

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd



IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA EXPRESE
VYBRANÝCH MARKERŮ V EXPERIMENTÁLNÍ HYPERTENZI.

Immunohistochemical analysis of the expression of markers
in experimental hypertension.

(Bakalářská práce)

Vedoucí práce: Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD

Veronika Krejčíková

Hradec Králové 2011

„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. 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 příjemnou spolupráci při sestavování této bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala všem rodinným příslušníkům, přátelům a známým, kteří mě jakýmkoliv způsobem podporují.“

Abstrakt

Veronika Krejčíková

Imunohistochemická analýza exprese vybraných markerů v experimentální hypertenzi.

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotní laborant

Cíl práce: Sledovali jsme expresi intercelulární adhezní molekuly (ICAM-1) v pravé femorální arterii u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) a normotenzních (Wistar Kyoto) potkanů s ohledem na podávání sunitinibu.

Metody: Použili jsme samce SHR potkanů a kmen WKY potkanů. Obě tyto skupiny byly ještě rozděleny na dvě podskupiny, v nich jedné podskupině byl podáván sunitinib a druhé, kontrolní skupině, pouze voda. SHR potkanům byl sunitinib podáván ve schématu: 8 týdnů podávání/5 týdnů pauza/8 týdnů podávání. U WKY potkanů pro objevení příznaků toxicity jen ve schématu: 8 týdnů podávání/5 týdnů pauza/2 týdny podávání. Následně byla provedena imunohistochemická analýza odebraných pravých femorálních arterií. Detekce exprese ICAM-1 byla provedena pomocí metodiky En Vision s detekcí pomocí DAB.

Výsledky: Imunohistochemické barvení ICAM-1 jsme provedli u 120 preparátů. U některých cév nebyla, bez ohledu na skupinu testovaných zvířat, nalezena žádná exprese ICAM-1. U dvou zvířat v každé skupině jsme pozorovali slabou expresi, nicméně jednalo se o slabou expresi na úrovni jednotlivých endoteliálních buněk. Z důvodu takto slabé reakce jsme nakonec nepřistoupili ke kvantifikaci imunohistochemických barvení.

Závěr: Léčba sunitinibem nevyvolala imunohistochemicky zjistitelnou endoteliální dysfunkci zastoupenou změnami exprese ICAM-1 v pravé femorální tepně u hypertenzních a normotenzních potkanů. ICAM-1 exprese byla velmi nízká u všech skupin zvířat. Léčba sunitinibem nemá vliv na expresi ICAM-1 u SHR a WKY potkanů.

Abstract

Veronika Krejčíková

Immunohistochemical analysis of the expression of markers in experimental hypertension.

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Medical Laboratory Technician

Background: We observed the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) in the right femur arteries of spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar Kyoto (WKY) rats with regard to the administration of sunitinib.

Methods: We used the male of SHR and WKY rats. Each strain of the rats was divided into two groups. Each of groups were divided into two subset. One of subset received sunitinib and the second, control subset, which received only water. SHR were treated by sunitinib in the following chart: 8 weeks treatment/5 weeks pause/8weeks treatment. WKY rats were treated by sunitinib only in the following chart: 8 weeks treatment/ 5 weeks pause/8 weeks treatment, because signs of toxicity were appeared. After that immunohistochemical analysis of segments of right femur arteries were executed. Detection of expression of ICAM-1 was performed using the method of En Vision with detection using DAB.

Results: We performed the immunohistochemical detection of ICAM-1 in 120 slides. In the some of them we found no expression of ICAM-1 regardless to subset of testing animals. In 2 animals in each of groups we observed of poor expression, but this expression was very weak and it was situated on individual of endothelial cells. Finally we did not approach to quantitative of immunohistochemical staining for poor expression.

Conclusions: In hypertensive and normotensive rats the treatment by sunitinib did not induce immunohistochemically detectable endothelial dysfunction represented by changes of expression ICAM-1 in right femoral arteries. ICAM-1 expression was very low at all of animal groups. The treatment by sunitinib in SHR and WKY rats did not have influence to expression of ICAM-1.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	CÉVY	9
2.1.	OBECNÁ STAVBA CÉVNÍ STĚNY	9
2.2.	KAPILÁRY	11
2.3.	VĚNY	12
2.4.	ARTERIE.....	14
3	HYPERTENZE	17
3.1.	DEFINICE A KLASIFIKACE	17
3.2.	REGULACE KREVŇÍHO TLAKU.....	17
3.3.	ETIOPATOGENEZE A PATOFYZIOLOGIE HYPERTENZE.....	19
3.4.	NÁSLEDKY HYPERTENZE.....	23
4	ZVÍŘECÍ MODEL	24
4.1.	LABORATORNÍ POTKANI.....	24
4.1.1.	SHR potkani	25
5	SUNITINIB	27
5.1.	OBECNÉ VLASTNOSTI.....	27
5.2.	LÉČBA, INDIKACE, DÁVKOVÁNÍ.....	27
5.3.	MECHANIZMUS ÚČINKU	28
5.4.	NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY	30
5.4.1.	Sunitinib a hypertenze.....	32
6	ADHEZNÍ MOLEKULY	33
6.1.	AM A PATOFYZIOLOGICKÉ POCHODY V ORGANIZMU	37
7	ZADÁNÍ PRÁCE, CÍL PRÁCE	38
8	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
8.1.	SUNITINIB – DESIGN EXPERIMENTU.....	39
8.2.	IMUNOHISTOCHEMIE.....	39
8.2.1.	Metodika En Vision	39

9	VÝSLEDKY	41
9.1.	IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ ICAM-1 V PRAVÉ FEMORÁLNÍ TEPNĚ.....	41
10	DISKUSE	46
11	ZÁVĚR	48
12	SEZNAM ZKRATEK	49
13	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51

1 ÚVOD

Kardiovaskulární systém, složený ze srdce a krevních cév, slouží v organismu k distribuci kyslíku a živin do tkání a odvodu odpadových látek metabolismu přes vylučovací orgány pryč z organismu. Jeho prostřednictvím se transportují hormony k cílovým orgánům, reguluje hemostáza a mohli bychom jmenovat další a další neméně důležité funkce. Poruchy funkce tohoto systému mohou mít pro organismus až fatální následky.

Vysoký krevní tlak neboli hypertenze je velmi rozšířené onemocnění, které se jen zdánlivě týká samotné oběhové soustavy. V jeho rozvoji hrají svou roli genetické faktory, životní styl a u sekundárních hypertenzí i jiná onemocnění, která jeho vzniku předcházejí. Spolu s obezitou, diabetem mellitus a dyslipoproteinémií se podílí na vzniku závažného civilizačního onemocnění - metabolického syndromu. Zvýšený krevní tlak se také významně uplatňuje při vzniku endoteliální dysfunkce a rozvoji aterosklerózy.

Neléčená hypertenze může vést až k ischemické chorobě srdeční, infarktu myokardu a selhání srdce nebo k cévním mozkovým příhodám.

Pro její závažné následky nelze tuto nemoc podceňovat a je důležité dbát na prevenci vzniku této choroby, kterou můžeme rovněž označit za civilizační. Jednak proto, že jde o značně rozšířené onemocnění a také proto, že její výskyt je úměrný vyspělosti společnosti a technickému pokroku.

Hypertenze může být také způsobena některými léky. Je proto žádoucí tento vliv na organismus u léků předem testovat, aby bylo zřejmé, kdy je vhodné nasadit souběžně i antihypertenzní léčbu. Pro takové testy jsou vhodná vyšlechtěná laboratorní zvířata, kterým se daný lék po určitou dobu podává. Pomocí různých biochemických i speciálních laboratorních metod lze odhalit případné patologické pochody následující po podávání léku. Často se pro tyto účely používají metody imunohistochemické, které jsou založeny na specifické reakci antigenu s protilátkou na řezu histologického preparátu. Pokud jsou známy specifické markery pro určitý patologický děj, lze po vyladění dané metody poměrně spolehlivě zjistit, zda tento patologický děj ve zkoumané tkáni probíhá, nebo neprobíhá.

2 CÉVY

Krevní cévy se rozdělují podle stavby a funkce na tepny (arterie), žily (vény) a vlasečnice (kapiláry).

Pro arterie je charakteristické, že odvádějí krev od srdce a to buď krev okysličenou do periferních částí těla (prostřednictvím velkého krevního oběhu) nebo odkysličenou krev do plic, kde dojde k okysličení krve (malý krevní oběh) [3]. Je na ně přenášena tepová vlna způsobená stahem srdečního svalu [2].

Kapiláry tvoří síť, kde dochází k výměně látek mezi krví a tkáněmi. Z krve se do tkání dostávají živiny a kyslík, naopak z tkání se krví odvádějí odpadní látky a oxid uhličitý. Existuje mnoho kapilár, kterým je možno přiřadit speciální úkoly, např. vstřebávání kyslíku a vylučování oxidu uhličitého v plicích, vstřebávání živin v tenkém střevě nebo shromažďování látek v orgánech s vnitřní sekrecí.

Vény vznikají splýváním kapilár a vedou krev s vysokým obsahem oxidu uhličitého a produktů metabolismu zpět k srdci. Je v nich nižší tlak než v arteriích.

MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

2.1. Obecná stavba cévní stěny

Krevní cévy jsou složeny ze třech základních vrstev: vnitřní (*tunica intima*), střední (*tunica media*) a zevní (*tunica adventitia* neboli *externa*).

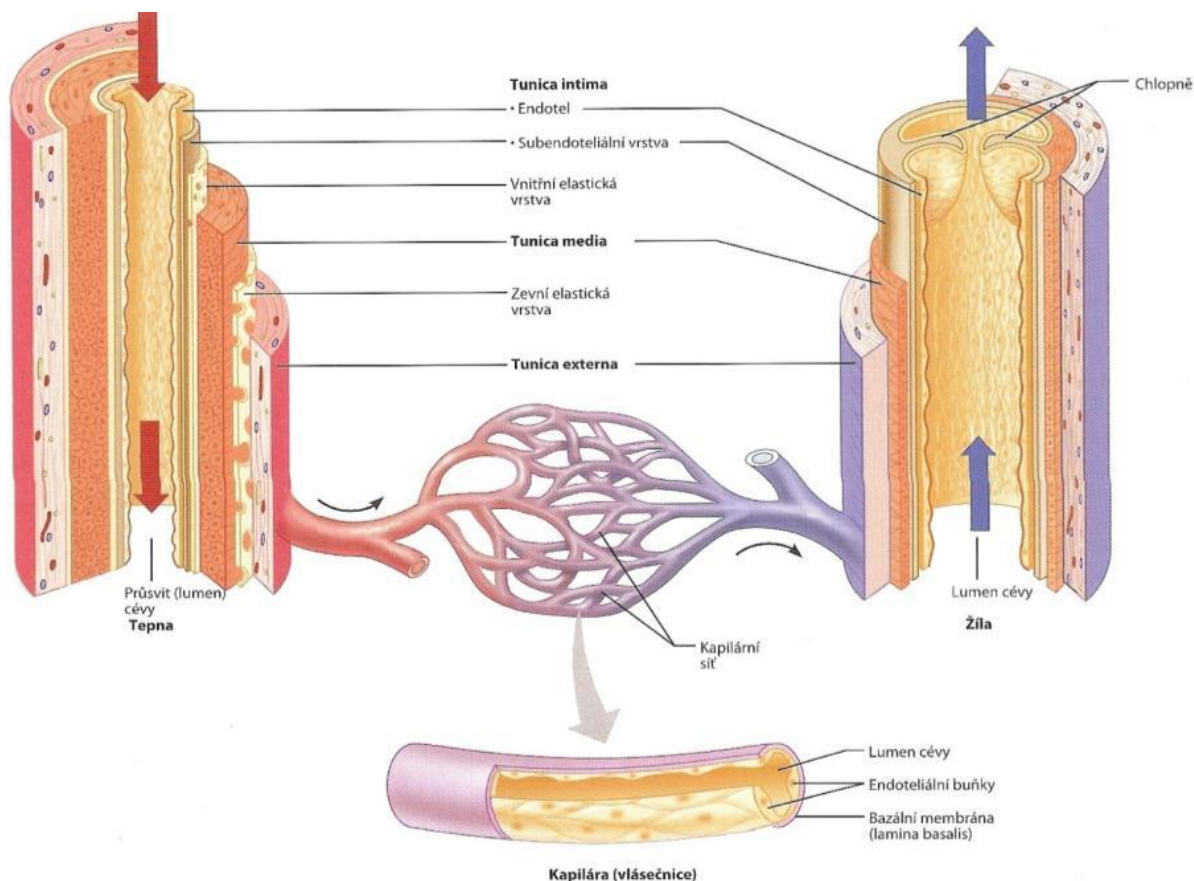
Tunica intima (vnitřní vrstva) je tvořena jednoduchým vrstevnatým epitelem – endotelem –, je v přímém kontaktu s protékající krví [1]. V cévách o průměru větším jak 1 mm se nachází také vazivová subendotelová vrstva.

Hladký vnitřní povrch (díky němuž je zmenšováno krevní tření při toku krve) vytvářejí ploché, polygonální endotelové buňky, které jsou obvykle protažené ve směru průtoku krve.

Endotelové buňky jsou hlavní strukturální složkou kapilár, spočívají na bazální lamině; patří mezi dlouho žijící elementy, které vykazují jen malou mitotickou aktivitu. Protože obsahují mikrofilamenta, je u nich předpokládána schopnost kontrakce [3]. Vykazují značnou metabolickou aktivitu. Mezi jejich klíčové úlohy v organizmu patří antitrombogenní účinek (endotelové buňky uvolňují prostacyklin, který inhibuje

shlukování krevních destiček), inaktivují různé biologicky aktivní látky (bradykinin, serotonin a další), odbourávají lipoproteiny (a tím dodávají triglyceridy a cholesterol pro energetický metabolismus, syntézu hormonů a další důležité pochody). V neposlední řadě zajišťují přeměnu angiotenzinu I na angiotenzin II (angiotenzin mimo jiné vyvolává kontrakce hladké svaloviny arterií a tím reguluje krevní tlak) [4].

Obr. 1: Obecná stavba jednotlivých typů cév [1 (str. 545)]



Tunica media (střední vrstva) obsahuje cirkulární vrstvy hladké svaloviny, které jsou proloženy vrstvami elastinu a kolagenu [1]. Vzájemný poměr těchto složek je závislý na typu cévy [2]. Elastin a kolagen jsou látky zodpovědné za pružnost a pevnost. Tyto vlastnosti jsou nutné k odolávání krevnímu tlaku u cév, které jsou jeho působení vystaveny. Proto je tato vrstva znatelně silnější u arterií než u vén. Stahem hladké svaloviny dochází k zúžení cévy (vazokonstrikci), její uvolnění má za následek rozšíření (vazodilataci) cévy [1].

Pokud se elastické struktury shromažďují na hranici *tunica media* a *tunica intima*, vytvářejí *membrána elastica interna*. Když se tyto struktury koncentrují mezi *tunica media* a *tunica adventitia*, nazývají se *membrána elastica externa* a oddělují tyto dvě vrstvy od sebe [3].

Tunica adventitia (zevní vrstva) chrání cévu, zesiluje její stěnu a kotví ji do okolních tkání [1]. Její hlavní složkou jsou kolagenová a elastická vlákna, která jsou uspořádána souběžně s průběhem cévy, hlavní je kolagen typu I. Nachází se zde fibroblasty a adipocyty [3]. Na rozhraní *tunica media* a *tunica externa* probíhají *vasa vasorum* (cévy cév) [2].

2.2. Kapiláry

Jsou složeny z jedné vrstvy endotelových buněk obklopených bazální laminou (*lamina basalis*, viz obr. 2). Jejich průměr 8-10 μm ještě umožňuje erytrocytům průchod těmito cévami.

