

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

Diplomová práce

Studium exprese buněčných adhezních molekul v cévách u králičího
modelu antracyklínové kardiotoxicity.

The study of cell adhesion molecule expression in blood vessels in rabbit
model of anthracycline cardiotoxicity.

Vedoucí diplomové práce:

PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Hradec Králové 2009

Bc. Monika Bajerová

„Prohlašuji, že jsem zadanou diplomovou prací zpracovala sama s přispěním vedoucího práce a používala jsem pouze literaturu a zdroje, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury a řádně citovány.“

„Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své diplomové práce PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD. za zájem, připomínky a čas, který věnoval mé práci. Dále chci poděkovat své rodině a všem svým blízkým za velkou podporu, kterou mi věnovali po dobu mého studia.“

Obsah:

ABSTRAKT	5
ABSTRACT	6
1. ÚVOD.....	7
2. HISTOLOGIE CÉV	8
2.1. KAPILÁRY	8
2.2. PREKAPILÁRY A POSTKAPILÁRY	10
2.3. ARTÉRIE A VÉNY	10
2.3.1 Artérie.....	11
2.3.2 Vény.....	12
3. FUNKCE CÉVNÍHO ENDOTELU	14
3.1. REGULACE CÉVNÍ PERMEABILITY	14
3.2. REGULACE CÉVNÍHO TONU.....	16
3.3. HEMOSTATICKÉ A FIBRINOLYTICKÉ FUNKCE ENDOTELU	18
4. IMUNOGLOBULINOVÁ SKUPINA ADHEZNÍCH MOLEKUL.....	20
4.1. STRUKTURA A FUNKCE VCAM-1 A ICAM-1	21
4.2. EXPRESE VCAM-1 A ICAM-1	21
4.3. PECAM-1.....	22
5. ANTRACYKLINOVÉ ANTINEOPLASTICKÉ LÁTKY	23
5.1. MECHANISMUS CYTOSTATICKÉHO ÚČINKU	23
5.2. ZPŮSOB PODÁNÍ A FARMAKOKINETIKA ANTRACYKLINŮ	24
5.3. INDIKACE ANTRACYKLINŮ	25
5.4. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY ANTRACYKLINŮ.....	26
5.5. ANTRACYKLINOVÁ KARDIOTOXICITA	26
6. CÍL PRÁCE.....	28
7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
7.1. ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA.....	29
8. IMUNOHISTOCHEMIE	30
9. VÝSLEDKY	31
10. DISKUSE.....	40
11. ZÁVĚR	42
12. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	43
13. SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ.....	44

Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo detekovat změny endoteliální exprese VCAM-1 a ICAM-1 ve stěně arteria femoralis sinistra králíků, kterým bylo podáváno antracyklínové cytostatikum daunorubicin. Sledovali jsme případné změny exprese obou adhezních molekul po podávání daunorubicinu.

Chronická antracyklinová kardiotoxicita byla navozena opakovaným podáním daunorubicinu (3 mg/kg=50 mg/m² i.v., 1x týdně) po dobu 10 týdnů. Pro sledování morfologických změn arteria femoralis byly vytvořeny 2 skupiny (n=11), které reprezentovaly zvířata exponovaná dávce daunorubicinu nebo fyziologickému roztoku. Zvířata byla ukončována za 24 hodin po dané dávce cytostatika. Výsledky byly porovnány s hodnotami naměřenými u kontrolních zvířat (n=8), kterým nebyla aplikována žádná látka.

Imunohistochemická analýza neprokázala endoteliální expresi VCAM-1 ani u kontrolní a ani u daunorubicinové skupiny. Imunohistochemická analýza rovněž neprokázala významnou expresi ICAM-1 ani u kontrolní ani u léčené skupiny. Nicméně se nedá předpokládat, že by tato exprese měla nějaký zásadní biologický význam.

Výsledky této diplomové práce neprokázaly rozvoj endoteliální dysfunkce v arteria femoralis po chronickém podávání daunorubicinu u králíka.

Abstract

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

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

Immunohistochemical analysis showed no expression of VCAM-1 in any control or experimental groups. Very weak expression of VCAM-1 was detected in control and experimental groups. However we can not propose, that this expression might not have any biological effect.

In conclusion the administration of daunorubicin did not affect either VCAM-1 or ICAM-1 expression in rabbit left femoral artery suggesting that endothelial dysfunction in this artery is not triggered by daunorubicin treatment *in vivo*.

1. Úvod

V dnešní době přibývá stále více onemocnění, jež jsou způsobena zhoubným bujením buněk organismu. K boji proti rakovině existuje spousta léčiv, která jsou schopna potlačit a také vyléčit nádorová onemocnění.

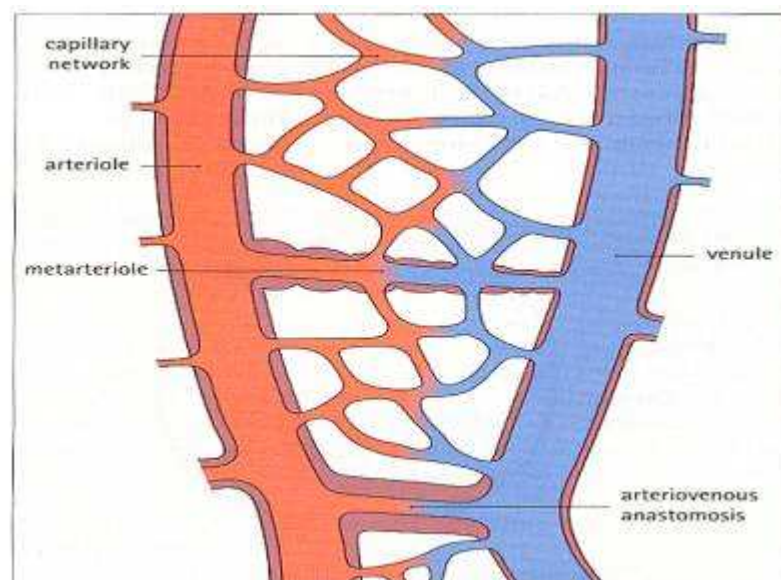
Antracyklínová antibiotika patří mezi jedny z nejdůležitějších protinádorových látek. Antracyklíny se používají jak u solidních nádorů, tak při léčbě leukémií. Často se používají v kombinaci s jinými cytostatiky. Chemoterapie obsahující tato cytostatika je provázena řadou nežádoucích účinků. Zvláště významným toxickým účinkem je kardiotoxicita.

V této práci jsme chtěli zjistit, zda dlouhodobé podávání daunorubicinu vede kromě signifikantních změn na srdci také k rozvoji endoteliální exprese v arteria femoralis, kterou je možné na morfologické úrovni sledovat díky expresi adhezních molekul VCAM-1 a ICAM-1.

2. Histologie cév

Krevní cévy rozdělujeme podle vztahů k oběhovému centru – srdci, a k periférii – tkáním, na cévy přívodné (přivádějící krev ke tkáním) – artérie. Cévy odvodné (odvádějící krev z tkání srdce) – vény, a mohutnou pletěň drobných cév – vlásečnice, které zprostředkovávají výměnu mezi vnitřním prostředím (krví) a tkáněmi. Vzhledem k odlišné funkci uvedených typů cév se liší i jejich mikroskopická stavba, podle níž stejně jako podle funkce, můžeme všechny krevní cévy rozdělit na: kapiláry, prekapiláry a postkapiláry, artérie, vény [1].

Obrázek č. 1 schéma cév podle Stevens and Lowe, *Color Histology*, s. 143



2.1. Kapiláry

Jsou to jednoduché trubice vystlané endotelem, které spojují arteriální a venózní oddíl oběhového systému. Jejich příčný průměr je přibližně 7 μm i méně, což odpovídá průměru velikosti červených krvinek [1].

Krevní kapiláry jsou obaleny sítí retikulárních vláken, která je odděluje od okolní tkáně. V blízkosti jejich stěny jsou uloženy fibroblasty, makrofágy, nediferencované mezenchymové buňky a tzv. *pericyty*. Pericyty krevních kapilár, impregnovatelné dusičnanem stříbrným, jsou buňky s dlouhými rozvětvenými výběžky,

kteře členitě obklopují stěnu kapilár. Je jim přisuzována kontraktilní schopnost a na jejím základě schopnost regulovat průsvit kapiláry.

Typické krevní kapiláry mají v obraze elektronového mikroskopu výraznou lamina basalis, na které spočívají endotelové buňky [1].

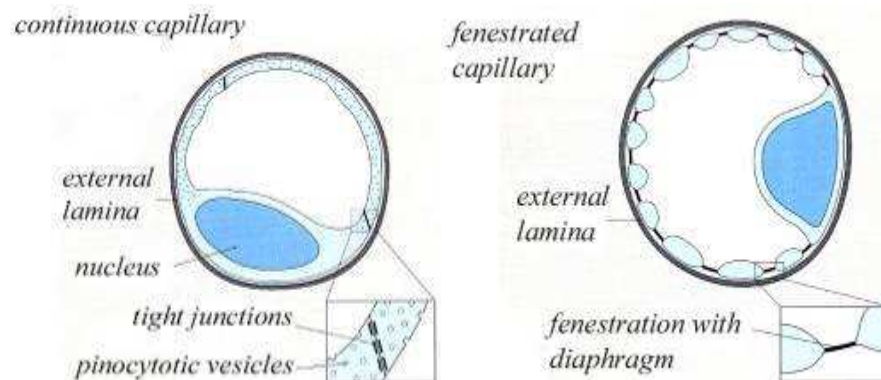
Kapiláry můžeme dělit do čtyř skupin v závislosti na struktuře endotelových buněk a na přítomnosti či chybění bazální laminy.

Souvislé čili somatické kapiláry jsou charakterizovány nepřítomností fenestrací v endotelu. S kapilárami tohoto typu se setkáváme ve všech typech svalů, ve vazivu, exokrinních žlázách a v nervové tkáni. Na povrchu obou stran svalových kapilár najdeme četné pinocytární váčky, které obstarávají obousměrný transport makromolekul endotelovou buňkou.

Fenestrované neboli viscerální kapiláry jsou opatřeny rozsáhlými fenestracemi ve stěnách endotelových buněk. Fenestrace jsou uzavřeny přepážkou (diafragmou). Bazální lamina je dobře vyvinuta. S těmito kapilárami se setkáváme v místech, kde dochází k rychlé výměně látek mezi krví a tkáněmi, jako je tomu např. v ledvinách, ve střevech a endokrinních žlázách.

Obrázek č.2 rozdíl mezi souvislou a fenestrovanou kapilárou podle

<http://www.mc.vanderbilt.edu/histology/labmanual2002/labsection2/Cardiovascular03.htm>



Třetím typem jsou opět kapiláry fenestrované, avšak v tomto případě bez diafragmat, která by uzavírala otvory v endotelové stěně. Endotelie jsou odděleny od přilehlých epitelových buněk (podocytů) velice silnou bazální laminou. Popsaný typ kapilár je charakteristický pro ledvinná tělíška.

Posledním typem kapilár jsou *sinusoidy*, které mají následující vlastnosti: křivolaký průběh a nápadně rozšířený průsvit (30-40 μm), zřetelně zpomalující průtok krve, obsahují hojnost fenestrací (bez diafragmat) v endotelové stěně. Sinusoidy často postrádají souvislou bazální laminu. Sinusoidní kapiláry se vyskytují především v játrech a v hematopoetických orgánech jako je kostní dřev a slezina [1].

2.2. Prekapiláry a postkapiláry

Prekapiláry jsou umístěny na arteriální straně kapilárního řečiště. Jejich lumen je v průměru široké 12-40 μm . Nejmenší z nich se skládají z endotelové trubice a nepočtených hladkých svalových buněk, roztroušených vně endotelu.

Postkapiláry jsou na venózní straně kapilárního řečiště. Jejich průsvit dosahuje přibližně 200 μm . Stěna nejmenších se skládá z endotelu a roztroušených elementů vazivové tkáně. Značná prostupnost, permeabilita endotelu postkapilár hraje důležitou úlohu při výměně látek mezi krví a tkáněmi [1].

2.3. Artérie a vény

Ve stěně artérií i vén můžeme rozlišit tři skladebně rozdílné vrstvy, které označujeme jako tunica interna neboli intima, tunica media a tunica externa, neboli adventitia.

