců se spontánní hypertenzí z Kyótské kolonie a samic se zvýšeným krevním tlakem. Dále pokračuje párování bratr x sestra a jsou vybíráni jedinci se spontánní hypertenzí, definovanou jako systolický tlak vyšší než 150 mmHg přetrvávající déle než 1 měsíc (39,61). SHR samci jsou běžně používaný a zavedený model pro lidskou hypertenzi, např. ke zkoumání změn v signálních mechanismech způsobených hypertenzí a k testování jejich nových nežádoucích účinků (38,60).

Členové imunoglobulinové „super-rodiny“ endoteliálních adhezních molekul jako VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) a ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule) anebo destičková adhezní molekula se výrazně podílí na endoteliální adhezi leukocytů v průběhu zánětlivého procesu. PECAM-1 je transmembránový glykoprotein typu I, který se skládá z extracelulární části se šesti homologními jednotkami podobnými Ig, transmembránové domény s 19 zbytky a cytoplazmatického konce se 118 zbytky.

Expresí PECAM-1 je typická zejména pro endotelové buňky. To se také potvrdilo v této práci. Expresí PECAM-1 byla nalezena u všech zvířat, přičemž expresí byla vyšší u zvířat, kterým byl podáván sunitinib. To bylo potvrzeno pomocí imunohistochemické a stereologické analýzy. Vzhledem k tomu, že se předpokládá zvyšování krevního tlaku po podávání sunitinibu, můžeme konstatovat, že toto zvýšení by mohl ovlivňovat také expresí PECAM-1. Ostatně pokud jsme srovnali expresí PECAM-1 u normotenzních WKY potkanů a hypertenzních SHR potkanů tak expresí PECAM-1 byla vyšší u SHR potkanů i když zde nebyla prokázána statistická významnost.

Z tohoto hlediska je zajímavé, že expresí PECAM-1 je dáována do souvislosti s prozánětlivým stavem cévního endotelu (62). Řada studií prokázala, že PECAM se podílí na transmigraci leukocytů přes cévní endotel (63), dokonce je jeho expresí dáována do souvislosti s podporou aterogeneze (64). Tyto výsledky by tedy naznačovaly, že sunitinib může zvyšovat expresí PECAM-1 a tím indukovat endoteliální dysfunkci, což by mohlo ukazovat na jeden z mechanismů, jak by mohl působit toxicky ve stěně cévy.

Tyto výsledky budou dále ještě zkoumány v souvislosti s expresí dalších markerů endoteliální dysfunkce.

## 11. ZÁVĚR

Imunohistochemická analýza ukázala expresi PECAM-1 pouze na cévním endotelu aorty u všech skupin zvířat.

Imunohistochemická a stereologická analýza exprese PECAM-1 prokázala zvýšení exprese po podávání Sunitinibu u SHR i WKY potkanů.

Imunohistochemická a stereologická dále naznačila významný trend ve zvýšení exprese PECAM-1 u hypertenzních SHR potkanů ve srovnání s WKY potkany.

Tyto výsledky naznačují, že exprese PECAM-1 v aortě je indukována hypertenzí.

Podávání Sunitinibu by tedy mohlo vést k rozvoji nebo zhoršení endoteliální dysfunkce, což by mohlo představovat jeden z mechanismů jeho vaskulární toxicity.