Endotelové buňky jsou spojeny pomocí pevných mezibuněčných spojů a příležitostně i desmozomy. Zastoupení jednotlivých typů buněčných spojů závisí na typu, umístění a funkci kapiláry. Na zevní straně endotelových buněk jsou nepravidelně rozmístěny pericyty, podpůrné buňky pavoukovitého vzhledu.

Kapiláry vznikají větvením prekapilár, což jsou cévní části, které svou histologickou stavbou zaujímají místo mezi arteriolou a kapilárou. Na začátku každé kapiláry je v místě přechodu z prekapiláry vrstva buněk hladké svaloviny, tzv. prekapilární svěrač, který reguluje průtok krve tkáněmi podle aktuální potřeby kyslíku a živin (pokud dojde k uzavření postkapilárních svěračů, krev proudí z prekapilár přímo spojkami do postkapilár, a neprotéká tak v uzavřeném místě kapilárním systémem) [1].

Bohatost kapilární sítě závisí na metabolické aktivitě dané tkáně. Ledviny, játra nebo myokard mají velmi bohatou kapilární síť, naopak šlachy a vazy jsou slabě vaskularizovány [3]. Epitely a chrupavka neobsahují kapiláry vůbec [1].

Kapiláry můžeme rozdělit na **typické**, somatické s **kontinuální výstelkou** (nefenestrované) s průměrem 5-15 μm , a **atypické**, viscerální s **výstelkou diskontinuální** (s fenestracemi a póry) o průměru 15-200 μm [2].

Nefenestované kapiláry neobsahují fenestrace ani póry (obr. 2a). Jde o nejběžnější typ kapilár, obsažený ve většině orgánů, hlavně v kosterních svalech, kůži a CNS.

Fenestované kapiláry (obr. 2b) obsahují fenestrace a póry, které buď jsou, nebo nejsou kryty diafragmou. Diafragma je tenčí než typické biologické membrány a omezuje vstup velkých molekul. Fenestované kapiláry se nacházejí v orgánech, kde dochází k rychlé výměně látek mezi krví a tkáněmi – v ledvinách, střevě a endokrinních žlázách.

Speciálním typem fenestrovaných kapilár jsou kapiláry **sinusoidní** (obr. 2c). Mají široké lumen a silně fenestované stěny. Od typických fenestrovaných kapilár se kromě uvedených vlastností liší ještě nesouvislou bazální laminou. V okolí se často nacházejí fagocytující buňky. Velký průměr a vinutý průběh sinusoidních kapilár způsobuje zpomalení průtoku krve, které poskytuje dostatek času k průběhu látkové a buněčné výměny [2, 4]. Tyto kapiláry najdeme hlavně v endokrinních žlázách, v kostní dřeni a ve slezině [1].

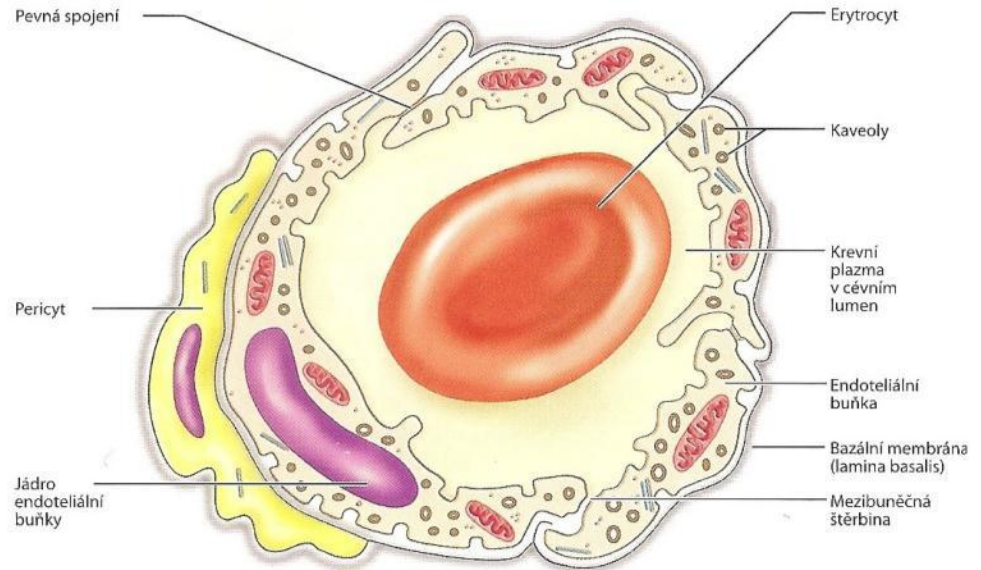
2.3. Vény

Venózní systém jako celek obsahuje asi 65 % celkového množství krve. Lumen bývá u vén větší než u arterií o stejném zevním průměru. Venózní stěna může být mnohem tenčí než u arterií, protože nemusí odolávat tak vysokým tlakům. Nemusí ani tlumit žádné pulzace, proto je v ní obsaženo méně elastinu a hlavními složkami jsou kolagenová vlákna a buňky hladkých svalů. Oproti arteriím je u vén nejvíce vyvinuta *tunica adventitia* (obr. 3). *Tunica media* bývá tenká, stejně tak *tunica intima*, která je významněji zastoupena jen u velkých vén. Na řezu tkáně mohou vény obsahovat více erytrocytů než ostatní cévy. Vény obsahují chlopně, duplikatury intimy, které zabraňují zpětnému toku krve a pomáhají návratu krve k srdci. Jsou nejhojněji zastoupené ve velkých vénách dolních končetin [1].

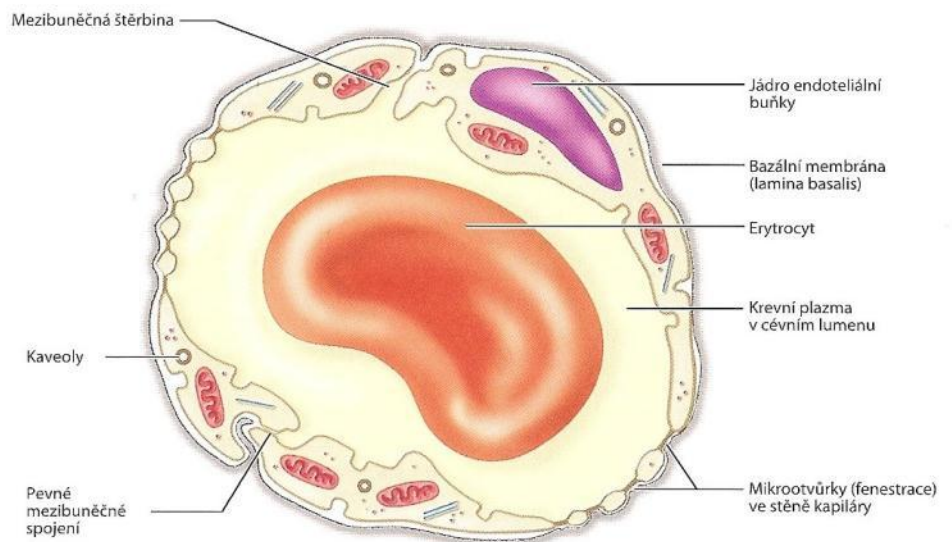
Vény lze rozdělit podle průměru a vnitřní stavby do několika stupňů. Za první stupeň se dají označit venuly (průměr 8 – 100 μm), za druhý malé a střední vény (průměr 1 – 9 mm) a třetím stupněm jsou velké vény (průměr větší jak 9 mm).

Obr. 2: Typy kapilár [1 (str. 548-549, upraveno)]

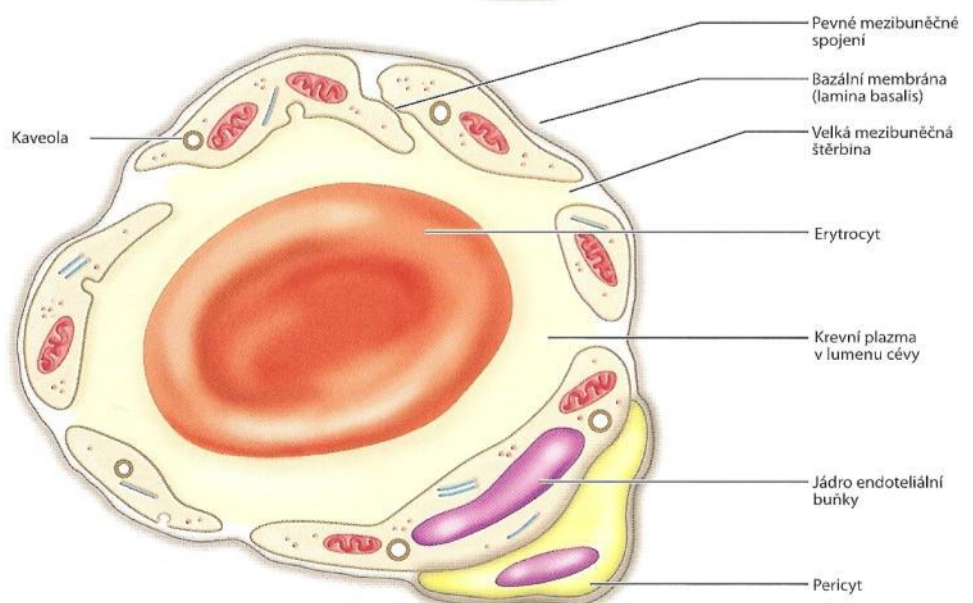
a) Nefenestovaná kapilára



b) Fenestrovaná kapilára



c) Sinusoidní kapilára



Tab. 1: Srovnání struktury jednotlivých typů vén [3, 4, upraveno].

Typ vény	<i>Tunica intima</i>	<i>Tunica media</i>	<i>Tunica adventitia</i>
Velké vény	<ul style="list-style-type: none"> • dobře vyvinutá • silná vrstva subendotelové vazivové tkáně • chlopně 	<ul style="list-style-type: none"> • tenká • jen několik vrstev hladkých svalových buněk • retikulární a kolagenní vlákna 	<ul style="list-style-type: none"> • nejlépe vyvinutá vrstva velkých vén • longitudinální svazky hladké svaloviny (ochrana proti nadměrnému roztažení) • velké množství kolagenu
Malé a střední vény	<ul style="list-style-type: none"> • typický endotel • subendotelová vrstva tenká • méně chlopní než velké vény 	<ul style="list-style-type: none"> • retikulární vlákna • svazečky hladkých svalových buněk 	<ul style="list-style-type: none"> • dobře vyvinutá • longitudinálně uspořádaná kolagenní vlákna • může obsahovat i hladké svalové buňky
Venuly	<ul style="list-style-type: none"> • typický endotel • chlopně nevyvinuty 	<ul style="list-style-type: none"> • velmi tenká 	<ul style="list-style-type: none"> • velmi tenká • obsahuje hlavně kolagen

2.4. Arterie

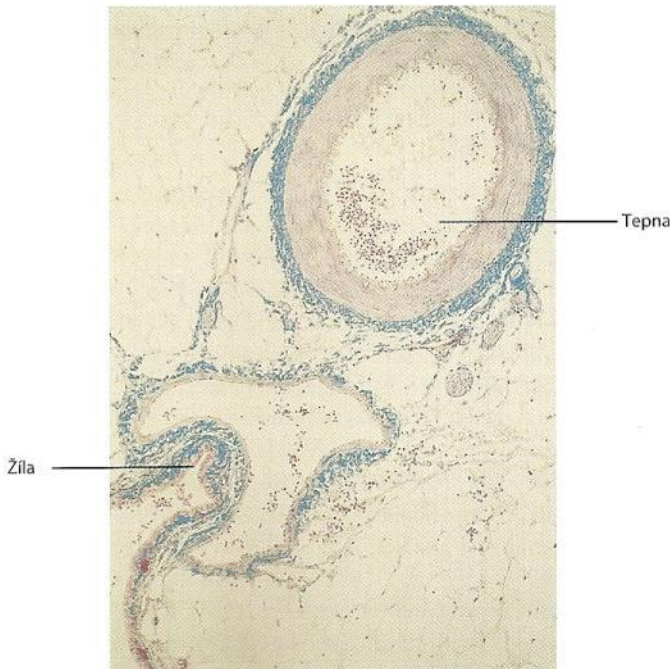
Arterie, které vedou krev od srdce, musí odolávat tepovým vlnám vyvolaných stahy srdce. Tyto výkyvy krevního tlaku pomáhají tlumit vrstvy elastinu, které jsou v menším či větším množství (podle typu arterie) přítomny. Obecně můžeme rozlišit dva základní typy arterií: elastický a svalový [2]. Arterie elastického typu mají ve svých stěnách nejvyšší obsah elastinu ze všech cév. Fungují jako rozvodné trubice o průměru 1-2,5 cm, které díky své schopnosti roztažení tlumí tepové nárazy a díky své stažlivosti jsou schopny převést sílu, která je dilatovala, na hydrostatický tlak [4]. Arterie svalového (muskulárního) typu obsahují méně elastinu, zato najdeme až několik desítek vrstev cirkulárně uspořádané

hladké svaloviny. Tato vrstva svaloviny v *tunica media* reguluje protékající množství krve [1]. Jednotlivé typy arterií i s jejich typickou strukturou jsou shrnuty v tab. 2.

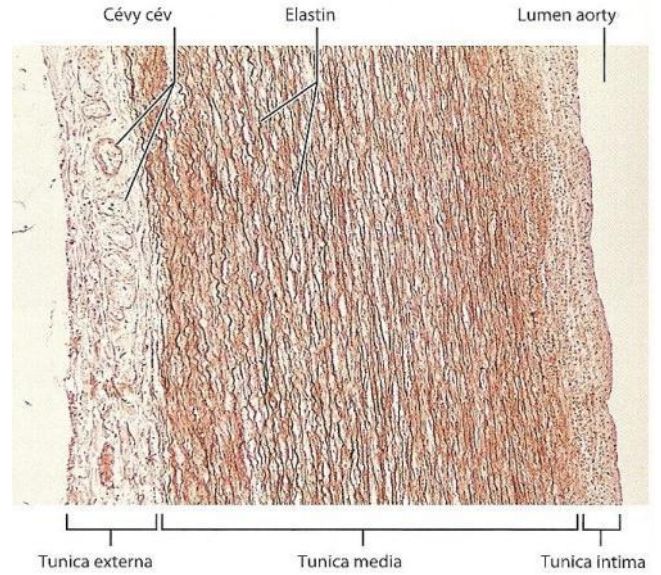
Tab. 2: Srovnání struktury jednotlivých typů arterií [2, 4, upraveno]

Typ (příklad)	<i>Tunica intima</i>	<i>Tunica media</i>	<i>Tunica adventitia</i>
Elastické, velké (<i>aorta</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • endotel • silná subendotelová vrstva 	<ul style="list-style-type: none"> • koncentrické fenestrované blanky elastinu (= <i>membranae fenestratae</i>), jejichž počet narůstá s věkem • mezi elastickými membránami probíhají buňky hladkého svalu a retikulární a kolagenní vlákna (kolagen typu III) • <i>membrána elastica interna</i> (mezi <i>t. media</i> a <i>t. intima</i>) a <i>membrána elastica externa</i> (mezi <i>t. media</i> a <i>t. adventitia</i>) vzhledem k velkému množství elastinu špatně rozlišitelné 	<ul style="list-style-type: none"> • vzhledem k průměru cévy tenká • vlákna elastická i kolagenní (kolagen typu I)
Svalové, střední (<i>a. brachialis</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • fibroblasty v subendotelové vrstvě • tenčí než u elastické 	<ul style="list-style-type: none"> • silná, až 40 vrstev buněk hladké svaloviny • různé množství elastických vláken • <i>membrána elastica interna</i> dobře vyvinuta • ve větších a. i <i>membrána elastica externa</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • relativně tenká • většinou kolagenní vlákna • fibroblasty, někdy adipocyty
Arterioly (cévy s průsvitem menším než 0,5 mm)	<ul style="list-style-type: none"> • typický endotel • často nevytvořena subendotelová vrstva 	<ul style="list-style-type: none"> • 1-5 vrstev hladké svaloviny • často nevytvořena <i>membrána elastica externa</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • tenká • kolagenní vlákna