Tunica interna, vystavená přímému mechanickému působení proudu krevního, je kryta naprosto hladkým endotelovým povlakem, který umožňuje plynulé a nerušené proudění krve, zabraňuje jejímu srážení a udržuje ji tekutou. Součástí intimy je vrstvička subendotelového vaziva s podélně orientovanými kolagenními a retikulárními vlákny, která brání jejímu stržení krevním proudem.

Tunica media, složená z cirkulárně uspořádaného hladkého svalstva s větší či menší příměsí elastických vláken, reguluje šířku lumina cévy, působí proti účinku krevního tlaku a zaručuje tak poměrně stálou a co nejúčelnější světlost cévy [2].

Tunica externa či *adventicia* slouží především ke spojení cévy s okolím a vyrovnává účinek zevních sil působících z okolí, chrání tak cévu hlavně před

protahováním (např. u cév končetin). Tomuto účelu nejlépe vyhovuje řídké kolagenní vazivo, prostoupené sítěmi vláken elastických [3].

2.3.1 Artérie

Přestože téměř každá artérie má v podrobnostech svou vlastní typickou stavbu, můžeme na podkladě rozdílů v kalibru a z toho rezultujících skladebných odchylek, spočívajících hlavně v tloušťce jednotlivých vrstev, podle rozdílů v zastoupení složky svalové a elastické, rozlišit celkem tři hlavní typy artérií: arterioly, artérie typu svalového a artérie typu elastického

Arterioly jsou velice tenké cévy, přecházející na jedné straně v silnější artérie (svalového typu), na druhé straně v prekapiláry. Šířka jejich lumina se pohybuje v rozmezí 30-150 μm . Intima arteriol je tvořena pouze endotelovou blankou, která přímo nasedá na tenkou, cirkulárně orientovanou elastickou blanku membrana elastica interna. Membrana elastica interna odděluje intimu od medie, je tvořená několika málo vrstvičkami cirkulárně upořádaných hladkých buněk svalových. Na medii se připojuje zevně adventicia, tvořená u nejtenčích arteriol pouze fibrocyty a vlákna retikulárními, u silnějších i vlákna kolagenními [1].

Většina pojmenovaných artérií v lidském těle jsou *artérie svalového typu*. Intima je shodná s arterioly až na to, že subendotelová vrstva je poněkud tlustší a může obsahovat i něco hladkých svalových buněk. Membrana elastica interna je zřetelně vyvinuta. Medie může obsahovat až 40 vrstev hladkých svalových elementů, jejichž množství se zmenšuje s velikostí průsvitu cévy. Tyto buňky jsou proloženy různým počtem elastických membrán (v závislosti na kalibru artérie), retikulárních vláken i proteoglykany. Membrana elastica externa je přítomna jen ve větších svalových artériích. Adventicie sestává z kolagenních a elastických vláken i malého počtu fibroblastů a tukových buněk. V adventicii také najdeme lymfatické cévy, vasa vasorum a nervy, které mohou pronikat až do zevních vrstev medie [4].

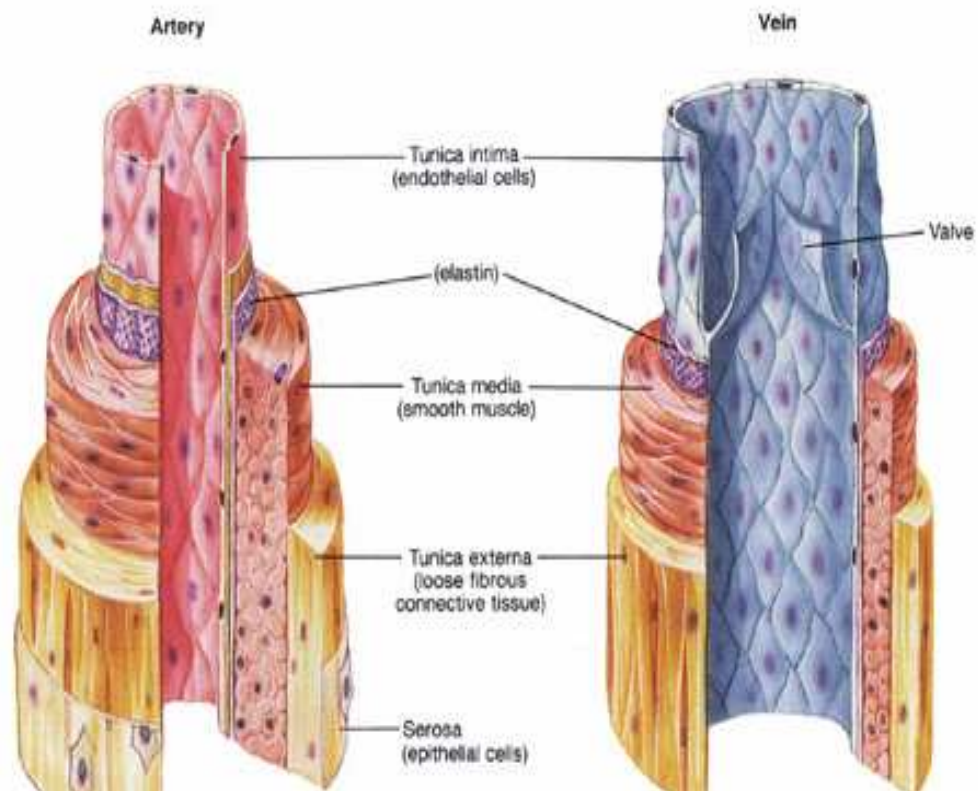
Ve stěně *artérií elastického typu* je přítomno velké množství elastinu, které podmiňuje žluté zabarvení cévy. K artériím tohoto typu patří aorta, truncus pulmonalis a další. Stěna je v poměru k objemnému luminu tenká. Endotelové buňky tunica intima mají převážně polygonální tvar. Subendotelová vrstva obsahuje tenké kolagenní fibrily, fibroblasty a četná převážně longitudinálně probíhající elastická vlákna, která ve vnější

vrstvě přecházejí do elastických membrán tunica media. U dospělého člověka dosahuje intima aorty tloušťky až 100 μm .

Tunica media je nejtlustší vrstvou stěny. Obsahuje 40 až 60 elastických dírkovaných blanek asi 2,5 μm tlustých, které mezi sebou anastomózuji šikmými spojkami. V prostorách mezi koncentricky uspořádanými blankami jsou fibroblasty, základní hmota amorfní, kolagenní fibrily a hladké svalové buňky. Hladké svalové buňky jsou oploštělé rozvětvené elementy upínající se do elastických membrán. Jsou uspořádány cirkulárně a jako celek tvoří hladké svalstvo oploštělou spirálu.

Tunica adventicia je poměrně tenká vazivově elastická vrstva s převažujícím longitudinálním uspořádáním vláknitých struktur. Obsahuje vasa vasorum a nervová vlákna. Adventicie brání nadměrnému roztažení tunica media a intima při srdeční systole [1].

Obrázek č.3 stavba artérií a vén podle Fox, Start I, Human physiology 4th, Brown Publisher



2.3.2 Vény

Rozdělují se na venuly, vény malého kalibru a středního kalibru a velké vény. Vény podléhají daleko větším individuálním a regionálním rozdílům než artérie.

Venózní systém má podstatně větší kapacitu než systém arteriální. Objem vén je asi třikrát větší než artérií. Vény zpravidla sledují průběh artérií a mají větší kalibr a tenčí stěnu než odpovídající artérie.

Venuly mají průsvit mezi 0,2 – 1 mm. Tunica intima se skládá z endotelu a tenké vazivové vrstvy subendotelové. Tunica media je tenká, složená z jedné až tří vrstev hladkých svalových buněk, elastických vláken je málo nebo chybějí vůbec. Tunica adventicia je poměrně tlustá. Skládá se převážně z longitudinálních kolagenních vláken.

Vény malého a středního kalibru mají průsvit od 1 – 9 mm. Do této skupiny patří všechny vény kromě hlavních venózních kmenů a jejich přítoků. Tunica intima je tenká, endotelové buňky mají polygonální tvar. Subendotelová vrstvička je velmi jemná. Množství elastických vláken na rozhraní intimy a medie silně kolísá. Mohou někdy tvořit hustou síť jemných elastických vláken. Tunica media je ve srovnání s artériemi téhož kalibru tenčí. Svalové buňky hladké jsou uspořádány do plochých cirkulárních svazečků, oddělených kolagenními vlákny a sítěmi vláken elastických. Tunica media je nejlépe vyvinuta ve vénách končetin, zvláště distálních. Tunica adventicia je výrazná fibroelastická vrstva, ve které se směrem k tunica media často objevují skupiny longitudinálně uspořádaných svalových buněk [1].

Velké vény mají dobře vyvinutou intimu. Tunica media je mnohem tenčí, s několika málo vrstvami hladkých svalových buněk a hojností vaziva. Daleko nejsilnější a nejlépe vyvinutá je v žilách adventicia. Toto adventiciální svalstvo slouží k zesílení stěny a zabraňuje roztažení cév. Cirkulární a longitudinální uspořádání hladkých svalů v těchto žilách umožňuje navzdory gravitaci peristalticky čerpat krev směrem k srdci.

Na rozdíl od artérií, jsou malé a středně velké vény uvnitř opatřeny chlopněmi. Tyto struktury sestávají ze dvou poloměsíčitých záhybů tunica intima, které ční do lumen. Obsahují elastické vazivo a jsou po obou stranách kryty endotelem. Chlopně se hojně vyskytují především v žilách končetin (rukou i nohou). Usměrnují krev směrem k srdci. Hnací síla srdce je posilována stahy kosterních svalů, které tyto žíly obklopují [4].

3. Funkce cévního endotelu

Endotel je jednovrstevný plošný epitel, který vystýlá lumen cév a odděluje tak krevní elementy od extravaskulární tkáně. Cévní endotel tvoří asi 1% z celkové hmotnosti člověka a jeho povrch je zhruba 5000 m² [5]. Lidské endoteliální buňky žijí přibližně 30 let [6].

Endotel se významně podílí na regulaci cévní permeability, cévního tonu, uplatňuje se v hemostáze a fibrinolýze, ovlivňuje strukturu cévní stěny a účastní se interakce s buňkami krve [7].

3.1. Regulace cévní permeability

Endotel vytváří makromolekulární bariéru mezi krevními cévami a okolními tkáněmi. Integritu endotelu zajišťuje existence mezibuněčných spojů, přítomnost elektrostatického náboje endoteliální membrány a složení bazální membrány [8]. Největší význam pro udržení správné permeability endotelu mají mezibuněčné spoje. Z hlediska funkce i struktury rozlišujeme několik typů mezibuněčných spojů.

Mezi ně patří tzv. zonulae occludentes neboli těsná spojení (tight junctions), která se nacházejí nejbližší apexu buňky. Představují nejtěsnější spojení mezi buňkami a strukturálně jsou tvořeny transmembránovým proteinem occludinem, který je spojen s intracelulárními proteiny jako ZO-1, ZO-2, cingulin a rab 13 [9]. Těsné spoje jsou velmi frekventované mezi mozkovými endoteliálními buňkami, kde jsou součástí hematoencefalické bariéry [7].

Některé práce ukazují, že množství těchto spojení v aortě stoupá v oblastech s vysokým „shear stresem“ a tak se těsné spoje zřejmě podílejí na ochraně endotelu před hemodynamickými silami a tedy před možností rozvoje aterosklerózy [10].

Naopak, aterosklerotická ložiska se vytvářejí zejména v oblastech s nízkým „shear stresem“ a tedy v oblastech, kde je množství těsných spojů menší [11].