## 12. LITERATURA

1. **Widimský Jiří, a kol.** *Hypertenze*. 3. vydání. Praha : Nakladatelství TRITON s.r.o. 2008. 17 – 510
2. **Internetový zdroj.** Interní medicína.  
<http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2011/02/05.pdf> ( 1.6.2011)
3. **Souček Miroslav, Tomáš Kára, a kol.** *Klinická patofyziologie hypertenze*. 1. vydání. Praha : vydala Grada Publishing, spol. s.r.o., 2002. 17, 28, 32, 34.
4. **Internetový zdroj**  
[http://www.solen.sk/index.php?page=pdf\\_view&pdf\\_id=3572&magazine\\_id=1](http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=3572&magazine_id=1)  
(1.6.2011)
5. **Šimon Jaroslav, Šípková Ivana.** *Novinky v léčbě hypertenze*. 1. vydání. Praha 1 : Nakladatelství GEUM Praha, s.r.o., 2004. 10 - 18.
6. **Jedlička, Pavel.** *Vysoký krevní tlak...nic se neděje?* 1. vydání. Havlíčkův Brod : vydala HYPERTENZE.EU, s.r.o., 2007. 7 - 9.
7. **Radomír Čihák** - *Anatomie 3*, 2. vydání, Grada 2002. 69 – 76.
8. **V. Konrádová, J.Uhlík, L.Vajner** - *Funkční histologie* . 2. vydání, Nakladatelství H & H vyšehradská, s.r.o., 2000. 115 – 124
9. **Paulsen, Douglas F.** *Histologie a buněčná biologie*. Oběhový systém. 1. vydání. Praha : Nakladatelství H & H vyšehradská, s.r.o., 2004. 156-165.
10. **Elišková Miloslava, Naňka Ondřej.** *Přehled anatomie*. Obecná angiologie. 1. vydání. Praha : Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2007. 86-88.

11. **Paleček, Jiří.** *Biologie buňky, II. Základy mikroskopické histologie.* Oběhový (cirkulační) systém. 1. vydání. Praha : Univerzita Karlova, vydavatelství Karolinum, 1996. 118-121.
12. **Martínek Jindřich, Vacek Zdeněk.** *Histologický atlas.* Srdce a cévy. 1. vydání. Praha 7 : vydala Grada Publishing, a.s., 2009. 11 - 17.
13. **Internetový zdroj.** *Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně – Arteriální hypertenze* <http://www.cls.cz/dokumenty2/os/t279.rtf> (1.6.2011)
14. **Souček Miroslav, Tomáš Kára, a kol.** *Klinická patofyziologie hypertenze.* 1. vydání. Praha : vydala Grada Publishing, spol. s.r.o., 2002. 17, 28, 32, 34
15. **Šimon Jaroslav, Šípová Ivana.** *Novinky v léčbě hypertenze.* 1. vydání. Praha 1 : Nakladatelství GEUM Praha, s.r.o., 2004. 10, 18.
16. **Widimský, Jiří.** *Hypertenze; Diagnóza a léčba.* 1. vydání. Jinočany : Nakladatelství a vydavatelství H&H, 1998. 7 - 26
17. **Jindřich, Vítovec Jiří, Zicha Jiří, a kol.** *Hypertenze; Diagnostika a léčba.* 1. vydání. Praha 7 : Grada Publishing, spol. s.r.o., 1999.
18. **Kvasničková A.** *Minerální látky a stopové prvky ve výživě,* ÚZPI, Praha, 2002
19. **Internetový zdroj.** *Nutrice.cz* <http://www.nutrice.cz/news/sul-a-vysoky-krevni-tlak/> (4.6.2011)
20. **Špinar Jindřich, Vítovec Jiří, Zicha Jiří, a kol.** *Hypertenze; Diagnostika a léčba.* 1. vydání. Praha 7 : Grada Publishing, spol. s.r.o., 1999. 25 - 31
21. **Aparicio Gallego Guadalupe, a kol.** *Molecular basis of hypertension side effects induced by Sunitinib.* *Anticancer drugs.*, 2011, roč. 22, č. 1, 1-8.