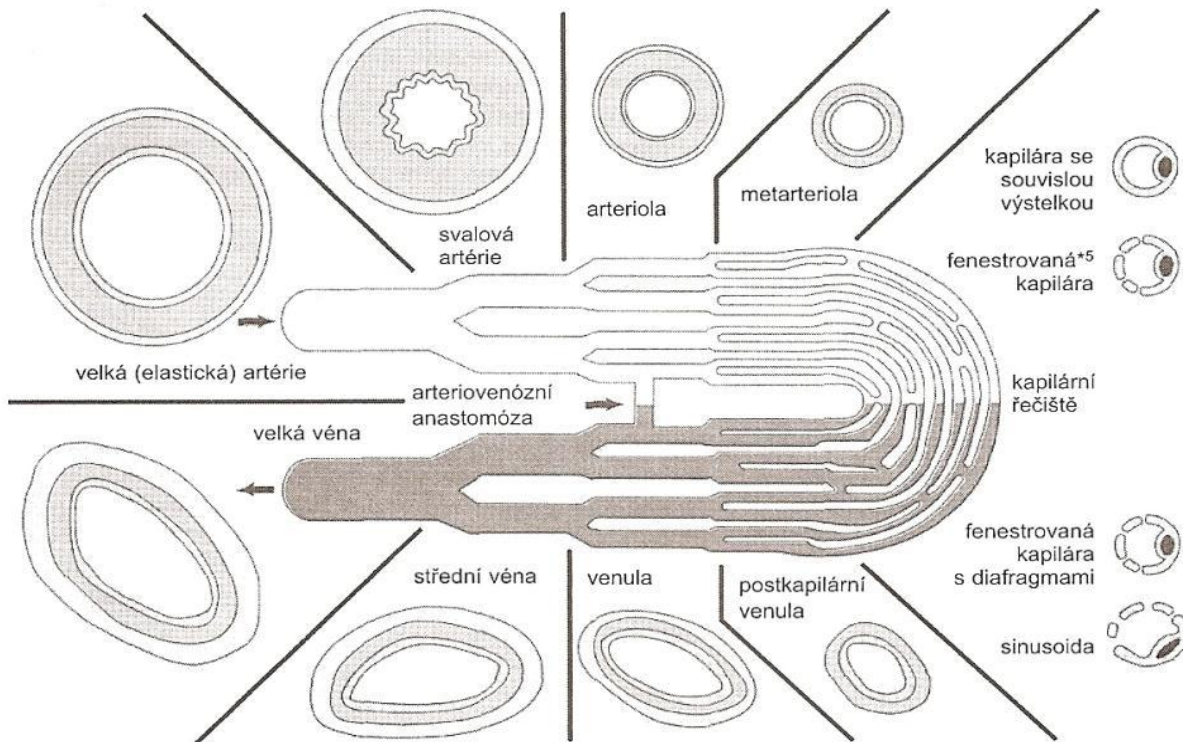
Obr. 3: Rozdíly mezi arterií a vénou [1 (str. 545)]



Obr. 4: Elastická arterie
[1 (str. 546, upraveno)]



Obr. 5: Schematické znázornění jednotlivých typů cév [4 (str. 159)]



3 HYPERTENZE

3.1. Definice a klasifikace

Dle WHO za arteriální hypertenzi můžeme označit zvýšení systolického krevního tlaku nad 140 mmHg nebo diastolického krevního tlaku nad 90 mmHg, které je naměřené nejméně ve dvou ze tří měření provedených nejméně v průběhu dvou dnů [15]. Jde o uměle stanovené hranice. U plicní hypertenze jsou hodnoty zcela odlišné (za horní hranice jsou považovány hodnoty 30/12 mmHg) [16]. Další text se bude – vzhledem k zaměření této práce - věnovat jen systémové arteriální hypertenzi.

Arteriální hypertenzi lze, stejně jako jiná onemocnění, klasifikovat podle několika hledisek. Podle příčiny rozlišujeme hypertenzi primární (idiopatickou, esenciální) a sekundární, které dále podle klinického průběhu onemocnění můžeme zařadit mezi benigní nebo maligní hypertenzi (viz. kap. 3.3) [10].

3.2. Regulace krevního tlaku

Na řízení krevního oběhu se podílí nespočet mechanismů, které nejčastěji využívají schopnosti vazokonstrikce a vazodilatace cév. Rozlišují se místní a celkové regulační mechanismy. Mezi místní regulační mechanismy patří endotelová regulace pomocí NO, metabolická regulace, která funguje na principu zpětné vazby, a myogenní autoregulace, která se uplatňuje nejvíce v ledvinách a mozku a udržuje stálý průtok krve cévou i při změně TK.

Celkové regulační mechanismy si zaslouží podrobnější popis. Podle doby, za kterou jsou schopny se uplatnit, je můžeme rozdělit na rychlé a pomalé:

- Rychlé (krátkodobé) regulační mechanismy

Nervové regulační mechanismy jsou zprostředkovány vegetativním nervovým systémem (hlavně sympatikem) a jako mediátor je využíván noradrenalin – vyvolává vazokonstrikci působením na hladké svalové buňky cév. Baroreceptory kontrolují krevní tlak ve velkých arteriích, nejvíce jich je v oblouku aorty. Jde vlastně o mechanoreceptory, které po zvýšení TK předávají patřičný signál po nervové dráze do centra v prodloužení míše, kde vyvolá útlum sympatiku a aktivaci parasympatiku, což má za následek pokles

minutového srdečního výdeje a celkového periferního odporu a v konečném důsledku normalizaci krevního tlaku. Při snížení TK jsou v prodloužené míše vyvolány opačné pochody.

Z hormonálních regulačních mechanismů hrají nejdůležitější roli katecholaminy – adrenalin a noradrenalin. Reakce hladkosvalových buněk na katecholaminy se liší podle typu a množství tzv. adrenergních receptorů. Noradrenalin aktivuje jen alfa receptory (a vyvolává jen vazokonstrikci), adrenalin aktivuje alfa i beta receptory (a vyvolává vazokonstrikci tam, kde převažují alfa receptory, naopak kde převažují beta receptory, vyvolává vazodilataci).

Z endotelu uvolňovaný endotelin také působí na cévní stěnu a to vazokonstrikčně.

System renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS) ovlivňuje mnoho složek v organismu a nelze tak jednoznačně zařadit mezi rychlé nebo pomalé regulační mechanismy. Uplatňuje se při poklesu tlaku v ledvinách pod 90 mmHg. Tento pokles TK má za následek zvýšení sekrece reninu. Uvolněný renin v plazmě štěpí angiotenzinogen vznikající v játrech na angiotenzin I. Tento vzniklý dekaeptid je štěpen angiotensin-konvertujícím enzymem na oktaeptid angiotenzinu II. Angiotenzin II působí na srdce a cévy, vykazuje silný vazokonstrikční účinek – působí na arterioly, v centrální nervové soustavě ovlivňuje hypotalamus; stimuluje sekreci adrenalinu ve dřeni nadledvin, přispívá k regulaci prokrvení ledvin. Kromě uvedených rychlých účinků, jsou zaznamenány i účinky pomalé: v hypotalamu vyvolává zvýšenou sekreci antidiuretického hormonu (ADH), pocit žízně a podporuje chuť na slané; dále podporuje resorpci Na^+ v proximálním tubulu ledvin a stimuluje syntézu aldosteronu v kůře nadledvin. Hlavním úkolem aldosteronu je řídit transport Na^+ a K^+ v ledvinách a v dalších orgánech. Také zvyšuje citlivost hladkých svalových buněk k angiotenzinu II [14].

Atriální natriuretický peptid je antagonistou RAAS a dalších vazokonstriktorů, TK tedy snižuje.

- Pomalé (dlouhodobé) regulační mechanismy

Tyto mechanismy řídí celkový objem krve a tímto také regulují TK. Vyšší dávky ADH vyvolávají vazokonstrikci, ale hlavní účinek tohoto hormonu je vstřebávání vody ve sběrných a distálních tubulech ledvin. Již zmíněný aldosteron také zvyšuje objem krve v cirkulaci, zvýšený žilní návrat pak vede ke zvýšení minutového srdečního výdeje. K uplatnění aldosteronového mechanismu dochází až za několik dní [5, 12].

3.3. Etiopatogeneze a patofyziologie hypertenze

Zvýšení TK může být způsobeno 1) zvýšeným množstvím protékající krve, 2) zvýšeným odporem cévního řečiště nebo 3) oběma mechanismy najednou, tedy jak zvýšením objemu protékající krve, tak zvýšeným odporem cévní stěny. Zvýšený TK je tedy následkem dysregulace mezi srdečním výdejem a periferní rezistencí [9].

U 90 – 95 % případů hypertenze není jasná její příčina a označuje se proto jako **esenciální** (idiopatická, primární). Jisté je, že existuje mnoho faktorů, které mohou vznik hypertenze ovlivnit.

Výskyt hypertenze závisí na věku, rase a pohlaví. Prevalence hypertenze je vyšší u mužů než u žen odpovídajícího věku. U žen se uplatňuje kardioprotektivní účinek estrogenů. V 70 letech už se riziko mezi muži a ženami vyrovná. Určitou roli hrají i genetické faktory. Jedním z předních rizikových faktorů pro vznik hypertenze je nadváha a nedostatečná pohybová aktivita [20]. O nadměrném příjmu soli a jeho vlivu na hypertenzi se stále vedou diskuze, ovšem je velmi pravděpodobný u osob, které jsou citlivé k NaCl. Dále ke vzniku onemocnění zřejmě přispívá i psychický stres a nadměrná konzumace alkoholu. Tyto faktory by se ještě spolu s nedostatkem K^+ , Ca^{2+} a Mg^{2+} daly shrnout do skupiny exogenních faktorů. U endogenních faktorů lze rozlišit vlivy presorické a depresorické. Mezi presorické vlivy patří katecholaminy, renin-angiotensinový systém, aldosteron a některé látky uvolňované endotelem, např. endotelin a tromboxan (TXA_2). Do depresorických vlivů jsou řazeny hlavně kalikrein-kininový systém, dopamin, prostacyklin, prostaglandin (PGE_2), atriový natriuretický peptid (ANP) a endotelový relaxační faktor (EDRF). Svou úlohu hrají také poruchy transportních mechanismů iontů přes buněčnou membránu, které mohou vést ke zvýšení intracelulárního Na^+ a následně i Ca^{2+} , což vede ke zvýšené citlivosti hladkého svalstva cév vůči výše uvedeným presorickým vlivům [13, 16].

Asi 5-10 % všech případů hypertenze tvoří hypertenze **sekundární**, které lze podle příčiny dále rozdělit na hypertenze [13, 15]:

● RENÁLNÍ

Je ze sekundárních hypertenzí nejčastější. Renální ischemie, ať už způsobená koarktací aorty nebo renální arterie, nebo zúžením renálních arteriol a kapilár u glomerulonefritidy a aterosklerózy, má za následek uvolňování reninu.

Tento peptid přes systém renin-angiotenzin-aldosteron (viz kap. 3.2) způsobuje zvýšení TK. Nadměrnou sekreci reninu lze detekovat i u nádorů nebo cystické ledviny.

● ENDOKRINNÍ

Je následkem onemocnění některých endokrinních žláz, která vedou ke zvýšené produkci presorických nebo depresorických látek.

Cushingův syndrom

Neurogeně nebo tumorem hypofýzy podmíněná vysoká sekrece ACTH nebo tumor kůry nadledvin zvyšuje hladinu glukokortikoidů v plazmě. Retence Na⁺ způsobená vysokou hladinou kortizolu a stoupající minutový srdeční výdej způsobený zesíleným účinkem katecholaminů vedou k hypertenzi.

Primární hyperaldosteronismus (Connův syndrom)

Tumor kůry nadledvin produkuje nadměrné množství aldosteronu, což vede ke zvýšení objemu extracelulární tekutiny a dále k hyperdynamické hypertenzi.

Feochromocytom

Způsobuje hyperrezistentní i hyperdynamickou hypertenzi prostřednictvím zvýšené hladiny adrenalinu. Někontrolovatelné zvýšení katecholaminů (a tím pádem i adrenalinu) je způsobeno tímto nádorem dřene nadledvin.

● NEUROGENNÍ

Mozkové tumory, krvácení do mozku, encefalitida a další patologie mohou vyvolat aktivaci sympatiku a tím vzestup TK.

● LÉKOVÉ

Jsou také nazývány iatrogenní. Některá perorální kontraceptiva mohou vést k retenci Na⁺. A tím přispívají k rozvoji hypertenze. Do této skupiny lze zařadit i hypertenzi způsobenou Sunitinibem. Mezi další látky, které mohou zvyšovat krevní tlak, patří např. erythropoetin, cyklosporin, ergotamin, olovo, rtuť a thalium.

● TĚHOTENSKÉ

Hypertenze se vyskytuje u 5-10 % všech těhotenství [15].

Uvedené příčiny hypertenze jsou graficky znázorněny na obr. 6.

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

Benigní hypertenze má pozvolnější nástup, TK nedosahuje příliš vysokých hodnot a jen v malé míře dochází ke změnám orgánů. Projevuje se bolestmi hlavy, krvácením z nosu a závratěmi. Mezi její komplikace patří hlavně ateroskleróza se svými následky jako je ischemická choroba srdeční (ICHS), malacie mozku, ischemie dolních končetin a aneurysma břišní aorty, které se mohou rozvinout až v selhávání srdce, krvácení do mozku a v maligní hypertenzi.

Maligní hypertenze se vyznačuje náhlým a prudkým zvýšením tlaku (TK např. 240/160 mmHg). Může vzniknout bez zjevné příčiny nebo se vyvinout z benigní hypertenze.