Druhým typem mezibuněčných spojů jsou tzv. nexy (gap junctions), které vytvářejí hexamery s hydrofilním pólem umístěným ve středu. Základními strukturními

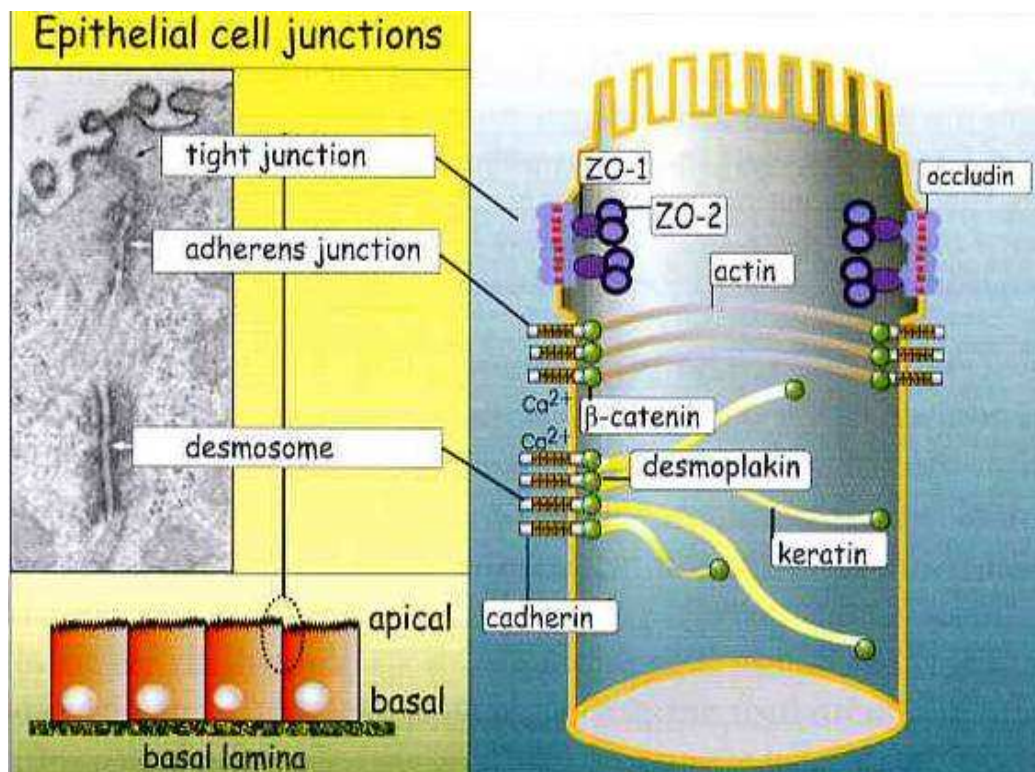
jednotkami jsou konexony. Tyto spoje se uplatňují při komunikaci endoteliálních buněk např. během angiogeneze [12].

Třetím typem mezibuněčných spojů jsou zonulae adhaerentes (adherens junctions). Tvoří je transmembránové proteiny kadheriny, které jsou spojeny s intracelulárními proteiny kateniny a s aktinovými mikrofilamenty. Hlavním kadherinem, který se nachází v těchto adherentních spojeních mezi endoteliálními buňkami je VE (vaskulární-endoteliální)-kadherin. Tento typ endoteliálních spojů je ovlivňován celou řadou zánětlivých substancí jako TNF- α , interferon- γ , trombinem, histaminem, ale také např. polymorfonukleárními leukocyty a hemodynamickými silami, které je často rozrušují a zvyšují cévní permeabilitu [13].

Tyto adherentní spoje ovlivňují složení a funkci jak těsných spojů, tak nexů, a proto se zdají být zásadní pro udržení cévní permeability.

Obrázek č.5 mezibuněčných spojů podle

<http://bioweb.wku.edu/courses/biol566/L21AdhesionSigTransdctn.html>



3.2. Regulace cévního tonu

Endotel působí na cévní tonus dvěma základními způsoby. Produkuje jak vazokonstrikční, tak vazodilatační substance. Za fyziologického stavu zajišťuje endotel převahu vazodilatačních látek nad vazokonstrikčními.

K nejvýznamnějším substancím tvořeným endotelem patří oxid dusný (NO), který je syntetizován z L-argininu za přítomnosti NO-syntázy (eNOS). NO má vazodilatační, antiagregační, antiadhezivní účinky a inhibuje migraci a proliferaci hladkých svalových buněk [8]. NO působí antiagregačně společně s prostacyklinem tím, že inhibuje aktivaci destiček. Kromě toho má NO zřejmě ještě fibrinolytické účinky.

Produkce NO je ovlivňována řadou faktorů. Mezi nejvýznamnější stimulatory produkce NO patří mechanické vlivy (shear stress) [14], hormony acetylcholin, vazopresin, ale také řada látek, které se uplatňují při hemokoagulaci jako serotonin, ADP a trombin [7]. Naopak některé zánětlivé cytokiny jako TNF, nebo také oxLDL snižují tvorbu NO endotelem. Řada klinických i experimentálních studií ukazuje na poruchy v metabolismu NO za různých patologických stavů, jako jsou ateroskleróza, hypercholesterolemie, diabetes a hypertenze [15]. Kromě snížené produkce NO, která se uplatňuje v patogenezi aterosklerózy, je nutné zdůraznit, že i vyšší produkce NO může vést k poškození endotelu a tedy k rozvoji aterosklerózy. Ukázalo se, že např. makrofágy a hladkosvalové buňky produkují isoformu NO-syntázy, tzv. induktivní NO-syntázu (iNOS), která způsobuje nadprodukcí NO [16]. Zvýšená hladina NO pak vede ke zvýšenému oxidačnímu stresu a následnému poškození endotelu.

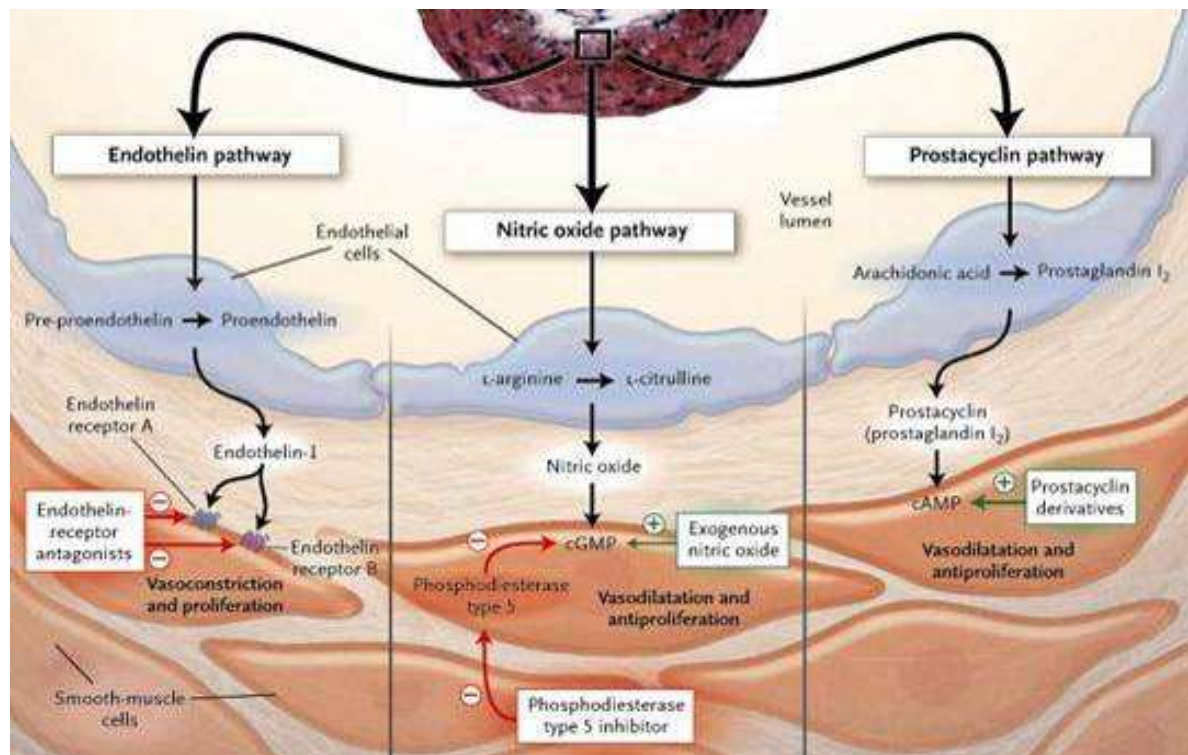
Lze tedy říci, že jak snížená, tak zvýšená syntéza NO vede ke vzniku endoteliální dysfunkce a následnému riziku rozvoje aterosklerózy.

Další významnou vazodilatační a antiagregační substancí, která je produkována endotelem, je prostacyklin PGI_2 . Ukazuje se, že antiagregační účinky PGI_2 jsou hlavním biologickým účinkem tohoto eikosanoidu, přičemž vazodilatační účinky jsou nižší než u NO. Z hlediska vztahu k ateroskleróze se ukázalo, že snížená hladina PGI_2 je rizikovým faktorem při vzniku ischemické choroby srdeční [17].

Poslední zmiňovanou vazodilatační látkou je endoteliální hyperpolarizující faktor (EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor). Je to zřejmě metabolit kyseliny arachidonové, který se uplatňuje hlavně lokálně v regulaci periferní cévní rezistence [18].

Mezi nejvýznamnější vazokonstrikční substanci produkovanou endotelem patří endothelin (ET)-1 [19]. Za fyziologických podmínek se ET-1 podílí zejména na udržování klidového cévního tonu a to jak vlastním vazokonstrikčním účinkem, tak stimulací tvorby NO a PGI₂. Je také chemoatraktantem, aktivátorem makrofágů, stimulatorem proliferace hladkých svalových buněk a kolagenu. Dále spolupracuje na zánětlivé reakci tím, že zvyšuje expresi některých adhezních molekul. Zvýšené plazmatické hladiny ET-1 byly pozorovány jak u pacientů s hypercholesterolemií, tak u pacientů s koronárním syndromem. Zvýšená exprese ET-1 byla také zjištěna v aterosklerotických lézích u lidí i experimentálních zvířat, a proto by mohl sloužit jako marker endoteliální dysfunkce, ale svými účinky se podílí i na progresi aterosklerózy [5,19,20].

Obrázek č. 6 schéma působení ET-1, NO, PGI₂ podle Humbert, M, Sitbon, O, Simonneau, G. *Treatment of pulmonary arterial hypertension. N Eng J Med 2004; 351:142*



Vazokonstrikční účinek endothelinu je asi 100x silnější než účinek další vazokonstrikční substance produkované endoteliálními buňkami, angiotensinem II. Angiotenzin II vzniká z angiotenzinu I účinkem angiotenzin konvertujícího enzymu, který je produkován endotelem. Angiotenzin se podílí na vzniku endoteliální dysfunkce

a aterosklerózy svým vazokonstrikčním účinkem, zvyšuje expresi E-selektinu, VCAM-1 a ICAM-1, podílí se na chemotaxi a aktivaci makrofágů a T lymfocytů, je důležitý při oxidaci LDL v subendoteliálním prostoru a stimuluje proliferaci a hypertrofii hladkých svalových buněk [6].

3.3. Hemostatické a fibrinolytické funkce endotelu

Za normálních podmínek endotel vytváří nontrombogenní bariéru, která brání interakci součástí krve se subendoteliálními strukturami.

Nejvýznamnějším anti-trombogenním modulátorem, který je produkován endotelem, je trombomodulin. Trombomodulin se váže na trombin, který má v procesu hemostázy zásadní roli. Po této vazbě ztrácí trombin pro-koagulační aktivitu a naopak se stává aktivátorem proteinu C, který se pak podílí na inhibici koagulace a na aktivaci fibrinolýzy. Některé zánětlivé cytokiny jako TNF nebo IL-1 snižují tvorbu trombomodulinu a tím zvyšují riziko vzniku trombů [21].

Dalším produktem endotelu, který ovlivňuje proces koagulace je membránový glykoprotein nazvaný tkáňový faktor. Tkáňový faktor není detekovatelný na normálním endotelu, ale jeho exprese je výrazně zvýšena v aterosklerotických lézích a to zejména v oblasti lipidového jádra a na povrchu plátu, tak může být zodpovědný za trombogenicitu aterosklerotických plátů [22].

V procesu hemostázy jsou samozřejmě klíčové i trombocyty. Hypercholesterolemie může aktivovat trombocyty, ty pak uvolňují řadu substancí, které buď endotel poškozují přímo, jako např. serotonin, nebo stimuluje proliferaci hladkosvalových buněk a aktivují makrofágy, na čemž se podílí zejména destičkový růstový faktor (PDGF) [23].

V regulaci činnosti destiček se uplatňují jak aktivátory destiček, mezi které patří PAF (platelet-activating factor) produkováný endotelem, neutrofilny, monocyty, makrofágy nebo inhibitory, ke kterým patří již dříve zmiňovaní NO a PGI₂ [19].