22. **Internetový zdroj** . [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Renin-angiotenzin-aldosteronov%C3%BD\\_syst%C3%A9m](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Renin-angiotenzin-aldosteronov%C3%BD_syst%C3%A9m) (4.6.2011)
23. **Internetový zdroj**.Lékové informační centrum  
<http://www.farmakologie.net/040223.php> (4.6.2011)
24. **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, 349 – 361
25. **Moncada S, Higgs A.** *The L – arginine – nitric oxide pathway. N Engl J Med* 1993, 329:2002-2012
26. **Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T.** *Endothelial nitric oxide synthase. Proc Natl Aca Sci USA* 1992:89 6348-6352
27. **Aparicio Gallego Guadalupe, a kol.** *Molecular basis of hypertension side effects induced by Sunitinib*. *Anticancer drugs.*, 2011, roč. 22, č. 1, 1-8.
28. **Internetový zdroj**  
[http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/predn/cz/2008/2008\\_RAAS\\_web.ppt#292,8](http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/predn/cz/2008/2008_RAAS_web.ppt#292,8),  
Snímek 8
29. **Internetový zdroj**. Remedia <http://www.remmedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Sunitinib/6-I-jp.magarticle.aspx> (5.6.2011)
30. **Internetový zdroj**. Remedia <http://www.remmedia.cz/Okruhy-temat/Urologie/Sunitinib-v-lecbe-karcinomu-ledviny/8-1t-hI.magarticle.aspx> (5.6.2011)

31. **Kocák, Ivo.** *Sutent, profil léčiva.* Nové léky v onkologické praxi, 2010, 35-42.
32. **Brančíková D., Adámková Krákorová D.** *Sunitinib.* Remedia, 2008
33. **Internetový zdroj.**[http://medicina.bloguje.cz/517583\\_item.php](http://medicina.bloguje.cz/517583_item.php) (5.6.2011)
34. **Internetový zdroj.** Lékařský slovník <http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/pdgf-11> (5.6.2011)
35. **Aparicio Gallego Guadalupe, a kol.** *Molecular basis of hypertension side effects induced by Sunitinib.* Anticancer drugs., 2011, roč. 22, č. 1, 1-8.
36. **Dhaun Neeraj, Webb David J.** *Receptor Tyrosine Kinase Inhibition, Hypertension and Proteinuria.* Hypertension, 2010, roč. 56, č. 4, 575-577.
37. **Martin G, Neklido L, Cruz JJ.** *Reverzible posterior leukoencephalopathy syndrome induce by Sunitini.* *J Clin Oncol*, 35:3559.
38. **Bhorjani N, Jeldres C, Patard JJ, Perrote P, Suardi N, Hutere G, et al.** *Toxicities associated with the administration of sorafenib, sunitinib, and temsirolimus and their management in patients with metastatic renal carcinoma.* *European Urology* 2008, 53: 917- 930
39. **Smizh TL, Hutchins PM.** *Central hemodynamics in the developmental stages of spontaneous hypertension in the anaesthetized rat.* *Hypertension* 1979, 1: 508 – 517
40. **Folkow B.** *Early structural changes in hypertension, pathophysiology and clinical consequences.* *J Cardiovasc Pharmacol* 1993, 22 (suppl) S1 –S6
41. **Sheila A. Doggreall, Lindsay Brown.** *Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure.* *Cardiovascular research*, 1998, roč. 39, č. 1 stránky 89-105.

42. **Newman PJ.** *The biology of PECAM – 1, The Journal of clinical Investigation* 100 (11 Suppl) S 25 – 529, 1997
43. **Newman PJ.** *The biology of PECAM – 1, The Journal of clinical Investigation* 103 (1), 5 – 9, 1999
44. **Muller WA, Ratti CM, McDonell SL, Cohn ZA.** *A human endothelial cell – restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. The journal of Experimental Medicine* 170 (2), 399 414, 1989
45. **Albelda SM, Oliver PD, Romer LH, Buck CA, EndoCAM,** *a novel endothelial cell – cell adhesion molecule. The journal of Cell Biology* 110 (4), 1227 – 1237, 1990
46. **Newman PJ, Newman DK.** *Signal transductino pathways mediated by PECAM – 1 : new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. Arteriosclerosis, Thromobosis, and Vascular Biology* 23 (6), 953 – 964, 2003
47. **SunQH, Delisser HM, Zukowski MM, Paddock C, Albelda SM, newman PJ.** *Individually distinct Ig homology domains in PECAM – 1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity. The journal of Biological Chenistry* 271 (19), 11483 11490, 1998
48. **Sachs Uj, Andrei – Selmer CL, Mainar A, Weiss T, Paddock C, Orlova VV, Young CE, Newman PJ, preissner KT, Chavakis T, Santoso S.** *The neutrophil specific antigen CD177 is a counter – receptor for endothelial PECAM – 1 (CD31). Journal of Biological Chenistry,* 2007
49. **Delliser HM, Yan HC, Newman PJ, Muller WA, Buck CA, Albelda SM.** *Platelet/endothelial cell adhesion molecule – 1 (CD31) – mediated cellular agrehation involves cell surface glycoasminoglycans. The journal of Biological Chemistry* 268 (21), 16037 – 16046, 1993