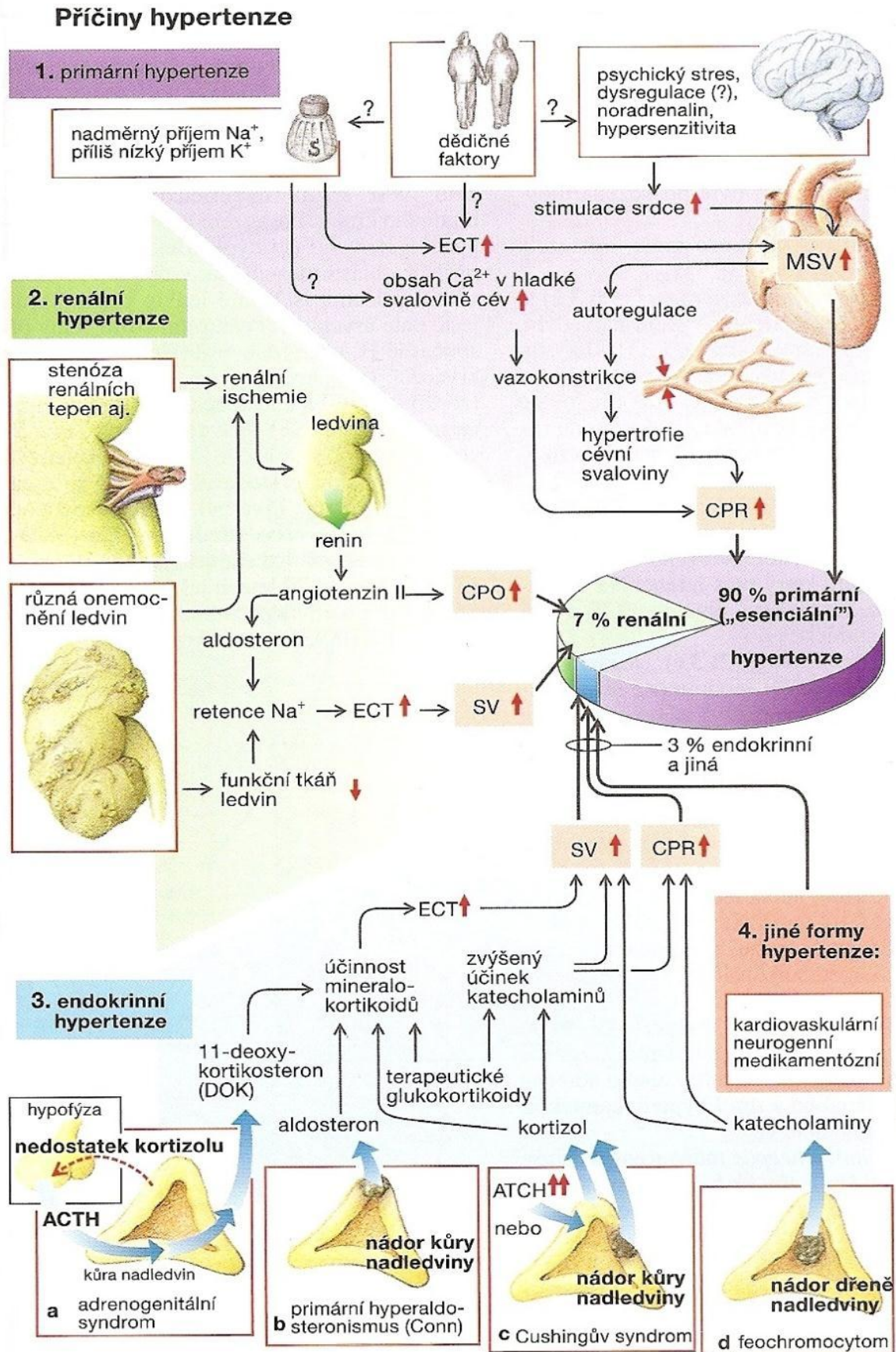
Objevují se změny v orgánech, a to hlavně v ledvinách, kde dochází k poškození drobných tepen a arteriol. Následkem cévních změn vznikají mikroinfarkty (segmentální nekrózy) v glomerulech a vyvíjí se urémie. Často se nachází změny na oční sítnici (krvácení, edém papil aj.). Nemocní umírají během několika měsíců na krvácení do mozku, selhání ledvin nebo srdce [10].

Z klinického hlediska lze odlišit tři vývojová stadia hypertenze, která jsou pro lepší přehlednost shrnuta v tab. 2 [10, 15].

Tab. 2: Vývojová stadia hypertenze [15, 16, upraveno]

STADIUM	PŘÍZNAKY
Stadium I	Prosté zvýšení tlaku, bez orgánových změn
Stadium II	Orgánové změny bez poruchy jejich funkce (např. hypertrofie levé komory, mikroalbuminurie, kalcifikace v tepnách, zvýšení kreatininu).
Stadium III	Těžší orgánové změny a selhávání funkce orgánů (např. ICHS, selhání levého srdce, retinopatie, cévní mozkové příhody, renální selhání)

Obr. 6: Schematické znázornění příčin hypertenze [15 (str. 211)]

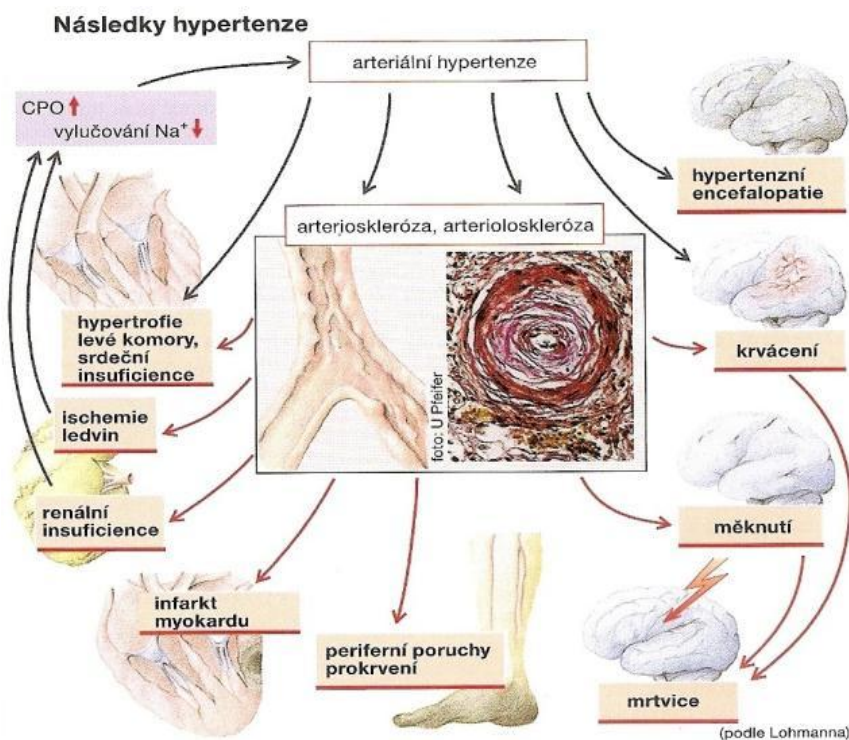


3.4. Následky hypertenze

Následky zvýšeného TK byly nastíněny již v předchozí podkapitole a dále jsou graficky znázorněny na obr. 7.

Dlouhotrvající hypertenze je spolu se zvýšenou hladinou cholesterolu, sníženou hladinou lipoproteinů vysoké hustoty (HDL), hypertrofií levé komory a obezitou významným kardiovaskulárním rizikovým faktorem [20]. Často se vyskytuje spolu s diabetem.

Obr. 7: Schematické znázornění následků hypertenze [13 (str. 213)]



Vysoký TK zatěžuje a poškozuje nejen tepny, kde dává vznik ateroskleróze a aneuryzmatům, ale i srdce. Levá komora se musí adaptovat na tlakové přetížení. Vznikne tzv. hypertenzní srdce (*cor hypertonicum*), jehož hmotnost je celkově vyšší než u zdravého srdce a má ztluštělou stěnu levé komory. Jde o kompenzační mechanismus, který může diagnostiku hypertenze zpozdit až o několik let. Po vyčerpání kompenzačních mechanismů dochází po určité době k dekompenzaci. *Cor hypertonicum decompensatum* se na RTG projeví zvětšením srdce a dále se objeví příznaky srdečního selhávání (edém plic, dušnost aj.). Dojde k dilataci hypertrofické levé komory. Nakonec vzniká bludný kruh. Dekompenzované srdce má vyšší nároky na přívod krve, které nelze vzhledem k aterosklerotickým změnám zužující cévy uspokojit. Dochází k ischemii orgánů. Ischemie ledvin podporuje další zvýšení TK [10, 13] a kruh se uzavírá.

4 ZVÍŘECÍ MODELY

Existuje několik druhů metod používaných v experimentálním výzkumu. Metody *in vitro* („ve skle“), metody *in vivo* („v živých organizmech“) a metody *in silico* („předpověď pomocí počítačových programů“).

Chceme-li podchytit funkci určité složky ve složitém biologickém systému, nevyhneme se použití vhodného experimentálního biologického systému. V systému *in vitro* totiž není možné většinu interakcí probíhajících v biologickém systému věrohodně napodobit. Metody *in silico* by se mohly uplatnit ve výzkumu více, ale jsou zatím jen hubbou budoucnosti. I když je vědci dříve nebo později dovedou „k dokonalosti“, zřejmě budou sloužit jen k nastínění dané situace a zřejmě jen omezí využívání živých modelů.

Používání náležitých modelů kardiovaskulárních onemocnění může poskytnout užitečné informace jednak o příčině nemoci a mechanismu patogeneze, jednak i o možném terapeutickém zásahu.

Ideální zvířecí model kardiovaskulárních onemocnění by měl splňovat následující body [20]:

- Měl by věrohodně napodobovat lidské nemoci.
- Měl by umožnit studium i v chronickém stadiu nemoci.
- Měl by umožnit navození předpovídaných příznaků, které je možno vhodnými způsoby kontrolovat.
- Mělo by být umožněno měření biochemických a hemodynamických parametrů.
- Neměl by požadovat vysoké ekonomické a technické nároky na zajištění správného odchovu zvířat.

Mezi častěji využívané druhy laboratorních zvířat patří myš laboratorní, potkan laboratorní, morče domácí, křeček zlatý a králík domácí [30].

4.1. Laboratorní potkani

Laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*) patří mezi nejčastěji používaná laboratorní zvířata. Je to všežravec. Měří 160 – 270 mm a váží 140 – 500 g (v zajetí až 900 g). Samice bývají o 1/3 menší než samci. Páří se několikrát do měsíce, březost trvá 21-24 dní a vrhají obvykle 7 až 9 mlád'at. Tato mlád'ata pohlavně dospívají přibližně po 1,5 až 3 měsících.

K laboratorním účelům je používán od 50. let 20. století [29].



Obr. 8: Laboratorní potkan

http://www.rozhlas.cz/leonardo/zpravy/_zprava/723068 (8. 4. 2011)

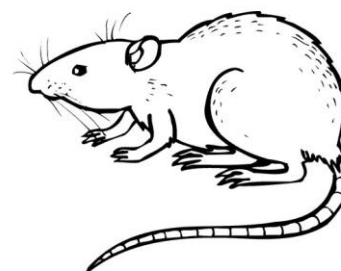
Laboratorní potkani (na obr. 8 a 9) splňují všech pět výše uvedených požadavků na modely kardiovaskulárních onemocnění. Nejběžnější patofyziologické změny v lidském kardiovaskulárním systému, jakými jsou hypertenze, hypertrofie srdce a srdeční selhání, jsou u potkaních modelů úspěšně reprodukovatelné.

Avšak existuje několik problémů, které mohou zkomplikovat výslednou interpretaci výsledků [20]:

- Kardiovaskulární nemoci jako je hypertenze nebo srdeční selhání se u lidí rozvíjejí pozvolna a uplatňuje se mnoho adaptačních mechanismů, především na neurohormonální úrovni. Naproti tomu u potkanů je, vzhledem k jejich krátké době přežívání, nástup hypertenze rychlejší. Adaptační mechanismů není tolik, nebo se nestačí projevit.
- Kardiovaskulární nemoci jsou jen ojedinělé u mladých lidí, jejich výskyt roste s věkem. Přesto se ke sledování hypertenze používají mladí potkani.
- Ateroskleróza je hlavním rizikovým faktorem hypertenze a srdečního selhání. Rozvoj aterosklerózy se u potkanů významně liší od jejího vývoje u lidí. U potkanů se často aterosklerotické změny neprojeví ani při udržování vysokých koncentrací lipidů v krvi.

Obr. 9: Kresba potkana

<http://www.schulbilder.org/malvorlage-ratte-i10437.html> (8. 4. 2011)



4.1.1. SHR potkani

SHR (= *Spontaneously hypertensive rats*) jsou nejčastěji používaným modelem kardiovaskulárních onemocnění, s více než 4000 referencemi v posledních deseti letech. Je známo přes 50 inbredních kmenů.

Všechny jsou získány z outbredních (nehomologních) kmenů potkanů soustavnou selekcí zvířat s požadovanými vlastnostmi (v tomto případě s vysokým krevním tlakem) a jejich dalším křížením. Vysoký krevní tlak je tímto „zafixován“ v genetické výbavě.

Po dvaceti příbuzenských kříženích bratr x sestra se kmeny stanou inbredními, tzn., že všechny jedinci daného kmene budou geneticky prakticky shodní. To je velmi výhodné pro porovnávání výsledků z různých laboratoří.

SHR potkani byli vyvinuti japonskými vědci na univerzitě v Kyotu ze zvířat kolonie Wistar v 70. letech minulého století.

Po prvních 6-8 měsíců jsou kolonie SHR prehypertenzní (systolický tlak 100-120 mmHg). Během 12-14 týdnů se vyvinou v hypertenzní.

Často jsou používány společně s WKY potkany. WKY (z kolonie WistarKyoto) potkani slouží jako normotenzní kontrola. Vznikli později než SHR potkani, také několikanásobným křížením bratr x sestra.

Významné patofyziologické nebo farmakologické rozdíly mezi SHR a normotenzními potkany nemusí nutně souviset s hypertenzí. Daleko častěji jde jen o rozdíly mezi různými koloniemi normotenzních potkanů. Musíme tedy počítat s tím, že i přes značné omezení variability inbredním křížením se mohou některé odchylky při výzkumu projevit.

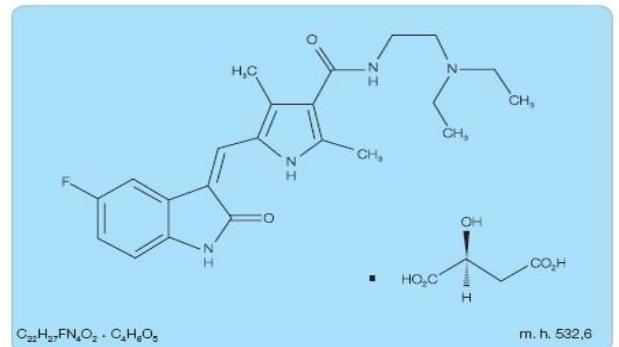
Stejně jako u lidí i u potkanů se hypertenze vyvíjí rychleji a přichází více zprudka u samců než u samic. Samci SHR potkanů se tedy s výhodou (i vzhledem k jejich poměrně krátké době přežívání – 1,5 – 2,5 let) používají v mnoha studiích jako modely hypertenze, např. k výzkumu změn v signálních mechanismech vyvolaných hypertenzí, nebo k testování nových antihypertenzních léčiv. Dokud nejsou identifikovány geny zodpovědné za vývoj hypertenze, je jedním z mnoha cenných přínosů inbredních genetických modelů mapování a identifikace těchto genů [20].

5 SUNITINIB

5.1. Obecné vlastnosti

Sunitinib (obr. 10, 11) je mnohočetný inhibitor receptorů tyrozinkináz. Patří do farmakologické skupiny antineoplastik. Vyskytuje se ve formě solí jako sunitinib malát. Tento žlutý až oranžový prášek se podává perorálně. Maximální plazmatické koncentrace dosahuje mezi 6 - 12 hod po podání.

<http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profilu/Sunitinib/6-I-jp.magarticle.aspx> (14. 4. 2011)



Obr. 10.: Vzorec sunitinibu

Sunitinib i jeho primární metabolity jsou v těle metabolizovány pomocí cytochromu P450, CYP3A4. Primárně je vylučován stolicí [26, 28].

V ČR je jeho podávání schváleno od července r. 2006 [28].

5.2. Léčba, indikace, dávkování

Sunitinib je využíván v onkologii k léčbě těchto třech skupin nádorových onemocnění [27]:

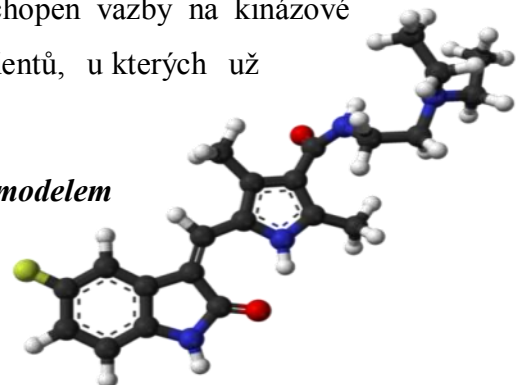
- 1) **Gastrointestinální stromální tumor (GIST).**
- 2) **Metastatický renální karcinom (mRCC).**
- 3) **Neuroendokrinní nádory pankreatu.**

Sunitinib se používá u pacientů s nádory, které nelze odstranit operativně, které se rozšířily do dalších tkání těla nebo u kterých selhala předchozí terapie.