Endotel ovlivňuje fibrinolýzu především tvorbou tkáňového aktivátoru plazminogenu (tPA) a inhibitorů plazminogenových aktivátorů (PAI-1,2), které jsou za normálních stavů v rovnováze. Zánětlivé cytokiny TNF a IL-1 snižují syntézu

plazminogenového aktivátoru (tPA) a zvyšují syntézu a uvolňování PAI-1 čímž se podílí na inhibici fibrinolýzy [24].

Pro správný průběh hemostázy jsou důležité i další látky produkované endotelem. Patří mezi ně von Willebrandův faktor (vWf), který zprostředkovává adhezi trombocytů k extracelulární matrix v subendoteliálních prostorech[22].

4. Imunoglobulinová skupina adhezních molekul

Ig skupina adhezních molekul je velká rodina povrchových buněčných molekul, která představuje 50% všech povrchových molekul leukocytů. Jsou glykoproteinového charakteru, tvořené opakujícími se Ig doménami z beta řetězců [2].

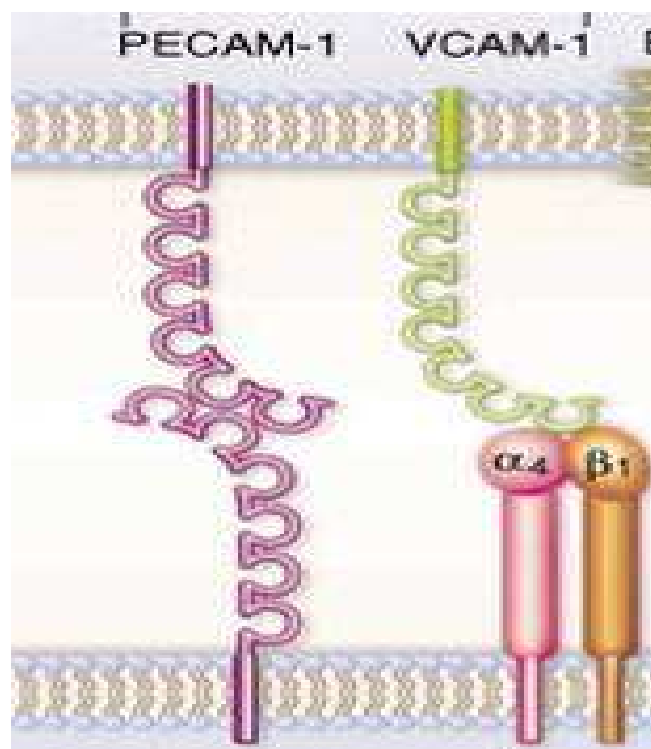
Zprostředkovávají jak homofilní (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na stejnou molekulu ve druhé), tak heterofilní interakce (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na neidentickou molekulu ve druhé buňce [25].

Patří sem celá řada adhezních molekul jako antigenně specifické receptory T (TCR) a B lymfocytů (BCR), koreceptory T lymfocytů CD4 a CD8, které jsou důležité pro jejich správnou funkci při imunitních reakcích.

Někteří členové této rodiny adhezních molekul jsou významní ve vztahu k ateroskleróze. Nejvýznamnějšími zástupci jsou intercellular cell adhesion molecule-1 a -2 (ICAM-1 a ICAM-2), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) a mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) [26].

Obrázek č.7 struktura Ig podle

<http://www.cbr.med.harvard.edu/labs/wagner/media/image1.html>



4.1. Struktura a funkce VCAM-1 a ICAM-1

VCAM-1 a ICAM-1 mají podobnou strukturu a funkci. Z hlediska struktury jsou obě adhezivní molekuly transmembránové glykoproteiny obsahující N-konec, sérii Ig domén, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec. VCAM-1 má 7 extracelulárních domén, ICAM-1 jich má 5. Pro spojení s ligandy integrinů mají dvě důležité domény. U VCAM-1 je to doména 1 a 4 a u ICAM-1 je to doména 1 a 3.

VCAM-1 interaguje s integriny $\alpha_4\beta_1$ a někdy také $\alpha_4\beta_7$. VCAM-1 účinky, které se projevují zanedbatelně na nestimulovaných endoteliálních buňkách, mohou být výrazně regulované po cytokinové aktivaci. Tato CAM podporuje adhezi lymfocytů a monocytů k cévnímu endotelu v místě zánětu [27].

ICAM-1 Ig doména 1 se váže s $\alpha_L\beta_2$ integrinem (LFA-1) a Ig doména 3 se váže s $\alpha_M\beta_2$ integrinem (Mac-1). ICAM-1 může interagovat s řadou dalších molekul, jako jsou C3b, fibrinogen a bakteriální lipopolysacharid [28].

Orgány, ve kterých se nachází vysoká exprese ICAM-1 (plíce) vykazují menší přírůstek ICAM-1 exprese po stimulaci cytokiny než ty, které jich obsahují méně (např. srdce). Rozpustná isoforma ICAM-1 může být detekována v normálním séru ve významně zvýšeném počtu při některých chorobných stavech. ICAM-2 je zkrácená forma ICAM-1, která je klasicky exprimována na endoteliálních buňkách, ale na rozdíl od ICAM-1 nedochází ke zvýšení její exprese aktivací endotelu [29].

VCAM-1 i ICAM-1 mohou stabilizovat vazbu leukocytů k endotelu a podílejí se na jejich diapedezi. VCAM-1 zřejmě navíc selektivně vycytává mononukleární leukocyty, protože ty na rozdíl od neutrofilů exprimují α_4 integriny [30].

4.2. Exprese VCAM-1 a ICAM-1

VCAM-1 i ICAM-1 jsou exprimovány endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkými svalovými buňkami [31]. Při studiích na králících a myších bylo zjištěno, že VCAM-1 je exprimován na endoteliálních buňkách ještě před akumulací makrofágů a T lymfocytů v oblastech, které jsou předurčeny ke vzniku lézí. Přičemž lokalizace těchto míst je často ovlivněna hemodynamickými vlastnostmi, především tzv. shear stresem. ICAM-1 je exprimován ve stejných oblastech jako VCAM-1, ale jeho exprese je pozorována i v oblastech s nízkou pravděpodobností výskytu aterosklerotických lézí

[32]. U malých aterosklerotických lézí je VCAM-1 i ICAM-1 exprimován především na endoteliálních buňkách, přitom je VCAM-1 exprimován i hladkosvalovými buňkami, které přiléhají k aterosklerotické lézi. U pokročilejších aterosklerotických lézí je VCAM-1 i ICAM-1 exprimován většinou buněk v intimě cév. Přesto se ukazuje, že VCAM-1 je exprimován především v oblastech výskytu lézí, zatímco ICAM-1 je exprimován endoteliálními buňkami i mimo aterosklerotickou lézi.

Expresí těchto adhezních molekul je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují i v patogenezi aterosklerózy. Hypercholesterolemie a oxidované LDL a diabetes zvyšují expresi jak ICAM-1, tak VCAM-1 [33].

Také kouření, hyperhomocysteinemie, hemodynamický stres (nízký shear stress) zvyšují expresi VCAM-1 a ICAM-1 [29].

ICAM-1 exprese je indukována cytokiny, jako jsou tumor necrosis factor-alfa (TNF- α), interferon-gama a interleukin-1 β (IL-1) nebo přilnutím k extracelulární matrix. VCAM-1 je podobně regulován IL-1 a TNF- α .

4.3. PECAM-1

Je dalším zástupcem adhezních molekul imunoglobulinové rodiny. Je to glykoprotein, který má 6 extracelulárních Ig domén, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec [34].

PECAM-1 je exprimován především na endoteliálních buňkách v místě intercelulárních spojů, na trombocytech a většině leukocytů. Dále se podílí na homofilních i heterofilních buněčných interakcích, přičemž hlavním heterofilním ligandem je $\alpha_v\beta_3$ integrin [35].

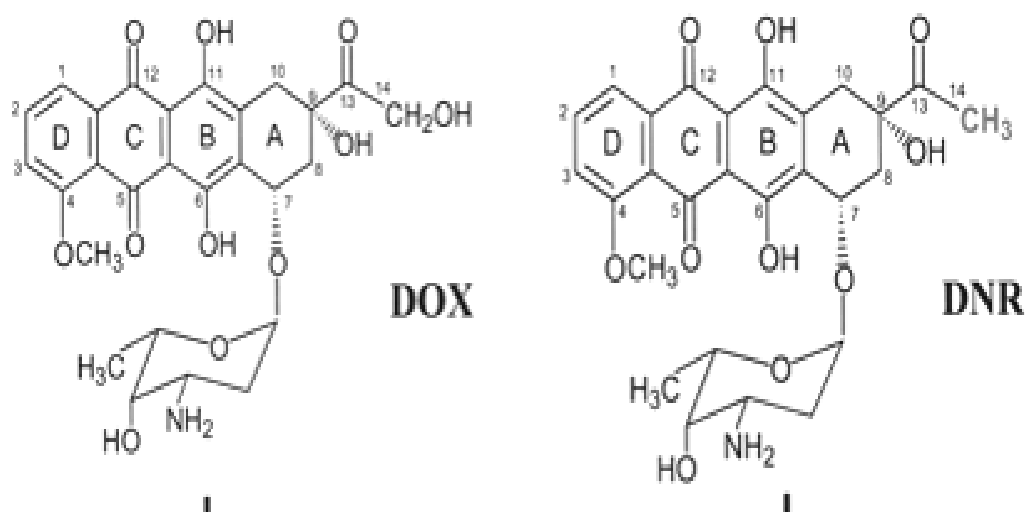
PECAM-1 hraje důležitou roli ve vaskulogenezi, angiogenezi a významně se podílí na transmigraci leukocytů do subendoteliálních prostorů [36].

5. Antracyklinové antineoplastické látky

Antracyklinová antibiotika patří mezi jednu z nejčastěji užívaných cytostatik. Již na začátku 60-tých let byl z hub *Streptomyces peucetilus* a *Streptomyces ceruleorubidus* izolován **daunorubicin** (též zvaný daunomycin, rubidomycin) a vzápětí i dosud nejvýznamnější antracyklinový derivát – **doxorubicin** (adriamycin). Jedná se o látky, které se skládají z tetracyklického aglykonu a glykosidicky vázaného aminocukru daunosaminu. Oba deriváty si jsou chemicky velmi podobné (liší se pouze jednou hydroxylovou skupinou na C14, Obr.8), nicméně je mezi nimi značný rozdíl v indikační šíři. Chinonová část aglykonu (cyklus B) má zásadní význam pro tvorbu volných kyslíkových radikálů redoxní cyklizací. [37].

Obrázek č. 8 Chemická struktura doxorubicinu a daunorubicinu podle

www.lfhk.cuni.cz/farmakol/predn/cz/2006/2006_2007-seminar-Chladek-protinadorova-chemoterapie.ppt



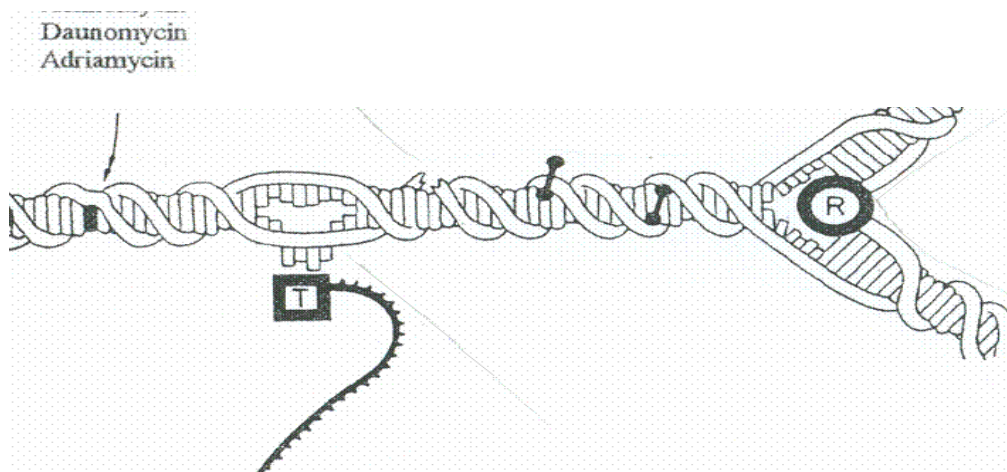
5.1. Mechanismus cytostatického účinku

Cytotoxický účinek antracyklinů je dán nejen jejich interkalací, ale i inhibicí topoizomerázy a tvorbou kyslíkových radikálů, které způsobují zlomy v DNA. Vazba antracyklinů na DNA je kritickým dějem pro protinádorové účinky těchto látek. Inhibice topoizomerázy je zodpovědná za rozštěpení obou řetězců, zatímco aktivní kyslíkové radikály štěpí převážně jeden řetěz dvoušroubovice DNA. Antracykliny obsahují ve své molekule hydrochinon, který je chelátorem železa. Komplex látka-

železo-DNA katalyzuje přenos elektronu z glutathionu na kyslík, což vede k vytvoření aktivních kyslíkových radikálů, které mají na buňkách velmi destruktivní účinky. Intramolekulární reakce spojené s přenosem elektronu vedou i ke vzniku intermediárních produktů, které mají alkylační účinky. Antracykliny jsou pro tyto účinky cytostatické, ale i karcinogenní a mutagenní [38].