50. **Deaglio S, Morra M, Mallone R, Auseillo CM, Prager E, Garbarino G, Dianzani Z, Stockinger H, Malavasi F.** *Human CD38 (ADP – ribosyl cyclase) is counter – receptor of CD31, an Ig superfamily member.* Journal of immunology 160 (1), 395 – 402, 1998
51. **Sardjono CT, Harbour SN, Yip JC, Paddock C, Tridandapani S. Newman PJ, Jackson DE.** *Palmitoylation at Cys595 is essential for PECAM – 1 localisation into membrane microdomains and for efficient PECAM – 1 mediated cytoprotection.* Thrombosis and Haemostasis 96 (6), 756 – 766, 2006
52. **Tzima E, Irani – Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA.** *A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress.* Nature 437 (7057), 426 – 431, 2005
53. **Maas M, Stapleton M, Bergom C, Mattson DL, Newman DK, Newman PJ.** *Endothelial cell PECAM – 1 confers protection against endotoxic shock.* American Journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology 288 (1), H159 – H164, 2005
54. **Jamie R. Privratsky, Debra K. Newman, Peter J. Newman.** *PECAM – 1: Conflicts of interest in inflammation.* Life sciences 87, 39 – 82, 2010
55. **Nachtigal P., Semecky V., Kopecky M., Gojova A., Solichova D., Zdansky P. and Zadak Z.** (2004) *Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis.* *Pathol Res Pract* 200, 219-229.
56. **Aparicio-Gallego G., Afonso-Afonso F. J., Leon-Mateos L., Firvida-Perez J. L., Vazquez-Estevez S., Lazaro-Quintela M., Ramos-Vazquez M., Fernandez-Calvo O., Campos-Balea B. and Anton-Aparicio L. M.** (2011) *Molecular basis of hypertension side effects induced by sunitinib.* *Anticancer Drugs* 22, 1-8.

57. **Mena A. C., Pulido E. G. and Guillen-Ponce C.** (2010) *Understanding the molecular-based mechanism of action of the tyrosine kinase inhibitor: sunitinib. Anticancer Drugs* 21 Suppl 1, S3-11.
58. **Faivre S., Demetri G., Sargent W. and Raymond E.** (2007) *Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. Nat Rev Drug Discov* 6, 734-745.
59. **Papaetis G. S. and Syrigos K. N.** (2009) *Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies. BioDrugs* 23, 377-389.
60. **Stoll M. and Jacob H. J.** (2001) *Genetic rat models of hypertension: relationship to human hypertension. Curr Hypertens Rep* 3, 157-164.
61. **Kumarasamy S., Gopalakrishnan K., Shafton A., Nixon J., Thangavel J., Farms P. and Joe B.** (2010) *Mitochondrial polymorphisms in rat genetic models of hypertension. Mamm Genome* 21, 299-306.
62. **Newman P. J. and Newman D. K.** (2003) *Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 953-964.
63. **Muller W. A., Weigl S. A., Deng X. and Phillips D. M.** (1993) *PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. J Exp Med* 178, 449-460.
64. **Harry B. L., Sanders J. M., Feaver R. E., Lansey M., Deem T. L., Zarbock A., Bruce A. C., Pryor A. W., Gelfand B. D., Blackman B. R., Schwartz M. A. and Ley K.** (2008) *Endothelial cell PECAM-1 promotes atherosclerotic lesions in areas of disturbed flow in ApoE-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 2003-2008.