Účinnost v léčbě GIST byla prokázána v randomizované dvojité zaslepené klinické studii u pacientů s metastazujícím a neresekovatelným GIST, u kterých nebyla účinná předchozí léčba imatinibem [23, 24]. Molekula sunitinibu má odlišný tvar od molekuly imatinibu. Díky tomuto rozdílu je sunitinib stále schopen vazby na kinázové domény a zastavit tak buněčnou proliferaci u pacientů, u kterých už imatinib v této roli selhal [28].

Obr. 11: Struktura sunitinibu vyjádřená kuličkovým modelem

<http://en.wikipedia.org/wiki/Sunitinib> (14. 4. 2011)



U pacientů s pokročilým renálním karcinomem, u kterých nebyla úspěšná cytokinová terapie, vykazoval sunitinib také protinádorovou aktivitu. Studie ukázaly, že je o víc jak 20 % účinnější jako lék první volby než léčba interferonem α . Sunitinib se tak stal hlavním standardem pro léčbu RCC.

Sunitinib byl podáván v 6 týdenních cyklech. Po dobu 4 týdnů byl perorálně podáván Sunitinib jednou za den v dávce 50 mg [23, 25]. Následovaly 2 týdny přestávky. Dávkování je nutné upravit při objevení nežádoucích účinků (viz. kap. 5.4).

V EU byl sunitinib schválen pro pacienty s neresekovatelným a/nebo metastazujícím nádorem GIST, u kterých selhala léčba imatinibem, a dále jako lék 1. linie pro pacienty s pokročilým a/nebo metastazujícím RCC [23].

5.3. Mechanismus účinku

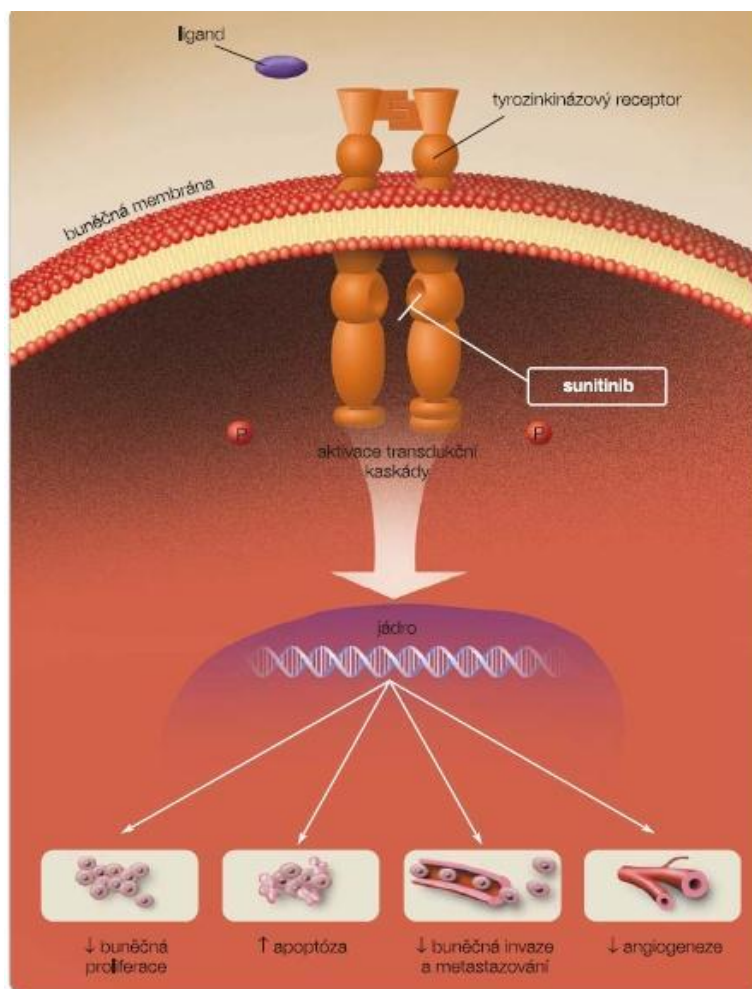
Sunitinib i jeho primární metabolit působí jako selektivní inhibitory tyrozinkinázových receptorů (RTKs) [23, 25, 28].

Tyrozinkinázy jsou buněčné enzymy, které katalyzují vazbu fosforylových skupin na aminokyselinu tyrozin. Tato fosforylace vyvolá následné spuštění buněčné signalizační kaskády, která buňkám slouží k přenosu signálů z jejich zevního prostředí do jádra buňky. Jako zdroj fosfátové skupiny využívají ATP. Pokud dojde k tomu, že se na tyrozinkinázy místo ATP naváže příslušný inhibitor, k fosforylaci tyrozinu nedochází a přenos signálu do buňky je tím přerušen. Sunitinib se specificky váže na tyrozinkinázové domény VEGFR-1, VEGFR-2 a VEGFR-3, PDGFR α a PDGFR β , KIT a dalších receptorů. Navázáním sunitinibu na receptor, dojde k inhibici aktivace buněčných signálních drah, což má za následek poškození angiogeneze a zastavení progresu nádoru [24, 28]. Angiogeneze hraje hlavní roli ve vývoji a šíření zhoubného nádoru (obr. 13). V současné době je mnoho antiangiogenetických léčebných postupů zacíleno na VEGF cestu. Některé z nich působí přes inhibici VEGF (např. bevacizumab), jiné působí přímo na VEGF receptor (sunitinib) [19, 26]. VEGF stejně jako PDGF a další vážou tyrozinkinázové receptory na buňky endotelu a cévní pericyty a podporují nádorovou angiogenezi. Naproti tomu u zdravých lidí není VEGF potřebný pro správnou funkci a obnovu cévního řečiště. Předností sunitinibu je jeho mnohočetný účinek i to, že působí cíleně na specifické receptory nádorové buňky. Přes inhibici cesty VEGF brzdí angiogenezi v nádoru, tím snižuje jeho

krevní zásobení, které je nezbytné pro jeho růst a šíření. Dochází tak k zastavení růstu nádoru a zamezení jeho progresu do dalších tkání [19, 22, 28].

Obr. 12: Mechanismus účinku sunitinibu

<http://www.remedia.cz/Images/Articles/Main/vtextu20081016022255.j>
pg (14. 4. 2011)



Obr. 13: VEGF a stimulace růstu cév nádorovou tkání

VEGF je hlavním regulátorem fyziologického i patologického růstu cév. Aktivuje tyrozinkinázy, které se nacházejí na povrchu endoteliálních buněk, a stimuluje tak růst endoteliálních cév. Pokud nádor doroste do určité velikosti (0,5-2,0 mm), nádorové buňky začnou trpět nedostatkem kyslíku a živin (1). Začnou vytvářet signální látky (viz. obr. 14), které zajišťují růst nových cév a tím i další růst nádoru (2, 3).



http://medicina.bloguje.cz/517583_item.php (14. 4. 2011), upraveno

5.4. Nežádoucí účinky

Nežádoucí účinky se objevují u většiny pacientů a u 32 % pacientů vedly ke snížení dávkování sunitinibu během léčby a u 8 % k ukončení léčby [21].

K nejběžnějším vedlejším účinkům patří [24, 27]:

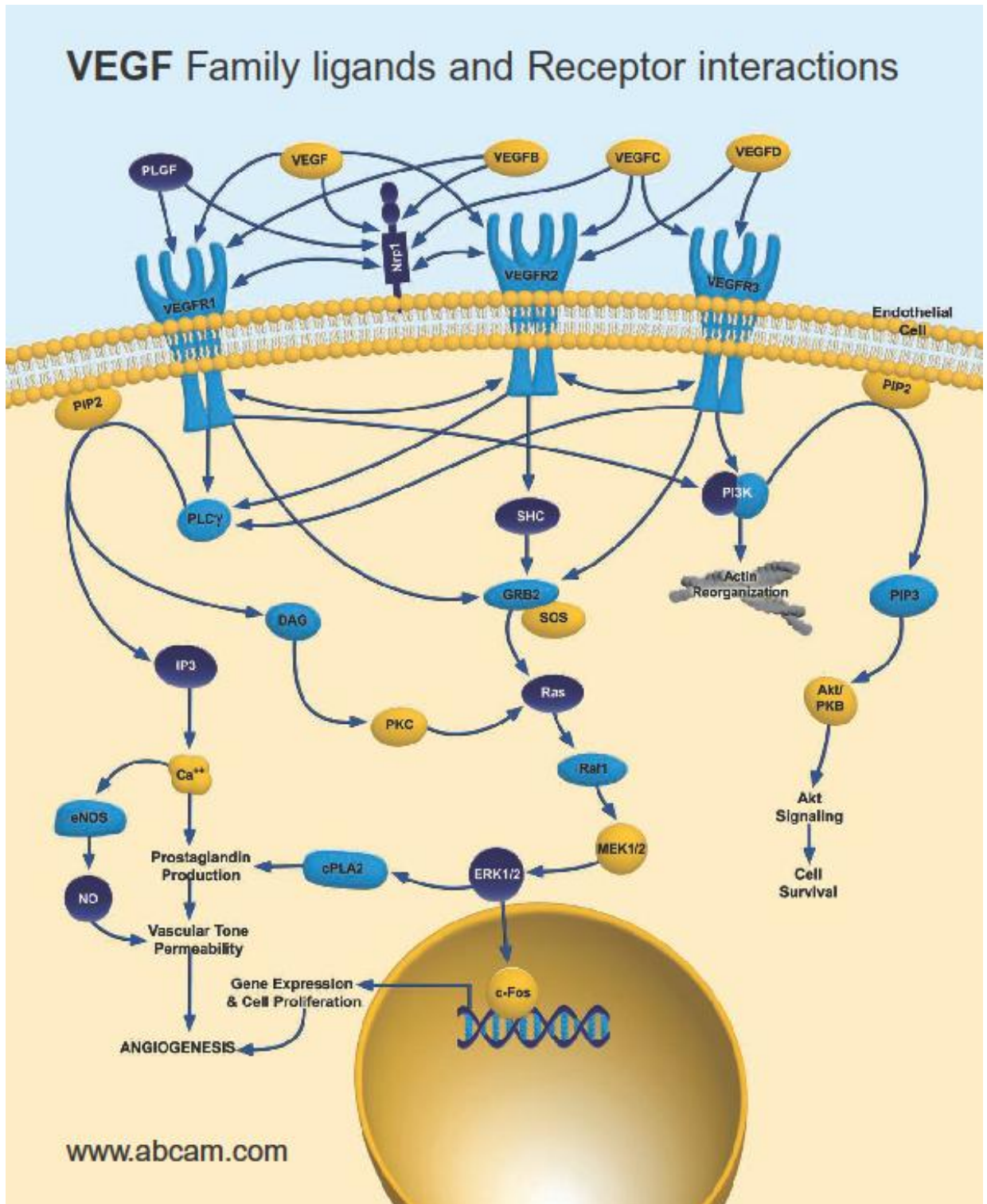
- Únava
- Gastrointestinální potíže (záněty ústní dutiny, nauzea, zvracení, průjem).
- Změny zbarvení kůže (žluté zbarvení nebo depigmentace).

Z dalších vedlejších účinků je třeba zmínit tyto:

- Riziko krvácení.
- Hypertenze (viz. kap. 5.5) a dysfunkce levé srdeční komory.
- „Hand-foot“¹ syndrom.
- Zvýšené riziko tromboembolických příhod.
- Neutropenie a trombocytopenie.
- Hypotyroidismus.

¹**Hand foot syndrom** (HFS) je důsledkem kožní toxicity protinádorové terapie. Jde o exantémové virové onemocnění, jehož projevy jsou lokalizovány na dlaních rukou, ploskách nohou a ústech (1).

Obr. 14.: Signální kaskáda VEGF řídící angiogenezi



<http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11652> (16. 4. 2011)

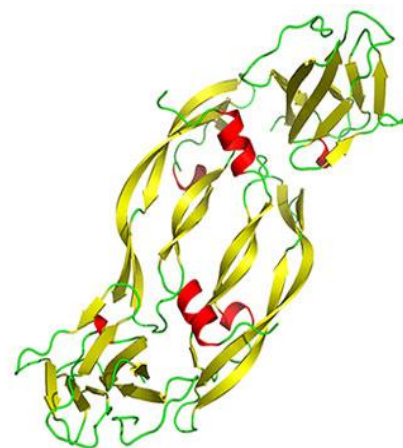
5.4.1. Sunitinib a hypertenze

Hypertenze je jeden z mnoha nežádoucích účinků při léčbě pomocí inhibitorů tyrozinkináz. Přesné příčiny vzniku hypertenze při léčbě sunitinibem nejsou známe. U hypertenzních pacientů lze nalézt společné znaky přestavby cévního systému, snížení počtu arteriola a kapilár, zúžení cévní stěny a snížení její pružnosti, snížení biologické aktivity NO a zvýšení VEGF v plazmě. Klíčovou roli v regulaci TK a cévní přestavby hraje endotel. Cévní endoteliální růstový faktor (VEGF) neřídí jen angiogenezi, ale také ovlivňuje endotelové buňky. Sunitinib působící na receptor pro VEGF proto také neovlivňuje jen angiogenezi, ale prostřednictvím VEGF i samotný endotel. Poslední výzkumy naznačují, že snížení nebo neutralizace cirkulujícího VEGF může hrát hlavní roli v indukci hypertenze. Vědci se domnívají, že hypertenzní účinky tyrozinkinázových inhibitorů se mohou uplatňovat přímo na úrovni mikrovaskulárního systému skrz procesy jako řidnutí cévního řečiště (což vede ke zvýšení cévního odporu), endotelové dysfunkce a změny v metabolismu NO.

Hypertenze je jedním z nejobvyklejších nežádoucích účinků při léčbě sunitinibem, proto je žádoucí v průběhu terapie TK pečlivě sledovat a případně zasáhnout vhodnou antihypertenzní terapií [19, 22].

Obr. 15: Struktura VEGF

<http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=118> (14. 4. 2011)



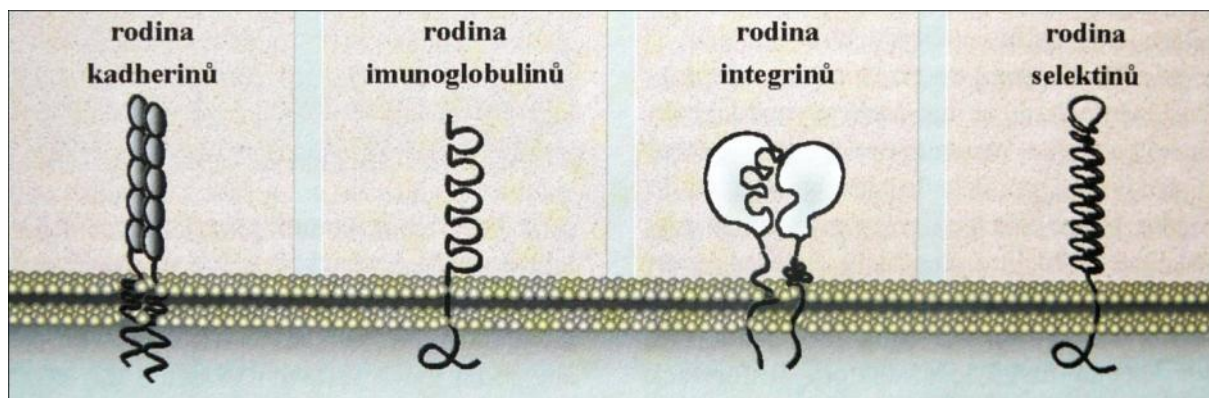
6 ADHEZNÍ MOLEKULY

Adhezní molekuly (CAM = cell adhesion molecules) jsou z fylogenetického pohledu nejstaršími nástroji komunikace mezi buňkami [6]. O jejich významnosti pro život buněk vypovídá i skutečnost, že většina buněk vyskytujících se v mnohobuněčném organismu je v kultuře schopna růst až po adhezi na pevný podklad [14].