Obrázek č. 9 Schéma interkalace daunorubicinu a doxorubicinu podle

www.uochb.cas.cz/Zpravy/postgrad2005/7_stibor.pdf



Superoxid dismutáza a kataláza jsou enzymatickými obrannými mechanismy, které snižují toxicitu volných radikálů vzniklých v přítomnosti. Tyto projektivní účinky mohou být zesíleny podáním antioxidantních látek, jako tokoferol, ale hlavně cheláty, které vážou železo [38].

5.2. Způsob podání a farmakokinetika antracyklinů

Antracykliny se podávají intravenózně, přičemž jiné způsoby podání (např. intraperitoneální) jsou užívány pouze ve zvláštních případech (terapie nádorů peritonea) [39].

Výjimkou je novější derivát idarubicin, u něhož je možná také perorální aplikace. Po intravenózním podání se antracyklinová antibiotika rychle distribuují do celého těla, zvláště pak do ledvin, sleziny, jater, plic a srdce. Tato léčiva se podstatnou měrou váží na intracelulární komponenty (včetně DNA). Distribuční objem doxorubicinu je vyšší než 25 ml/kg. Antracykliny patrně nepronikají skrz

hematoencefalickou bariéru, ale prochází placentární bariérou do plodu a také do mateřského mléka.

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

Největší množství vlastního léčiva (40-50 %) je z organismu vylučováno játry, a to z poloviny v nezměněné podobě. Pouze menší část podané dávky léčiva je vyloučena z organismu ledvinami. Pokles plazmatických hladin nejužívanějšího doxorubicinu se odehrává ve 3 fázích s poločasy eliminace $t_{1/2\alpha} = 4,8$ min, $t_{1/2\beta} = 2,6$ h a $t_{1/2\gamma} = 48$ h. [40].

5.3. Indikace antracyklinů

Doxorubicin je jednou z nejdůležitějších látek protinádorové chemoterapie. Mezi indikace jeho užití patří karcinomy prsu, endometria, ovaria, varlete, štítné žlázy a plic, dále řada sarkomů, neuroblastom, Ewingův sarkom, osteosarkom a rhabdomyosarkom a z hematologických nádorů akutní leukémie, plazmocytom, Hodgkinova nemoc a difúzní ne Hodgkinové lymfomy. Je používán jako adjuvantní terapie u karcinomu prsu a osteogenního sarkomu.

Doxorubicin se obvykle podává v kombinaci s dalšími látkami (například s cyklofosfamidem, cisplatinou a deriváty močoviny), s nimiž působí synergicky. Podáváním v kombinaci je možno dosáhnout delších remisí, než podáváním doxorubicinu samotného. Kombinační terapie také podstatně sníží některé nežádoucí účinky, které by se jinak plně projevil při použití vyšších dávek doxorubicinu.

Daunorubicin je používán hlavně k léčbě akutní leukémie [37]. V této indikaci se zdá daunorubicin účinnější než doxorubicin. Spektrum použití daunorubicinu je však značně úzké a jeho účinnost na solidní nádory se zdá velmi omezená.

5.4. Nežádoucí účinky antracyklinů

Antracykliny stejně jako většina ostatních cytotoxických látek, způsobují útlum kostní dřeně, který je však poměrně krátký s rychlým zotavením. Od ostatních látek se antracykliny liší význačnou kumulativní kardiotoxicitou, jejíž následky mohou být ireversibilní. Mechanismus kardiotoxického účinků antracyklinů není ještě plně objasněn. Předpokládá se, že zahrnuje nadměrnou tvorbu volných radikálů v myokardu. Doxorubicin je obvykle podáván v poměrně vysokých dávkách intermitentně v 3-4 týdenních intervalech. Při podávání doxorubicinu v nižších dávkách nebo kontinuální infúzi je nebezpečí poškození myokardu nižší, protože jeho koncentrace v plazmě nemá vysoké vrcholy. Při kumulativních dávkách doxorubicinu nižších než 500mg/m^2 jsou kardiotoxické účinky vzácné. Dalším, téměř pravidelným nežádoucím účinkem doxorubicinu a daunorubicinu je těžká až totální alopecie, a to i při standardním dávkování [37].

5.5. Antracyklinová kardiotoxicita

Antracyklinovou kardiotoxicitu dělíme na akutní, subakutní, chronickou a pozdní. Akutní toxicita se projevuje během nebo několik hodin po podání cytostatika. Je charakterizována tachyarytmií, vzácně jsou popsány případy fatálně komorových arytmií a raritně i rozvoj akutního infarktu myokardu.

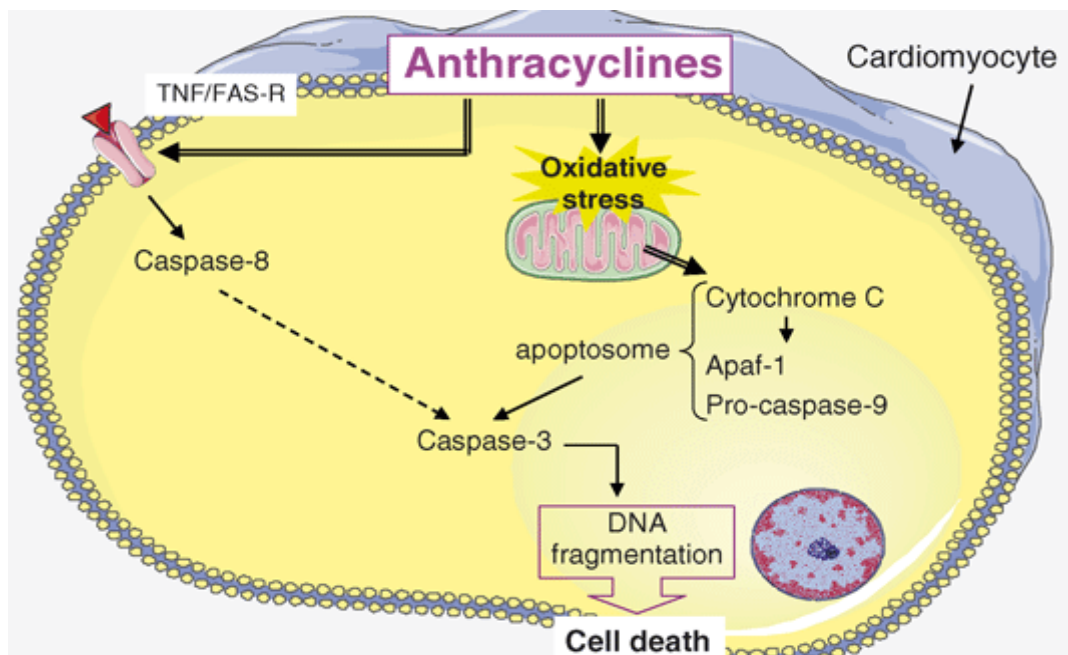
Subakutní toxicita je spojena se syndromem perikarditidy-myokarditidy, klinickým projevem jsou příznaky srdečního selhávání.

Chronická toxicita se projevuje v průběhu jednoho roku od ukončení léčby, je pro ni charakteristická systolická dysfunkce levé komory opět s příznaky srdečního selhání.

Pozdní toxicita vzniká více než rok po ukončení chemoterapie (většinou 4 až 20 let po skončení léčby). Její průběh dlouho symptomatický, posléze se vyvíjí především známky srdečního selhávání na podkladě dysfunkce levé komory (diastolické i systolické). Vzácněji se vyskytují komorové arytmie [41].

Obrázek č.11 působení antracyklinů na kardiomyocyt

<http://www.heartandmetabolism.org/issues/HM35/HM35refresherc.asp>



6. CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo detekovat změny endoteliální exprese VCAM-1 a ICAM-1 ve stěně arteria femoralis sinistra králíků, kterým bylo podáváno antracyklínové cytostatikum daunorubicin. Pro zobrazení exprese těchto adhezních molekul byly využity imunohistochemické metody.

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1. Zvířata a předepsaná dieta

Pokusná zvířata: králíci, Činčila velká, samci

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

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

Schéma pokusu:

Pokusná zvířata byla randomizována do 2 skupin:

kontrolní skupina (n=8, fyziologický roztok, 1 ml/kg, i.v.);

daunorubicinová skupina (n=11, daunorubicin, 3 mg/kg, i.v.);

Látky byly aplikovány jednou týdně, po dobu 10 týdnů.

U jednoho zvířete byl aplikován endotoxin, lipopolysacharid z *Escheria coli*, který by měl navodit systémový zánět a indukovat tak expresi adhezních molekul na endotelu všech cév. Pro nás bylo tohle zvíře použito jako pozitivní kontrola pro imunohistochemická barvení.

8. IMUNOHISTOCHEMIE

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

Byly použity následující primární protilátky:

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

9. VÝSLEDKY

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

My jsme se zaměřili pouze na hodnocení případných změn exprese adhezních molekul ve stěně cévy (arteria femoralis).

Imunohistochemické barvení v oblasti arteria femoralis

Nejprve byla analyzována exprese VCAM-1 a ICAM-1 v aortě u zvířat, kterým bylo podáváno LPS. Výsledky potvrdily indukci obou adhezních molekul na cévním endotelu aorty (obr. 12 a 13). Tímto byla prokázána funkčnost obou protilátek a zároveň správnost použitých imunohistochemických technik.

PECAM-1:

Imunohistochemická analýza prokázala silnou expresi PECAM-1 téměř po celém lumen cévy bez ohledu na skupinu králíků. Tyto výsledky potvrzují použití PECAM-1 jako markeru cévního endotelu (obr. 14 a 15).

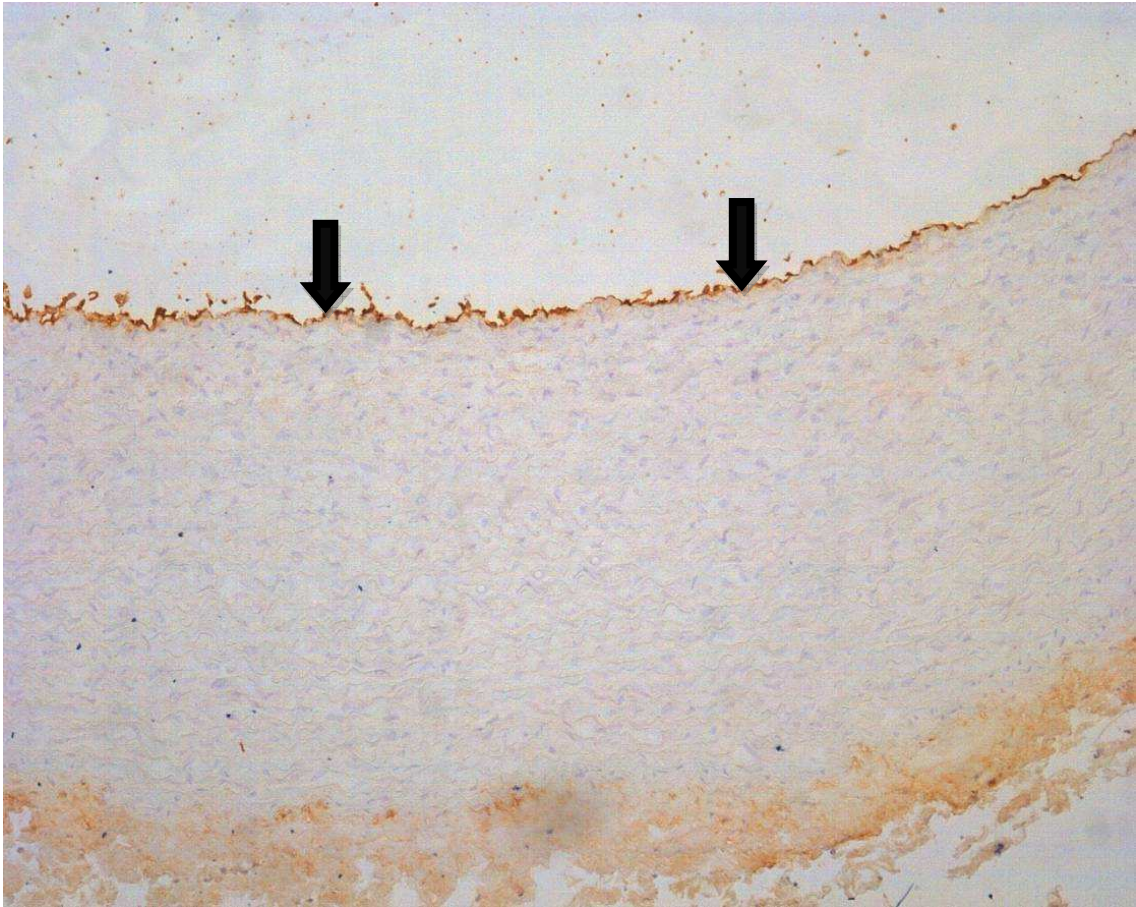
ICAM-1:

Imunohistochemická barvení neprokázala výraznou indukci exprese ICAM-1 ani u kontrolní ani u daunorubicinové skupiny (obr. 16 a 17). U některých zvířat z obou skupin byla pozorována velmi slabá exprese u několika endoteliálních buněk, nicméně se nedá předpokládat, že by tato exprese měla nějaký zásadní biologický význam.

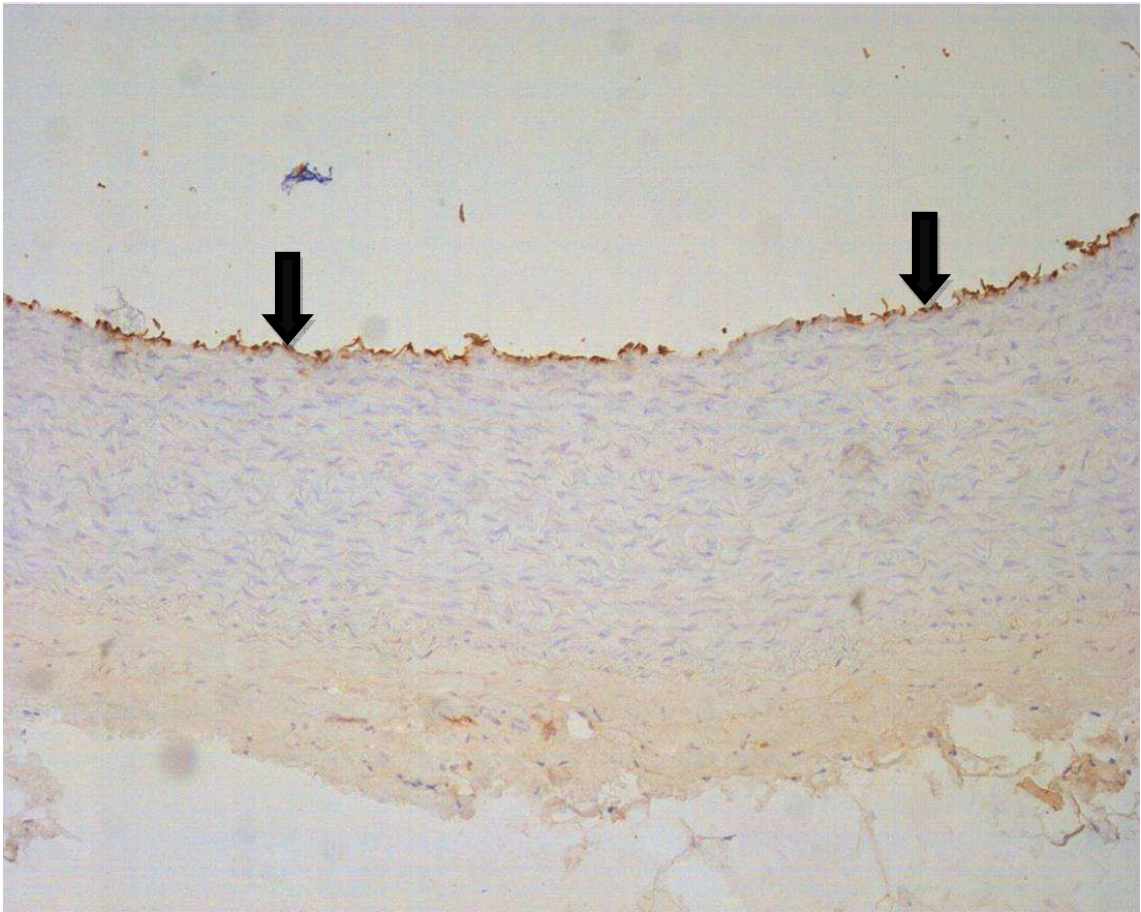
VCAM-1:

Imunohistochemická barvení neprokázala indukci exprese VCAM-1 ani u kontrolní ani u daunorubicinové skupiny (obr. 18 a 19).

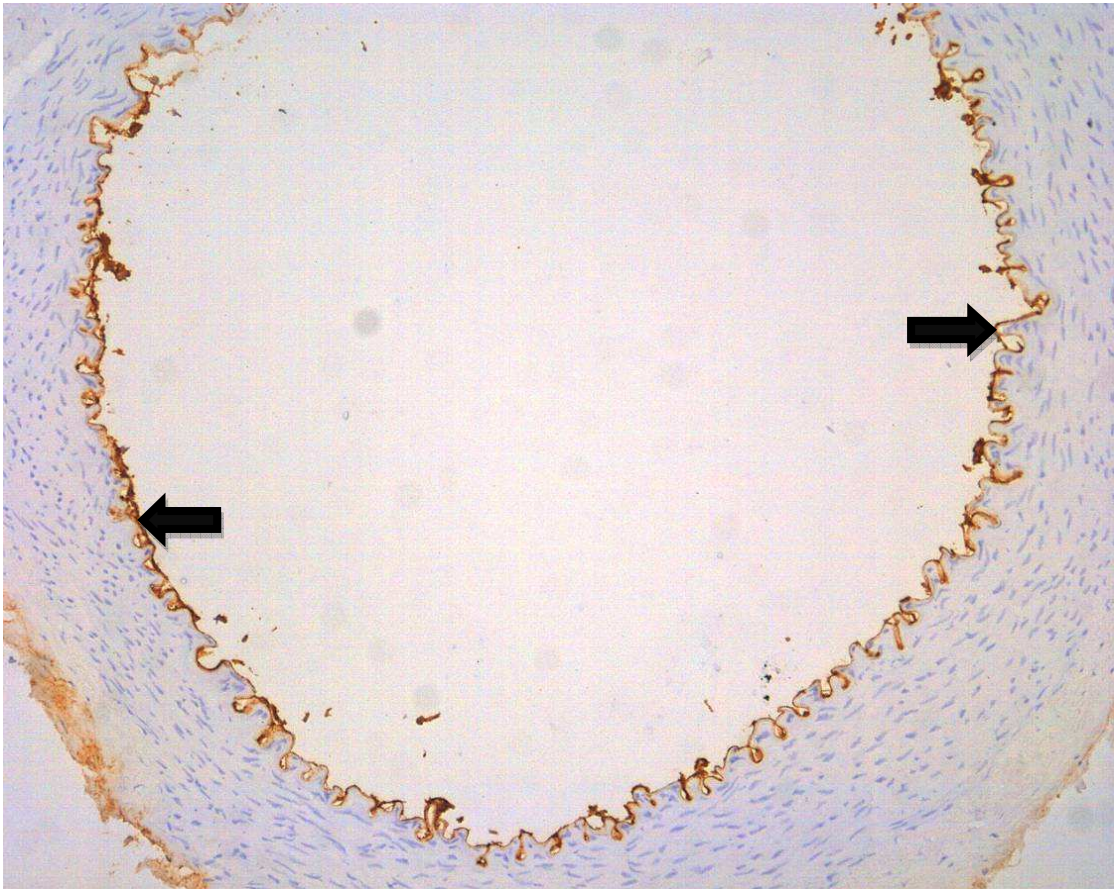
Obrázek 12. - Endoteliální exprese ICAM-1 v aortě u zvířete, kterému bylo podáno LPS. Silná exprese byla pozorována okolo celého lumen aorty (šipky). Zvětšení 100x.



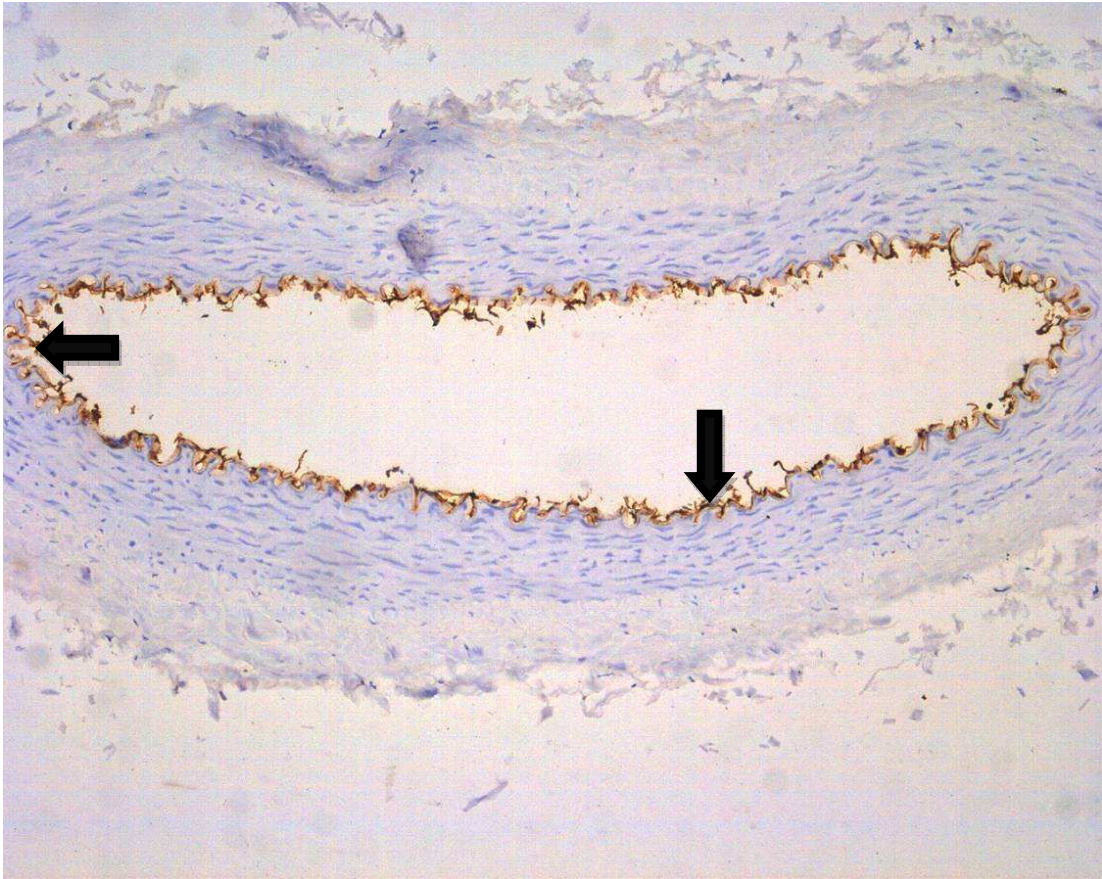
Obrázek 13. - Endoteliální exprese VCAM-1 v aortě u zvířete, kterému bylo podáno LPS. Silná exprese byla pozorována okolo celého lumen aorty (šipky). Zvětšení 100x.