Neslouží však jen jako nástroj komunikace mezi buňkami, zprostředkovávají také přenos informací z okolního prostředí – z extracelulární matrix – dovnitř do buňky. Účastní se regulace mnoha zásadních buněčných dějů jako je proliferace, diferenciací, exprese genů, fagocytózy, migrace a apoptózy. Jsou také součástí různých patofyziologických pochodů, např. zánětu. A v některých případech dokonce samy zprostředkovávají vniknutí patogenů do buňky [6, 7].

Podle struktury lze adhezní molekuly rozdělit do čtyř skupin, tzv. rodin (obr. 16).

Obr. 16: Základní členění adhezních molekul [8 (str. 40, upraveno)]



Kadheriny jsou transmembránové proteiny, které se pomocí speciálních proteinů váží na struktury cytosketu a zajišťují tak tvorbu mezibuněčných spojů. Jejich funkce závisí na Ca^{2+} . Vyskytují se hlavně v nervovém systému, kosterních svalech a játrech [4,14].

Integriny se skládají z heterodimerních podjednotek α a β . Podílejí především na přenosu signálů z vnějšího prostředí dovnitř do buňky, mohou v cytoplazmě aktivovat

několik typů tyrozinkináz. Pomocí extracelulárních adaptorových proteinů jako je fibronectin a laminin jsou integriny připojeny ke kolagenním vláknům; intracelulární adaptorové proteiny jako talin a vinkulin je uchycují k cytoskeletu buňky. Podílejí se na regulaci buněčného cyklu, zajišťují integritu buněk. Bez těchto molekul buňky nemohou přežít a vstupují do apoptózy. [8, 14].

Selektiny jsou lektinu podobné transmembránové molekuly, které jsou exprimované na leukocytech (L-selektiny), endoteliálních buňkách (E- a P-selektiny) a trombocytech (P-selektiny). Zprostředkovávají rolování leukocytů, leukocytární a destičkovou agregaci. P-selektin je skladován v α -granulích trombocytů a ve Weibel-Paladeho zrnekch v endoteliálních buňkách, ze kterých se po stimulaci mohou rychle uvolnit. Syntézu E a P-selektinů v endoteliálních buňkách podporují cytokiny, bakteriální toxiny a antioxidanty.

Imunoglobuliny tvoří rodinu glykoproteinů, která je na povrchu leukocytů zastoupena nejvíce ze všech typů adhezních molekul. Také jsou exprimovány aktivovaným endotelem. Jejich společným znakem je, že obsahují imunoglobulinovou doménu. Struktura jednotlivých typů imunoglobulinů je zobrazena na obr. 17. [8, 18].

Obr. 17: Schematické znázornění struktury jednotlivých druhů imunoglobulinů

[8 (str. 50, uprav.)]



ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) je transmembránový protein tvořený pěti imunoglobulinovými doménami a přítomný v malých koncentracích v membráně leukocytů a endoteliálních buněk. Jejich koncentrace se zvyšuje po stimulaci cytokiny (TNF α , IL-1, INF γ) a lipopolysacharidy. Tento nárůst je více patrný v orgánech, kde je za klidového stavu exprese ICAM-1 nižší (např. srdce), než v orgánech, které vykazují před stimulací cytokiny relativně značnou expresi ICAM-1 (např. plíce) [8, 17].

Ke zvýšení exprese ICAM-1 dochází po 6-8 hodinách od začátku stimulace buněk a velké množství na povrchu buněk lze detekovat po dobu 48 hodin [8].

Společně s molekulami ICAM-2 a ICAM-3 napomáhá k pevnějšímu připojení rolujících leukocytů k endotelu a jejich následnému prostupu ven z cévního řečiště. Molekuly ICAM interagují s integrinovým heterodimerem. Další adhezní molekuly a jejich receptory jsou uvedeny v tab. 3.

VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) zprostředkovává adhezi lymfocytů a monocytů k zaníceným cévním vrstvám. Podílí se i na adhezi leukocytů mimo cévní řečiště.

PECAM -1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) je molekula exprimovaná na granulocytech, monocytech, trombocytech a endotelových buňkách cév [8]. Její exprese není vyvolána cytokiny, proto se může použít jako parametr ke zjištění plochy cévní stěny [17].

MAdCAM-1 (mucosal addressin-cell adhesion molecule 1) se vyskytuje hlavně v endotelových buňkách, v Peyerových placích ve střevě. Její exprese je zesílena TNF α a IL-1.

Selektiny zprostředkovávají počáteční fázi interakce mezi leukocyty a endoteliálními buňkami, která se projevuje jako rolování leukocytů. Tato přechodná vazba iniciuje další leukocytární aktivaci, která vede k migraci leukocytů ven z cévního řečiště. Transendoteliální pohyb leukocytů je zprostředkován interakcemi mezi integrinovými a imunoglobulinovými adhezními molekulami [17].

Tab. 3: Přehled adhezních molekul [6 (str. 559, upraveno)]

Typ adhezní molekuly	Název	Lokalizace exprese	Receptor
I M U N O G L O B U L I N Y	ICAM-1	b. endotelu, monocyty, lymfocyty, fibroblasty, dendritické b, epiteliální b. aj.	LFA-1, Mac-1
	ICAM-2	endoteliální b., monocyty, lymfocyty, dendritické b.	LFA-1
	ICAM-3	leukocyty, dendritické b.	LFA-1
	PECAM-1	endoteliální b., trombocyty, monocyty, PMN, T-lymfocyty, dřeňové kmenové buňky, solidní nádory	není znám
	VCAM-1	endoteliální b., monocyty, dendritické b., fibroblasty, myoblasty	VLA-4
SELEKTINY	E-selektin	endoteliální b.	sialovaný-Lewisův Ag
	L-selektin	lymfocyty, monocyty, granulocyty	fukosylované glykoproteiny
	P-selektin	trombocyty, endoteliální b.	PSGL-1
INTEGRINY	LFA-1	lymfocyty, monocyty, granulocyty	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	Mac-1	monocyty, granulocyty, NK-b. aj.	ICAM-1, C3b, LPS aj.
	VE-cadherin	endoteliální b.	VE-cadherin

LFA-1 – lymphocyte function-associated antigen

Mac-1 – integrinový heterodimer

VLA-4 – very late antigen (pozdní aktivační antigen)

PSGL-1 – P-selectin glycoprotein ligand

VE-cadherin – vascular endothelial cadherin

LPS - lipopolysacharid

6.1. AM a patofyziologické pochody v organizmu

Významným faktorem pro expresi adhezních molekul na povrchu buněk jsou nejen cytokiny a lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, ale i oxidační a hemodynamický stres, jehož hlavním produktem je ICAM-1. Patofyziologické stavy jako hypercholesterolemie a hypertenze vykazují imunoaktivační účinky. Při mikrovaskulárních poraněních způsobených výše uvedenými mechanizmy může na různých úrovních cévního řečiště dojít k různým projevům (kapiláry se zvýšeným nahromaděním leukocytů ucpávají, což způsobuje hypoxii okolní tkáň, a poškození bariéry v podobě funkčního endotelu může vyvolat únik tekutiny s následným edémem; v arteriích jsou tyto vazodilatační účinky oslabovány acetylcholinem) [17].

7 ZADÁNÍ PRÁCE, CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zjistit a popsat expresi ICAM-1 v pravé femorální artérii u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) a normotenzních Wistar Kyoto (WKY) potkanů s ohledem na podávání léčiva sunitinibu za použití imunohistochemických metod.

8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1. Sunitinib – design experimentu

V podstatě šlo o dva současně probíhající pokusy s dlouhodobým podáváním sunitinibu (10 mg/kg za den v pitné vodě).

První pokus zahrnoval SHR inbrední samce a druhý WKY potkany, také inbrední samce. WKY potkani mají stejný genetický základ jako SHR, akorát jsou normotenzní. Každý z obou pokusů sestával ze dvou skupin zvířat. První skupině byl podáván sunitinib, druhá skupina pak sloužila jako kontrola a zvířatům byla podávána pouze voda. Aplikace sunitinibu (nebo čisté vody u kontrolní skupiny) probíhala denně po dobu 8 týdnů, což představuje dvakrát tak delší dobu, než je doporučována u pacientů. Po těchto 8 týdnech se potkanům nechalo 5 dní na zotavení. Poté následovalo další podávání sunitinibu: u SHR potkanů 8 týdnů, u WKY pouze 2 týdny. U WKY potkanů nešlo v podávání sunitinibu pokračovat z důvodu úbytku tělesné hmotnosti a vzhledem k objevení výrazných příznaků celkové toxicity.

Usmrcení zvířat proběhlo 24 h po poslední dávce.

8.2. Imunohistochemie

Imunochemická analýza byla provedena na pravých femorálních arteriích potkanů. Odebrané segmenty cév byly ponořeny do zmrazovacího média, poté zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při minus 80°C. Pro vlastní analýzu byly na zmrazovacím mikrotomu zhotoveny série příčných řezů o tloušťce 7 μm . Řezy byly vloženy na sklíčko s želatinou, následně vysušeny vzduchem a na konci přípravné fáze fixovány v acetonu (20 min. při teplotě 20°C).

Pro detekci exprese ICAM-1 byla použita metodika En Vision s detekcí pomocí DAB.

8.2.1. Metodika En Vision

Pracovní postup

Po fixaci preparátu v acetonu se nechala sklíčka 30 minut sušit na vzduchu. Pak byly řezy na 5 minut vloženy do fosfátového pufru (PBS). Než se mohla aplikovat primární protilátka, bylo nutné zablokovat nespecifická vazebná místa pomocí 10%

roztoku goat séra – kozího séra (Sigma-Aldrich, Německo) ředěného v PBS. Goat sérum se nechalo na tkáň působit po dobu 30 minut.

Teprve v dalším kroku bylo možné nanést primární protilátku mouse anti-rat ICAM-1 (CD54) ve zředění 1/100 (PharMingen, USA). Primární protilátka se nechala inkubovat po dobu 1 hodiny. Poté byly řezy dvakrát po dobu 5 minut opláchnuty v PBS.

Endogenní peroxidázovou aktivitu tkáně bylo nutno potlačit použitím 3% peroxidu vodíku (ředěného v PBS), působení po dobu 15 minut. Po oplachu (2x5 minut v PBS) byla nanesena sekundární protilátka goat anti-mouse IgG (DAKO, USA) na 30 minut. Po oplachu (2x5 minut v PBS) byla provedena vizualizace navázaných protilátek pomocí DAB - diaminobenzidinu (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, USA). DAB působil na tkáň po dobu 45 sekund. DAB způsobí v místě detekce antigenu hnědé zbarvení.

Po oplachu byly jádra buněk dobarveny hematoxylinem. Dále byly řezy zbaveny přebytečné vody v odvodňovací řadě: aceton-xylen (10:1) na 3 min., aceton-xylen (1:10) na 3 min. a xylen (3x2 min.). Nakonec byla sklíčka zamontována do Eukittu.

9 VÝSLEDKY

9.1. Imunohistochemické barvení ICAM-1 v pravé femorální tepně

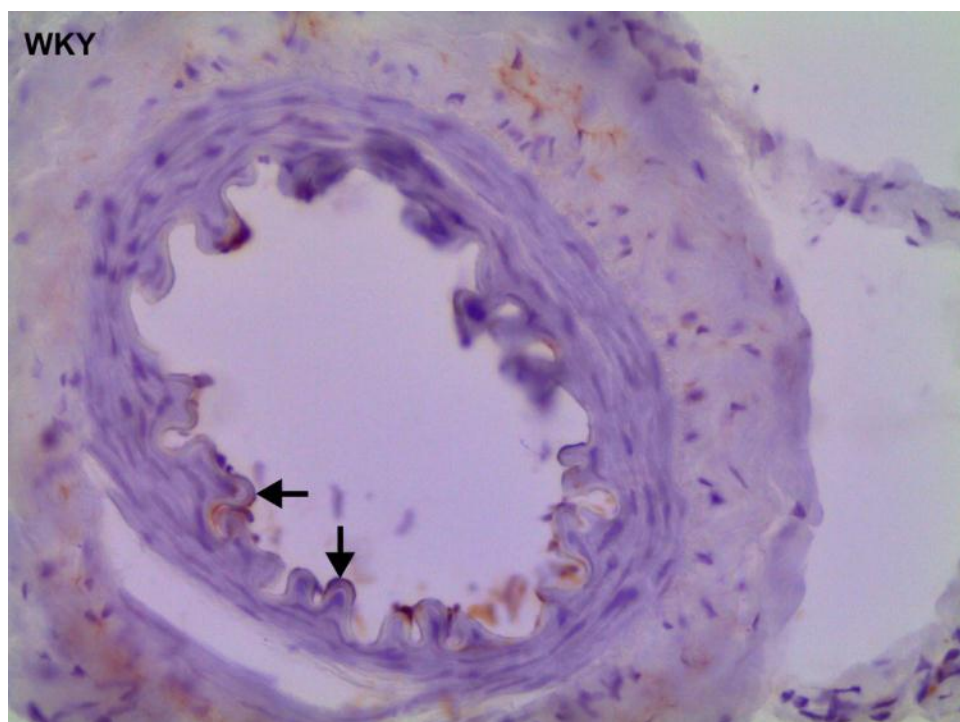
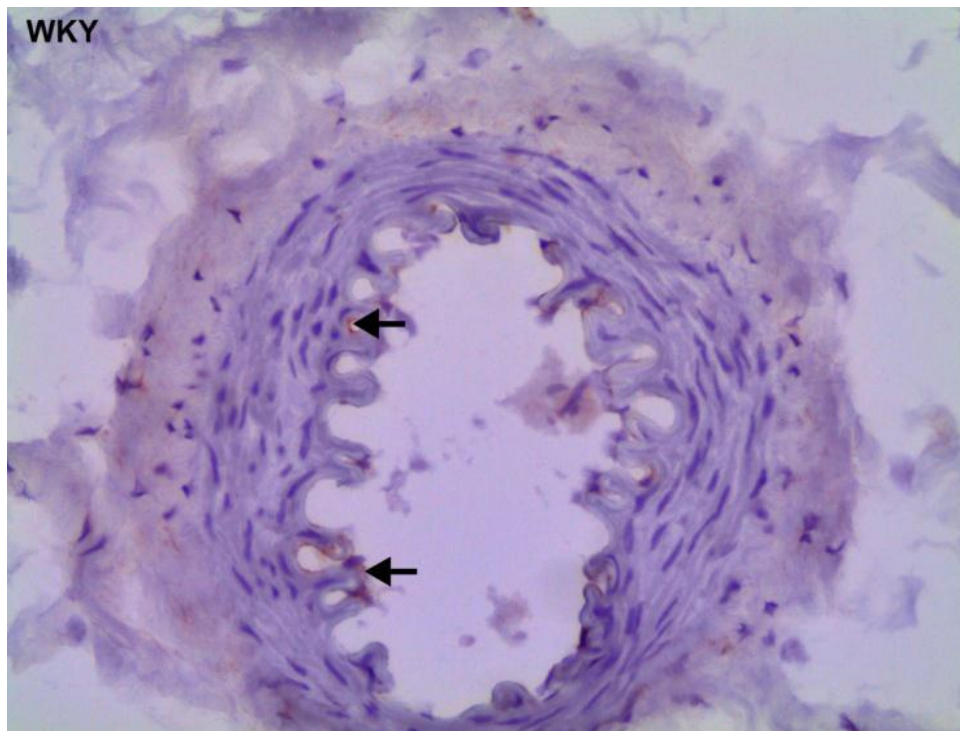
Celkově lze konstatovat, že v cévách nebyly pozorovány žádné morfologické abnormality viditelné ve světelném mikroskopu.