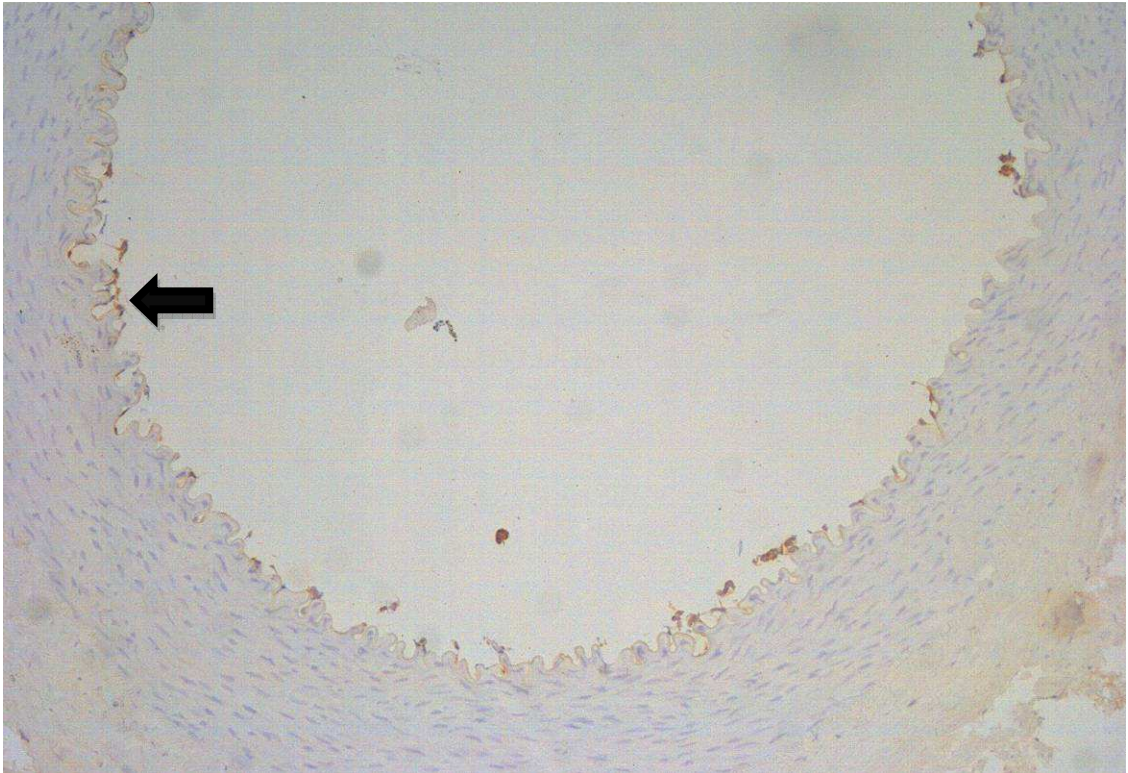
Obrázek 14. - Endoteliální exprese PECAM-1 v arteria femoralis u kontrolní skupiny zvířat. Exprese byla pozorována u všech zvířat po celém lumen cévy. Šipky ukazují na hnědou barvu, která je důkazem detekce PECAM-1 exprese. Zvětšení 100x.



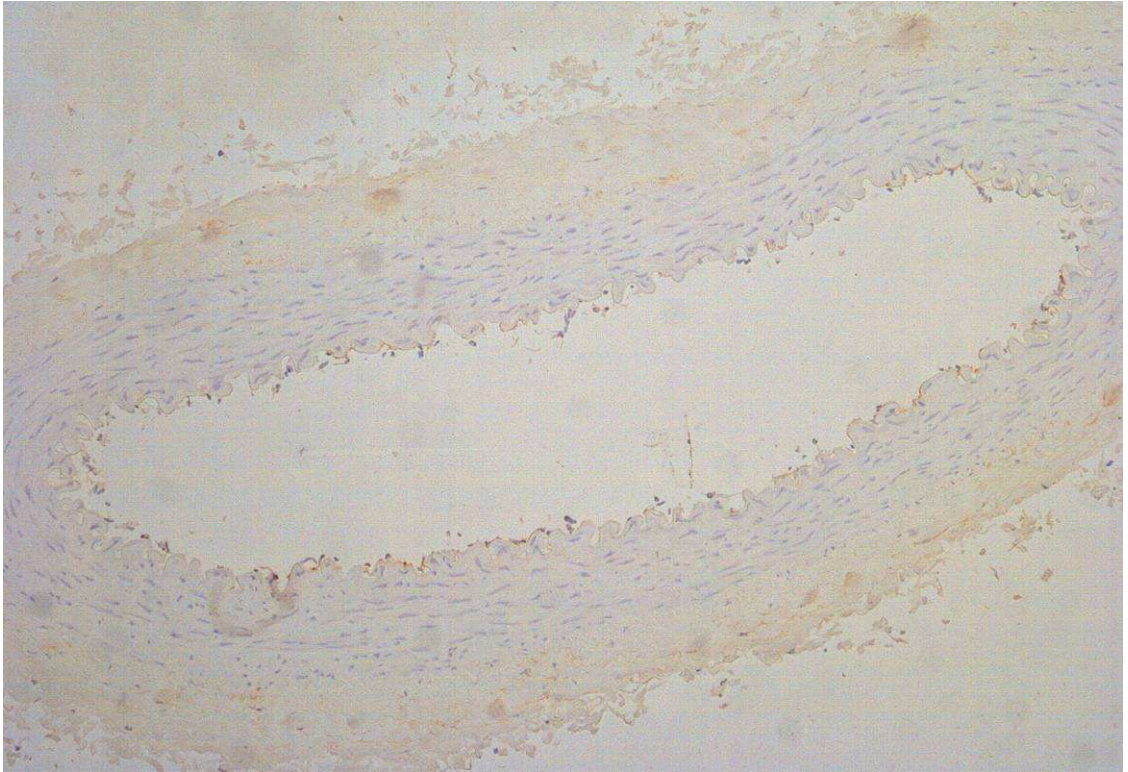
Obrázek 15. - Endoteliální exprese PECAM-1 v arteria femoralis u daunorubicinové skupiny zvířat. Exprese byla pozorována u všech zvířat po celém lumen cévy. Šipky ukazují na hnědou barvu, která je důkazem detekce PECAM-1 exprese. Zvětšení 100x.



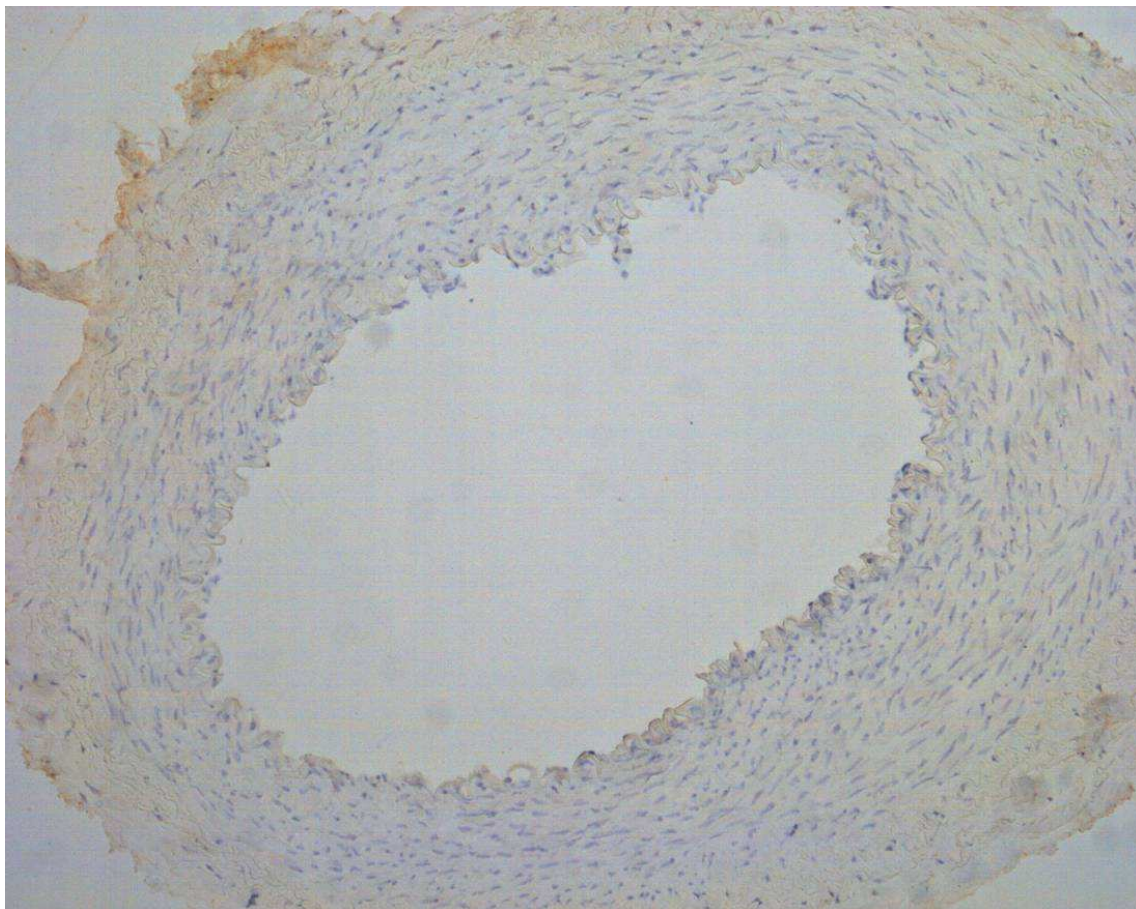
Obrázek 16. - Endoteliální exprese ICAM-1 v arteria femoralis u kontrolní skupiny zvířat. Výrazná exprese ICAM-1 nebyla pozorována u žádného kontrolního zvířete. Pouze u některých byla pozorována velmi slabá exprese u několika endoteliálních buněk (šipka). Zvětšení 100x.



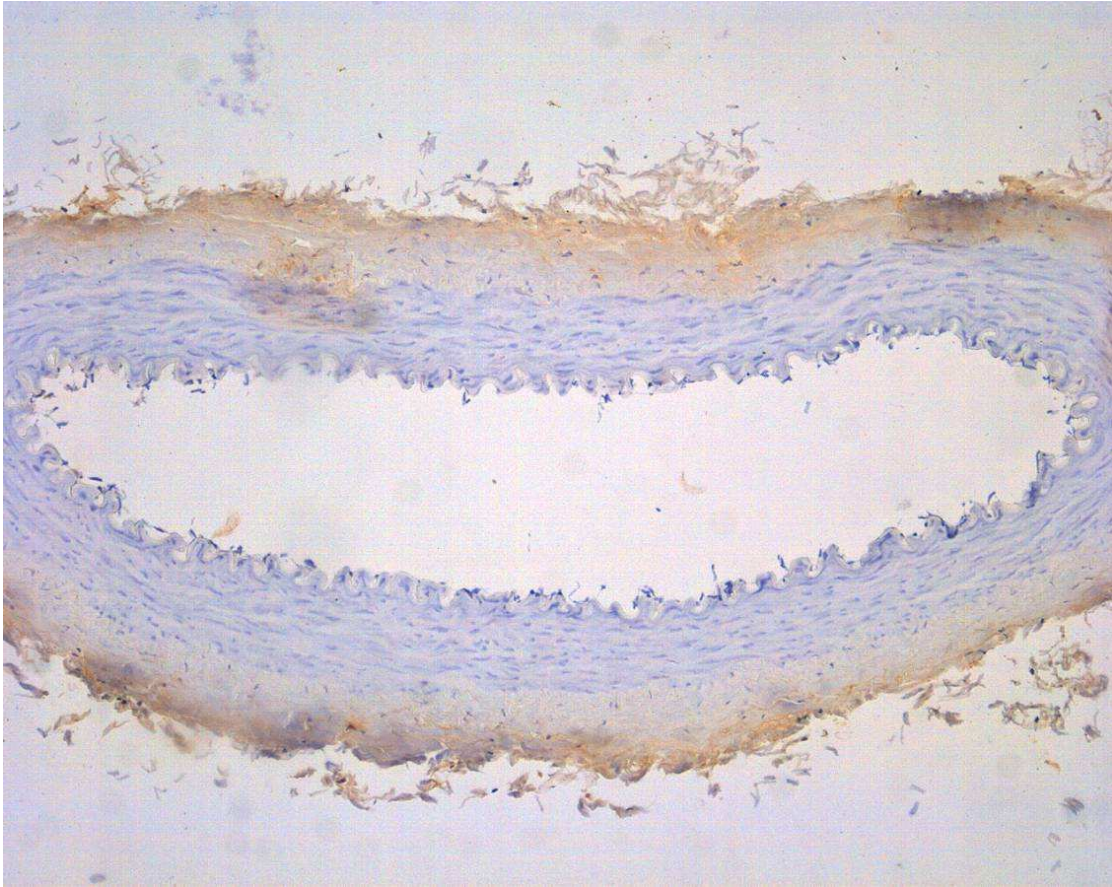
Obrázek 17. - Endoteliální exprese ICAM-1 v arteria femoralis u daunorubicinové skupiny zvířat. Výrazná exprese ICAM-1 nebyla pozorována u žádného zvířete. Zvětšení 100x.



Obrázek 18. - Endoteliální exprese VCAM-1 u kontrolní skupiny zvířat. Exprese VCAM-1 nebyla pozorována u žádného zvířete z kontrolní skupiny. Zvětšení 100x.



Obrázek 19. - Endoteliální exprese VCAM-1 u daunorubicinové skupiny zvířat. Exprese VCAM-1 nebyla pozorována u žádného zvířete z daunorubicinové skupiny. Zvětšení 100x.



10. DISKUSE

Onkologická léčba je často provázena řadou vedlejších nežádoucích účinků, které mohou zkomplikovat a někdy i zmařit její výsledný efekt. Závažnou komplikací je poškození srdce neboli kardiotoxicita. I když se nevyskytuje tak často jako např. hematologická toxicita, hepatotoxicita nebo nefrotoxicita, nelze ji vzhledem k možným fatálním komplikacím podceňovat. Nejčastějšími projevy kardiovaskulární toxicity jsou arytmie, změny krevního tlaku, srdeční selhání, ischemie myokardu a perikarditida. Většina těchto komplikací probíhá akutně, tj. objevují se v průběhu léčby nebo bezprostředně po jejím ukončení. Výjimečné postavení mezi cytostatiky zaujímají antracykliny se svojí chronickou a pozdní kardiotoxicitou, která se může projevit až s časovým odstupem po ukončení léčby [42].

Antracyklinová antibiotika jsou jedny z nejužívanějších cytostatik. Antracykliny, podobně jako všechna ostatní cytostatika, vykazují pouze relativní selektivitu svého cytostatického účinku. Následkem toho provází cytostatickou terapii řada nežádoucích účinků. Pro antracykliny je charakteristická významná myelosuprese, jež může výrazně ovlivňovat dávku podaného léčiva. U hlodavců a králíků používaných v preklinických experimentech byla zaznamenána poměrně výrazná nefrotoxicita antracyklinů [42].

První zmínky o kardiotoxickém působení antracyklinů se objevily již krátce po jejich zavedení do klinické praxe [43]. Kardiotoxické působení antracyklinových cytostatik se do značné míry vymyká nežádoucím účinkům běžně sledovaných u jiných cytostatik. Kardiotoxicita antracyklinů se ukázala být významným omezením jejich klinického užití, a proto je možnost redukce tohoto závažného nežádoucího účinku intenzivně studována. Jedním z mechanismů, který je intenzivně studován ve vztahu k rozvoji kardiotoxicity je tvorba volných kyslíkových radikálů. Není zcela jasné, jestli produkce volných kyslíkových radikálů (ROS) k protinádorovému působení. Z dostupných informací se zdá, že ROS se účastní na protinádorovém efektu antracyklinů spíše minoritně, na rozdíl od kardiotoxicity, kde patrně hrají velmi významnou úlohu [44].

Adhezní molekuly VCAM-1 i ICAM-1 hrají důležitou roli v rozvoji zánětlivé reakce a uplatňují se také v patogenezi různých patologických stavů. Jsou exprimovány endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkými svalovými buňkami [45].

Expresse těchto adhezních molekul je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují v patogenezi aterosklerózy, diabetu mellitu ale i dalších onemocnění. Bylo prokázáno, že hypercholesterolemie, oxidační stres, kouření [2,36,46,47]. Expresse obou těchto molekul je také indukována zánětlivými cytokiny jako TNF- α nebo IL-1 [48].

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

Studium imunohistochemického barvení adhezních molekul však neprokázala indukcii jejich exprese v arteria femoralis. Expresse VCAM-1 nebyla pozorována ani u kontrolní a ani u daunorubicinové skupiny. Naproti tomu pouze velmi slabá exprese ICAM-1 u několika endoteliálních buněk byla pozorována u kontrolní skupiny. Nedá se však předpokládat, že by tato exprese měla nějaký zásadní biologický význam. Podobná exprese ICAM-1 byla nalezena také po dlouhodobém podávání daunorubicinu. Tyto výsledky navazují na výsledky diplomové práce kolegyně Noskové [42], která rovněž neprokázala indukcii exprese ICAM-1 a VCAM-1 v aortě u zvířat, kterým byl podáván daunorubicin v intervalu několika týdnů.

Závěrem tedy můžeme konstatovat, že podávání daunorubicinu zřejmě nevede k indukcii exprese buněčných adhezních molekul ICAM-1 a VCAM-1 v cévách králíka. Výsledky tedy zatím naznačují, že dlouhodobé podávání daunorubicinu sice vede k rozvoji patologických změn v myokardu, nicméně nevede k rozvoji morfologicky detekovatelné endoteliální dysfunkce.

11. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zaměřila na studium možné indukce endoteliální dysfunkce po dlouhodobém podávání cytostatiku daunorubicinu u králičího modelu pro studium chronické kardiotoxicity v arteria femoralis.

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

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

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

Výsledky této diplomové práce tedy naznačují, že dlouhodobé podávání daunorubicinu sice vede k rozvoji patologických změn v myokardu, nicméně nevede k rozvoji morfologicky detekovatelné endoteliální dysfunkce.

12. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
BCR	antigenní receptor lymfocytů B
CAM	buněčná adhezní molekuly
CD	diferenční buněčné znaky CD klasifikace
EDHF	endoteliální hyperpolarizující faktor
E-kadherin	epiteliální kadherin
ET	endotelin
ICAM	intercellular adhesion molecule
IL-1	interleukin -1
MAdCAM	mucosal addressin cell adhesion molecule
NO	oxid dusnatý
oxLDL	oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě
PAI-1,2	inhibitor plazminogenových aktivátorů
PAF	aktivační faktor destiček
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule
PDGF	destičkový růstový faktor
PGI ₂	prostacyklin
TCR	antigenní receptor lymfocytů T
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VE-kadherin	vaskulární – endoteliální kadherin
vWF	von Willebrandův faktor
ZO	těsná spojení

13. SEZNAM POUŽITÝCH CITACÍ

1. Klika. Histologie. Praha; 1986
2. Krieglstein CF, Granger DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 2001;14:44S-54S
3. Dvorak M. Histologie pro posluchače lékařské fakulty. 2 ed. Brno; 1984
4. Junquera. Základy histologie. 3 ed; 2002
5. Vanhoutte PM. [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 1997;90 Spec No 6:9-19
6. Nishikawa SI, Hirashima M, Nishikawa S, Ogawa M. Cell biology of vascular endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 2001;947:35-40; discussion 41
7. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109:III27-32
8. Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 1999;94:295-314
9. Keaney JF, Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* 2000;21:99-166
10. Abdalla SA, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet* 2006;43:97-110
11. Najemnik C, Sinzinger H, Kritz H. Endothelial dysfunction, atherosclerosis and diabetes. *Acta Med Austriaca* 1999;26:148-153
12. Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 1999;252:13-19
13. Nachtigal P, Gojova A, Semecky V. The role of epithelial and vascular-endothelial cadherin in the differentiation and maintenance of tissue integrity. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2001;44:83-87
14. Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ, Hayoz D. Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension* 1998;32:351-355

15. Alfon J, Guasch JF, Berrozpe M, Badimon L. Nitric oxide synthase II (NOS II) gene expression correlates with atherosclerotic intimal thickening. Preventive effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis* 1999;145:325-331
16. Brennan PA, Palacios-Callender M, Zaki GA, Spedding AV, Langdon JD. Does type II nitric oxide synthase expression correlate with cellular proliferation in oral squamous cell carcinoma and dysplasia? *Head Neck* 2001;23:217-222
17. Cannon RO, 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. *Clin Chem* 1998;44:1809-1819
18. Stoll M, Meffert S, Stroth U, Unger T. Growth or antigrowth: angiotensin and the endothelium. *J Hypertens* 1995;13:1529-1534
19. Gryglewski RJ. Interactions between endothelial mediators. *Pharmacol Toxicol* 1995;77:1-9
20. Haller H, Schaberg T, Lindschau C, Lode H, Distler A. Endothelin increases $[Ca^{2+}]_i$, protein phosphorylation, and O_2^- production in human alveolar macrophages. *Am J Physiol* 1991;261:L478-484
21. Mysliwiec M, Borawski J, Naumnik B, Rydzewska-Rosolowska A. Endothelial dysfunction, atherosclerosis and thrombosis in uremia--possibilities of intervention. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004;49:151-156
22. Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, et al. The role of tissue factor in the pathogenesis of thrombosis and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 1998;4:135-139
23. Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, et al. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 1999;99:1780-1787
24. Zapolska-Downar D, Siennicka A, Kaczmarczyk M, Kolodziej B, Naruszewicz M. Simvastatin modulates TNF α -induced adhesion molecules expression in human endothelial cells. *Life Sci* 2004;75:1287-1302
25. Mareckova Z, Heller S, Horky K. [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek* 1999;45:46-50

26. Joseph-Silverstein J, Silverstein RL. Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest* 1998;16:176-182
27. Cybulsky MI, Lichtman AH, Hajra L, Iiyama K. Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clin Chim Acta* 1999;286:207-218
28. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:842-851
29. Walpolo PL, Gotlieb AI, Cybulsky MI, Langille BL. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:2-10
30. Blann AD, McCollum CN. Circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1994;72:151-154
31. Henninger DD, Panes J, Eppihimer M, et al. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 1997;158:1825-1832
32. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res* 1999;85:199-207
33. Richardson M, Hadcock SJ, DeReske M, Cybulsky MI. Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-selectin by the aortic endothelium of normolipemic and hyperlipemic diabetic rabbits. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1994;14:760-769
34. Harry BL, Sanders JM, Feaver RE, et al. Endothelial cell PECAM-1 promotes atherosclerotic lesions in areas of disturbed flow in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:2003-2008
35. Goel R, Schrank BR, Arora S, et al. Site-specific effects of PECAM-1 on atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1996-2002
36. Galkina E, Ley K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2292-2301

37. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004;56:185-229
38. Sterba M, Simunek T, Popelova O, et al. Early detection of anthracycline cardiotoxicity in a rabbit model: left ventricle filling pattern versus troponin T determination. *Physiol Res* 2007;56:535-545
39. Rossi CR, Mocellin S, Pilati P, et al. Pharmacokinetics of intraperitoneal cisplatin and doxorubicin. *Surg Oncol Clin N Am* 2003;12:781-794
40. Danesi R, Fogli S, Gennari A, Conte P, Del Tacca M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. *Clin Pharmacokinet* 2002;41:431-444
41. Ruggiero A, Ridola V, Puma N, et al. Anthracycline cardiotoxicity in childhood. *Pediatr Hematol Oncol* 2008;25:261-281
42. Ferreira AL, Matsubara LS, Matsubara BB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008;6:278-281
43. Chen B, Peng X, Pentassuglia L, Lim CC, Sawyer DB. Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 2007;7:114-121
44. Barry E, Alvarez JA, Scully RE, Miller TL, Lipshultz SE. Anthracycline-induced cardiotoxicity: course, pathophysiology, prevention and management. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8:1039-1058
45. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1591-1601
46. Nylaende M, Kroese A, Strandén E, et al. Markers of vascular inflammation are associated with the extent of atherosclerosis assessed as angiographic score and treadmill walking distances in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Vasc Med* 2006;11:21-28
47. Moiseeva EP. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res* 2001;52:372-386
48. Zibara K, Chignier E, Covacho C, et al. Modulation of expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1,

and vascular cell adhesion molecule-1 in aortic arch lesions of apolipoprotein E-deficient compared with wild-type mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2288-2296