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 ICAM-1 pouze u endotelových buněk.

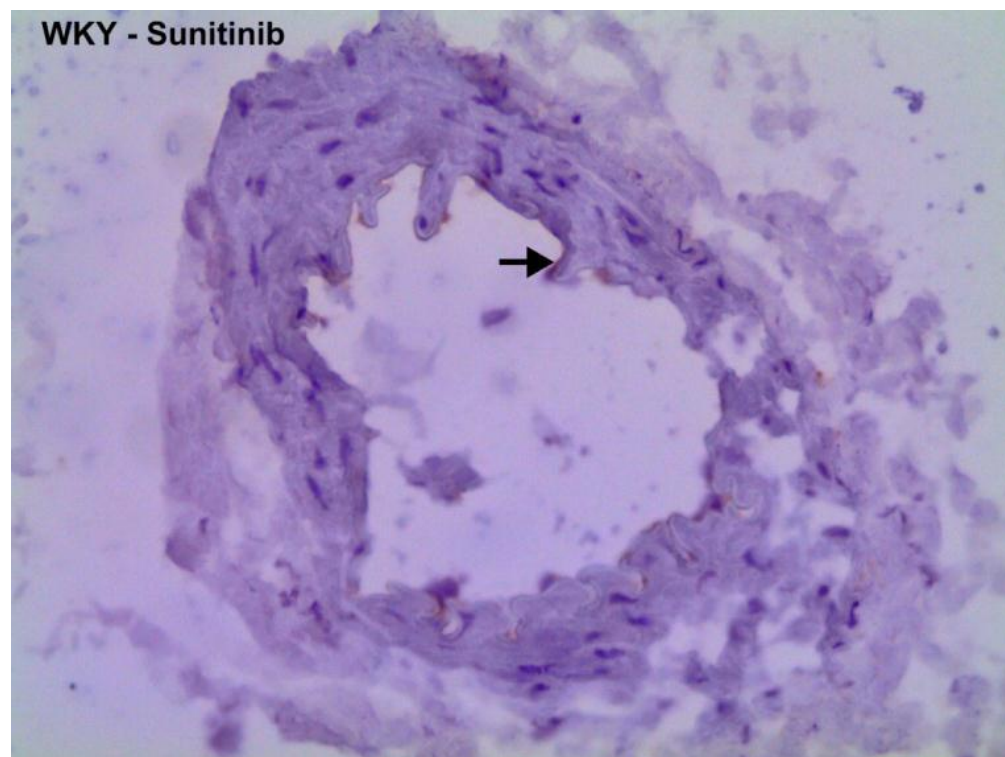
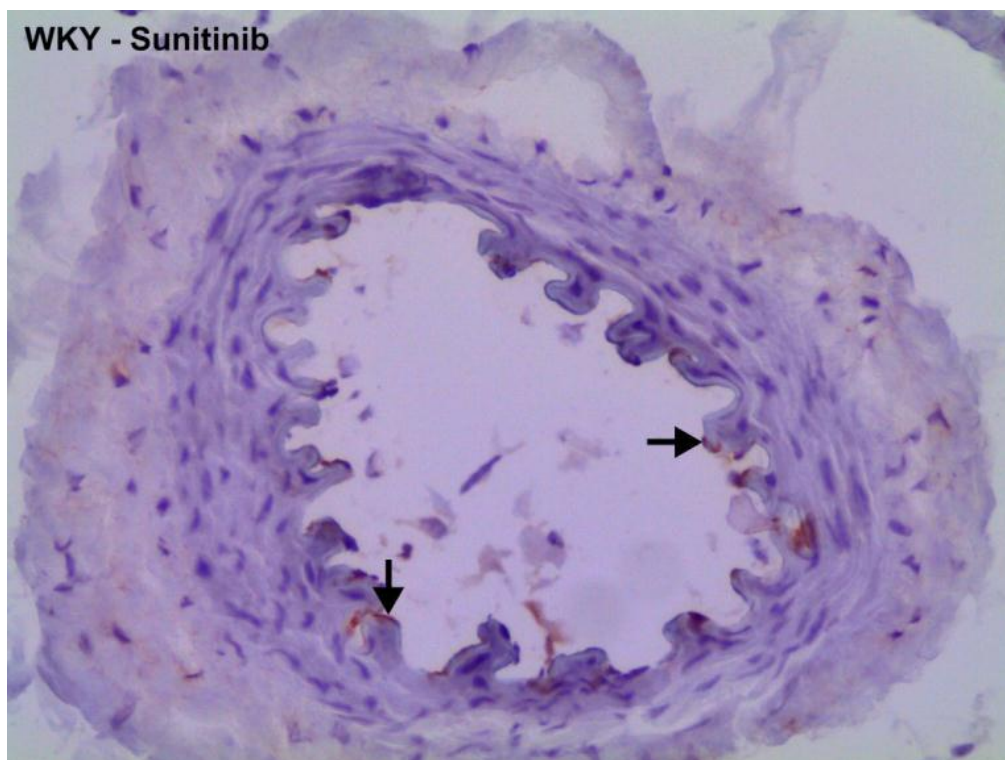
Expresie byla ve všech testovaných skupinách velmi slabá. U některých cév jsme nenalezli vůbec žádnou expresi a to bez ohledu na skupinu zvířat (bez obrázků). Velmi slabá expresie byla pozorována u 2 zvířat v každé skupině, nicméně jednalo se o slabou expresi na úrovni jednotlivých endoteliálních buněk. Z důvodu takto slabé reakce jsme nakonec nepřistoupili ke kvantifikaci imunohistochemických barvení (obr. 18-25).

Obr. 18 – 19: Reprezentativní obrázky preparátů (2 obrázky každé z jiného zvířete) *po imunohistochemickém barvení exprese ICAM-1 ve femorální tepně u WKY potkanů bez Sunitinibu*. Slabá exprese je vidět pouze u několika endoteliálních buněk (šipky).

Zvětšení 20x.

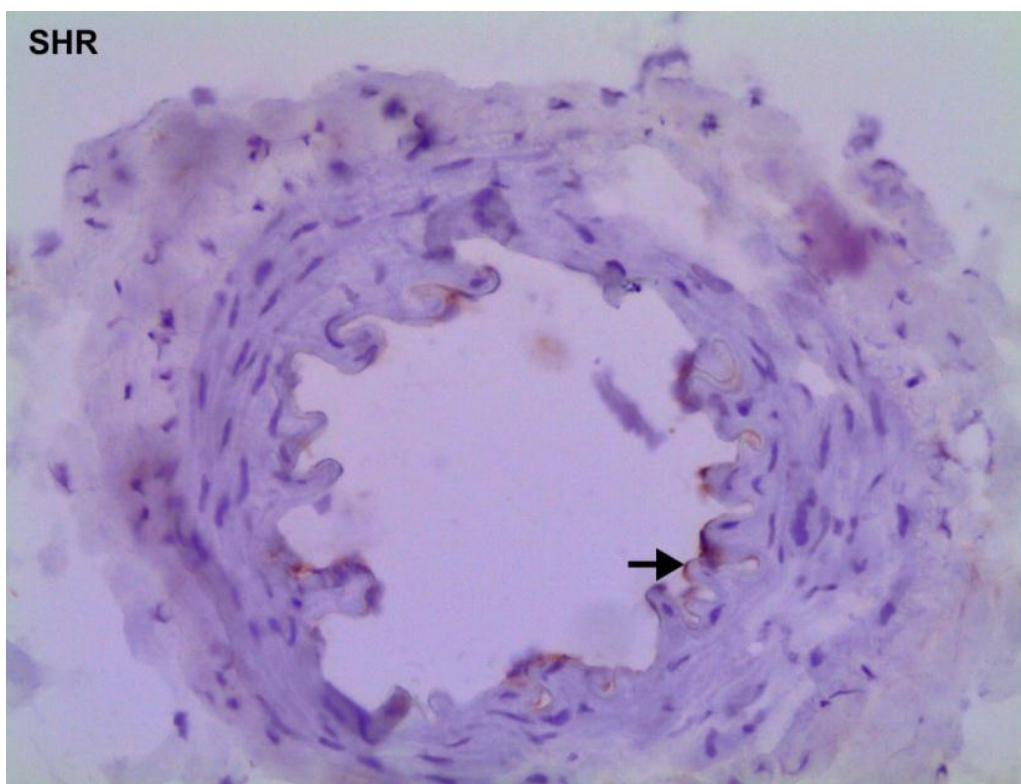
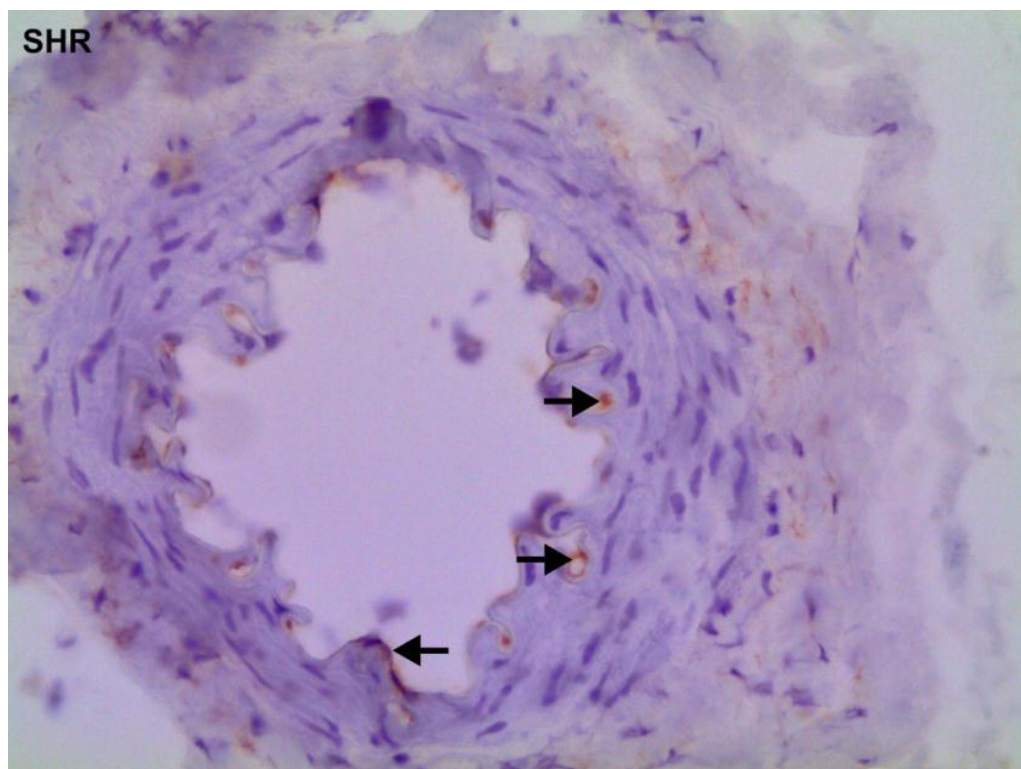


Obr. 20 – 21: Reprezentativní obrázky preparátů (2 obrázky každé z jiného zvířete) **po imunohistochemickém barvení exprese ICAM-1 ve femorální tepně u WKY potkanů po podání Sunitinibu.** Slabá exprese je vidět pouze u několika endoteliálních buněk (šipky). Zvětšení 20x.

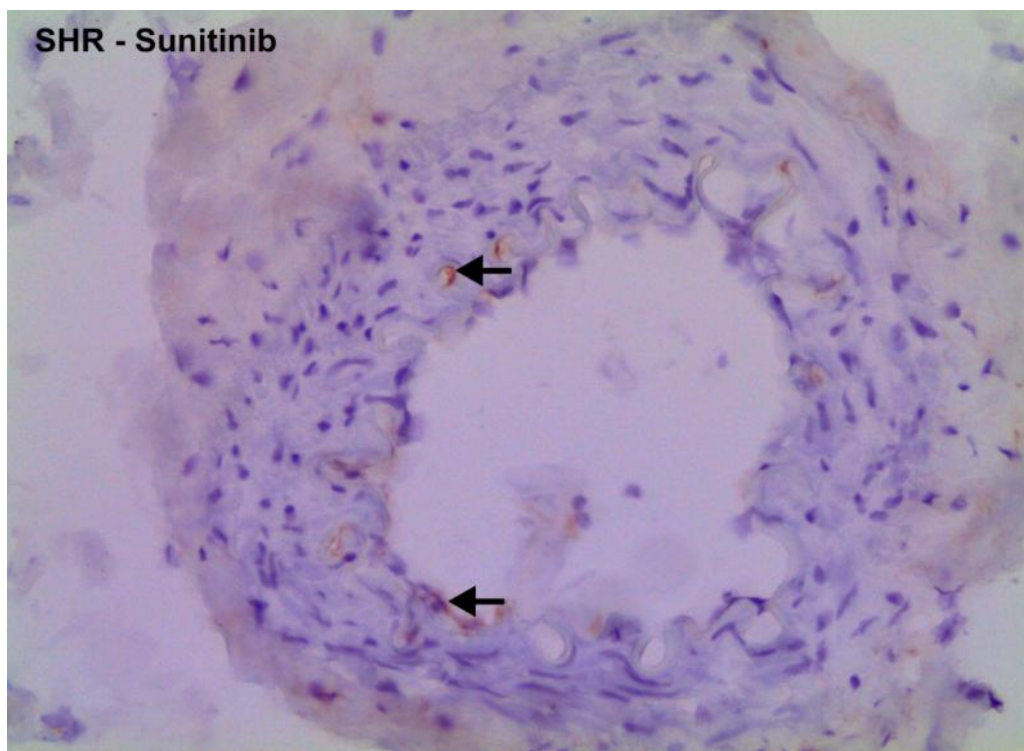
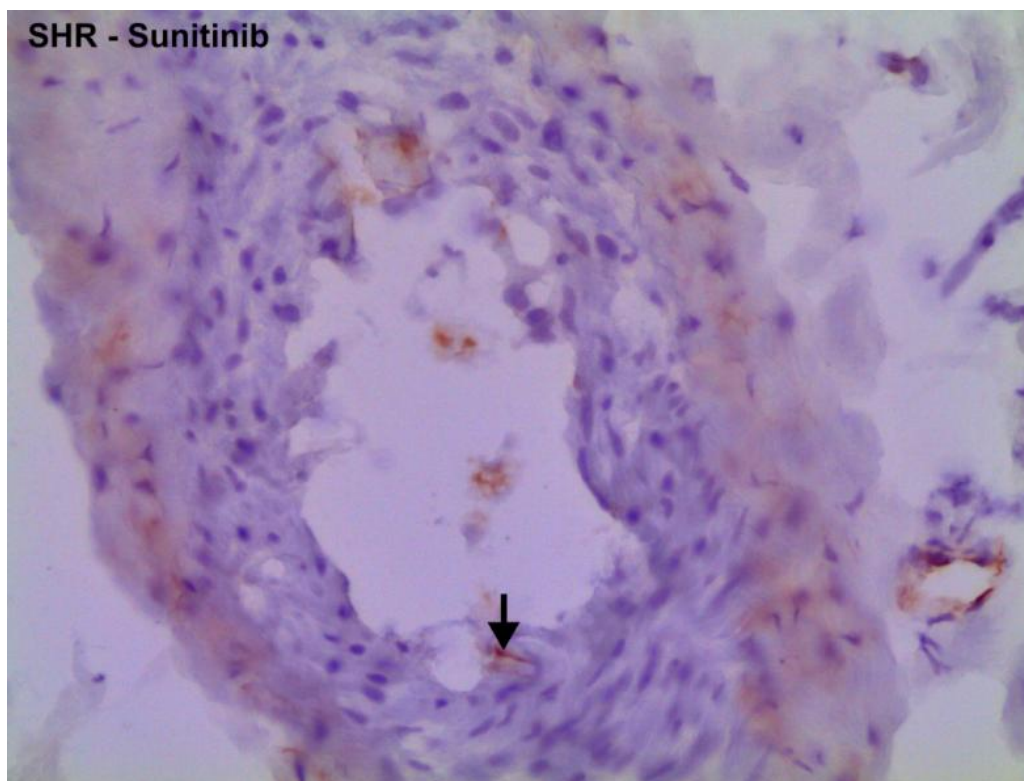


Obr. 22 – 23: Reprezentativní obrázky preparátů (2 obrázky každé z jiného zvířete) **po imunohistochemickém barvení exprese ICAM-1 ve femorální tepně u SHR potkanů bez Sunitinibu.** Slabá exprese je vidět pouze u několika endoteliálních buněk (šipky).

Zvětšení 20x.



Obr. 24 – 25: *Reprezentativní obrázky preparátů (2 obrázky každé z jiného zvířete) po imunohistochemickém barvení exprese ICAM-1 ve femorální tepně u SHR potkanů po podání Sunitinibu. Slabá exprese je vidět pouze u několika endoteliálních buněk (šipky). Zvětšení 20x.*



10 DISKUSE

Sunitinib a jeho primární metabolit (SU012662) jsou definovány jako mnohočetné inhibitory receptorů tyrozinkináz (RTKs) a jsou spojeny s nádorovým růstem a angiogenezí. Sunitinib je silný inhibitor RTKs se střední protinádorovou aktivitou a je využíván pro léčbu progredujících gastrointestinálních stromálních tumorů (GIST) nebo u těch pacientů, u nichž selhala předchozí léčba imatinibem [22]. Dále se používá jako lék první volby u pacientů s metastazujícím renálním karcinomem (RCC), u kterých vykazuje větší účinnost než interferon α [34].

Cílem Sunitinibu jsou tyto receptory tyrozinkináz: receptory pro růstový faktor destiček (PDGFR α a PDGFR β), receptory pro endoteliální růstový faktor (VEGFR-1, VEGFR-2 (Flk-1/KDR), VEGFR-3), receptory pro kolonie stimulující faktor typu 1 (CSF-1) receptory pro růstový faktor kmenových buněk (KIT), Fms protein tyrozinkinázy 3 (FLT-3) a receptory pro neutrofický faktor odvozeného od gliálních buněk (RET) [32].

Sunitinib jako inhibitor angiogeneze hraje důležitou roli v blokování extracelulární vazby vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) na jeho receptor (VEGFR) a to působením anti-VEGF protilátek. Další úloha sunitinibu je inhibice pomocí blokování intracelulární signalizační dráhy VEGFR těch signálních přenosů, které jsou zprostředkovány receptory tyrozinkináz [37].

Výše uvedené účinky jsou alespoň částečně zodpovědné za většinu klinicky nepříznivých účinků, které způsobí rozvoj arteriální hypertenze. K rozvoji vysokého stupně hypertenze došlo u 21,6% pacientů, kteří byli léčeni sunitinibem. U 6,8% pacientů tato léčba významně zvýšila riziko rozvoje vysokého stupně hypertenze [22].

Cílem této práce bylo zjistit a popsat expresi ICAM-1 v pravé femorální arterii u spontánně hypertenzních potkanů (SHR) a Wistar Kyoto (WKY) potkanů s ohledem na podávání léčiva sunitinibu za použití imunohistochemických metod. Cílem bylo tedy ověřit jeho případný toxický efekt na endotel v aortě.

K tomu byly využity kmeny potkanů s rozdílnými hodnotami krevního tlaku. SHR společně s WKY potkany jsou nejpoužívanější modely kardiovaskulárních nemocí s více než 4000 referencemi v Medline. SHR nejčastěji slouží jako modely hypertenze, např. pro stanovení změn v signálních mechanismech indukovaných hypertenzí a také pro

testování nových antihypertenzních léčiv a jejich vedlejších účinků. WKY potkani jsou často používány společně se SHR jako normotenzní kontrola [38]. SHR jsou potomci outbredního spontánně hypertenzního samce potkana z kolonie Wistar v Kyotu (Japonsko) a samice se zvýšeným krevním tlakem. Následným křížením bratr x sestra byl vyvinut inbrední kmen potkana se systolickým krevním tlakem vyšším než 150 mmHg, trvajícím déle než jeden měsíc [33, 38]. Samci SHR jsou běžně používány jako modely hypertenze u lidí.

Cévní adhezní molekuly (VCAM-1) a intercelulární adhezní molekula (ICAM-1) jsou příslušníci imunoglobulinové nadrodiny. Tyto endoteliální adhezní molekuly se silně podílejí na adhezi leukocytů k endotelu během zánětlivých procesů a jsou uvažovány jako markery endoteliální dysfunkce a začínajícího aterosklerotického procesu [39, 40]. Jsou významně exprimovány v endotelu aorty v místech náchylných k ateroskleróze [36]. Zvýšená exprese těchto molekul je také zaznamenána u hypertenze [41].

V této bakalářské práci jsme tedy na 120 řezech sledovali expresi ICAM-1 ve femorální arterii u zvířat s rozdílným krevním tlakem a po podávání Sunitinibu. Očekávali, jsme, že pokud Sunitinib bude poškozovat cévní stěnu, mohlo by se to zachytit zvýšenou expresí ICAM-1 coby markeru endoteliální dysfunkce [31, 40]. Výsledky imunohistochemické analýzy ovšem prokázaly velmi slabou expresi ICAM-1 v cévách. Pokud byla exprese nalezena, byla lokalizována na cévním endotelu, což je v souladu s literárními údaji [35, 36]. Exprese ovšem byla detekována pouze u 2 zvířat v každé skupině nicméně i zde byla exprese na endotelu velmi slabá. Tyto výsledky tedy ukazují na fakt, že endoteliální dysfunkce se nerozvíjí ani u jedné skupiny zvířat, což také ukazuje na to, že Sunitinib neindukuje imunohistochemicky detekovatelné změny na cévním endotelu. Naše výsledky samozřejmě nemohou vyloučit přítomnost funkční endoteliální dysfunkce, která ovšem v této bakalářské práci nebyla studována.

11 ZÁVĚR

Imunohistochemická analýza ukázala expresi ICAM-1 pouze u endotelových buněk aorty.

ICAM-1 exprese byla velmi nízká u všech skupin zvířat.

Léčba sunitinibem nemá vliv na expresi ICAM-1 u SHR a WKY potkanů.

Léčba sunitinibem nevyvolala imunohistochemicky zjistitelnou endoteliální dysfunkci zastoupenou změnami exprese ICAM-1 v pravé femorální tepně u hypertenzních a normotenzních potkanů.

12 SEZNAM ZKRATEK

ACTH	<i>adrenocorticotropic hormone</i> , adrenokortikotropní hormon
ADH	antidiuretický hormon
AM	adhezní molekuly
ANP	atriální natriuretický peptid
ATP	<i>adenosine triphosphate</i> , adenosintrifosfát
CAM	<i>cell adhesion molecules</i> , adhezní molekuly
CSF-1	<i>colony stimulating factor 1</i>
DAB	diaminobenzidin
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i> , endotelový relaxační faktor
GIST	<i>gastrointestinal stromal tumour</i> , gastrointestinální stromální tumor
HDL	<i>high density lipoproteins</i> , lipoproteiny vysoké hustoty
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-1	interleukin 1
INF- γ	interferon gama
KIT	receptor pro růstový faktor kmenových buněk
MAdCAM-1	<i>mucosal addressin-cell adhesion molecule 1</i>
NO	oxid dusnatý
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , fosfátový pufr
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i> , růstový faktor destiček
PDGFR	receptor pro PDGF (viz. PDGF)
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PGE ₂	prostaglandin E ₂
RAAS	systém renin-angiotenzin-aldosteron
RRC	<i>renal cell carcinoma</i> , renální karcinom
RTG	rentgenový snímek
RTKs	<i>receptor tyrosine kinases</i> , receptor tyrozinkináz
SHR	<i>spontaneously hypertensive rat</i> , spontánně hypertenzní potkani
TK	tlak krve
TNF- α	<i>tumour necrosis factor alfa</i> , tumor nekrotizující faktor alfa

TXA ₂	tromboxan A ₂
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule</i> , cévní adhezní molekula 1
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	receptor pro VEGF (viz. VEGF)
WHO	<i>World Health Organization</i> , Světová zdravotnická organizace
WKY	potkani Wistar Kyoto

13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. MARIEB, ELAINE N. and MALLATT, JON, *Anatomie lidského těla*, Brno 2005, ISBN 80-251-0066-9, str. 544-551
2. MARTÍNEK, JINDŘICH a ZDENĚK VACEK, *Histologický atlas*, Praha 2009, ISBN 80-247-2393-8, str. 11-12
3. KONRÁDOVÁ, UHLÍK, VAJNER, *Funkční histologie*, 2. vydání, 2000, Jinočany ISBN 80-86022-80-3, str. 115-123
4. PAULSEN, DOUGLAS F., *Histologie a buněčná biologie*, Praha 2004 ISBN 80-7319-024-9, z angl. originálu Douglas F. Paulsen: *Histology and Cell Biology: Examination and Board Review* (4. vydání) do češtiny přeložili: Konrádová, Uhlík, Vajner, str. 156-162)
5. TROJAN, STANISLAV a kol., *Lékařská fyziologie*, Praha 2003, 4. vydání, ISBN 80-247-0512-5, str. 196-213
6. ZIMA, TOMÁŠ, *Laboratorní diagnostika*, Praha 2007, 2. vyd., ISBN 978-80-7262-372-3, str. 558-559
7. HOŘEJŠÍ, VÁCLAV, BARTUŇKOVÁ, JIŘINA, *Základy imunologie*, Praha 2009, 4. vydání, ISBN: 978-80-7387-280-9, str. 81-124
8. KREJSEK, JAN, KOPECKÝ, OTAKAR, *Klinická imunologie*, Hradec Králové 2004, ISBN: 80-86225-50-X, str. 40-55
9. NEČAS, EMANUEL a spol., *Patologická fyziologie orgánových systémů*, část I, Praha 2009, 2. vyd., ISBN 978-80-246-1711-4, str. 126-135
10. POVÝŠIL, CTIBOR, ŠTEINER, IVO et al., *Speciální patologie*, Praha 2007, 2. vyd., ISBN 978-80-7262-494-2, str. 28-29
11. BRYCHTOVÁ, SVETLANA, HLOBIKOVÁ, ALICE, *Histopatologický atlas*, Praha 2008, ISBN 978-80-247-1650-3, str. 9
12. SILBERNAGL, STEFAN, DESPOPOULOS, AGAMEMNON, *Atlas fyziologie člověka*, Praha 2004, 6. vyd (3. české), ISBN 80-247-0630-X, str. 186-218
13. SILBERNAGL, STEFAN, LANG, FLORIAN, *Atlas patofyziologie člověka*, Praha 2001, ISBN 80-7169-986-3, str. 206-232
14. BERGER JOSEF, *Buněčná a molekulární biologie*, Havlíčkův Brod 1996, ISBN 80-85808-42-0, str. 121-128

15. SOVOVÁ E., HRČKOVÁ Y., MAREČKOVÁ J., KMONÍČKOVÁ A., *Hypertenze pro praxi - pro lékaře, studenty, sestry, pacienty*, Olomouc 2008, ISBN 978-80-244-1968-8, str. 11-52
16. ŠPINAR J. ET AL, *Hypertenze, diagnostika a léčba*, Praha 1999, ISBN 80-7169-736-2, str. 15-25
17. CHRISTIAN F. KRIEGLSTEIN and D. NEIL GRANGER, *Adhesion Molecules and Their Role in Vascular Disease*, AJH 2001; 14:44S-54S, 2001 by the American Journal of Hypertension, Ltd.
18. LISSITZKY, JEAN-CLAUDE, M. D., *Adhesion Molecules*
19. DHAUN NEERAJ, WEBB DAVID J., *Receptor Tyrosine Kinase Inhibition, Hypertension, and Proteinuria*, American Heart Association 2010, 56: p. 575-577
20. DOGGRELL SHEILA A., BROWN LINDSAY, *Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure*, Elsevier Science B. V., 1998, p. 89-105
21. GRÜNWALD, KALANOVIC, MERSEBURGER, *Management of sunitinib-related adverse events: an evidence-and expert-based konsensus approach*, World J Urol (2010), 28: p. 343-351
22. 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**, p. 1-8
23. DEEKS EMMA D. and KEATING GILLIAN M., *Sunitinib*, Drugs 2006, p. 2255-2266
24. ČWIERTKA, KAREL, *Sunitinib (Sutent®) v léčbě zhoubných nádorů*, II. Kongres praktického lékařství, Olomouc 2008
25. HUTSON THOMAS E. et al, *Targeted Therapies for Metastatic Renal Cell Carcinoma: An Overview of Toxicity and Dosing Strategies*, The Oncologist 2008, 13: 1084-1096
26. KIRKALI K., *New trends in systém in treatment of renal cancer*, Urol list 2010, p. 33-47
27. PETRUŽELKA LUBOŠ, *Sunitinib v léčbě karcinomu ledviny*, Remedia 2/2007, dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Aktuality/Sunitinib-v-lecbe-karcinomu-ledviny/6-E-hI.magarticle.aspx> (15. 6. 2011)

28. BRANČÍKOVÁ DAGMAR, ADÁMKOVÁ KRÁKOROVÁ DAGMAR, Sunitinib, Remedia 3/2008, dostupné z: <http://www.remedia.cz/Clanky/Lekove-profily/Sunitinib/6-I-jp.magarticle.aspx> (15. 6. 2011)
29. Wikipedia-otevřená encyklopedie (online), heslo: potkan, dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Potkan> (25. 7. 2011)
30. Laboratorní zvířata (online), dostupné z: <http://www.lfp.cuni.cz/patofyziologie/materialy/zvirata/zvirata.htm> (25. 7. 2011)
31. DEMERATH E., TOWNE B., BLANGERO J. and SIERVOGEL R. M. (2001) *The relationship of soluble ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin to cardiovascular disease risk factors in healthy men and women.* Ann Hum Biol **28**, p. 664-678
32. FAIVRE S., DEMETRI G., SARGENT W. and RAYMOND E. (2007) *Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development.* Nat Rev Drug Discov **6**, p. 734-745
33. 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**, p. 299-306
34. 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
35. 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**, p. 219-229
36. NAKASHIMA Y., RAINES E. W., PLUMP A. S., BRESLOW J. L. and ROSS R. (1998) *Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse.* Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**, p. 842-851
37. PAPAETIS G. S. and SYRIGOS K. N. (2009) *Sunitinib: a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor in the era of molecular cancer therapies.* BioDrugs **23**, p. 377-389

38. STOLL M. and JACOB H. J. (2001) *Genetic rat models of hypertension: relationship to human hypertension*. *Curr Hypertens Rep* **3**, p. 157-164
39. VLASSARA H., FUH H., DONNELLY T. and CYBULSKY M. (1995) *Advanced glycation endproducts promote adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1) expression and atheroma formation in normal rabbits*. *Mol Med* **1**, p. 447-456
40. WALPOLA P. L., GOTLIEB A. I., CYBULSKY M. I. and LANGILLE B. L. (1995) *Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, p. 2-10
41. WILCZYNSKI J. R., BANASIK M., GLOWACKA E., Tchorzewski H., Malinowski A., Szpakowski M., Wieczorek A., Nowak M., Szpakowski A., Zeman K., Wilczynski J., Biesiada L. and Jaczewski B. (2002) *Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on the surface of peripheral blood lymphocytes of pregnant women with pregnancy-induced hypertension*. *Ginekol Pol* **73**, p. 495-500