UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Vliv Spirulina platensis na expresi endoteliální NO syntázy u apoE-deficientního myšího modelu aterosklerózy.

Hradec Králové, 2008 Mgr. Monika Pešlová

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

Datum: 30. 8. 2008

……

podpis rigorozanta

Poděkování
Dovoluji si poděkovat PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení rigorózní práce a poskytnuté rady.

Seznam použitých zkratek

ACE	angiotenzin konvertující enzym
ACH	acetylcholin
AP-1	transkripční faktor
apoE	apolipoprotein E
AT-1	receptor angiotenzinu II
CAM	cell adhesion molecules, buněčné adhezivní molekuly
CMP	cévní mozková příhoda
CMV	cytomegalovirus
CRP	C - reaktivní protein
DAP	diaminobenzidin
ECM	extracelulární matrix
EDGF	endothelium-derived growth factor, růstový faktor produkovaný endotelem
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
eNOS	syntáza NO
Hb	hemoglobin
HDL	high density lipoproteins, lipoproteiny o vysoké hustotě
ICAM-1	intercellular cell adhesion molekule-1, adhezní molekula
IDL	intermediate density lipoproteins, lipoproteiny o střední hustotě
IFN-γ	interferon γ
IGF-1	inzulínu podobný růstový faktor
ICHS	ischemická choroba srdeční
ICMP	ischemická cévní mozková příhoda
IL-1,6, 8	interleukin1, 6, 8
LDL	low density lipoproteins, lipoproteiny o nízké hustotě
LPS	lipopolysacharidy
MCP-1	monocytární chemotaktický protein-1
M-CSF	macrophage colony stimulating factor, růstový hormon pro makrofágy
MDGF	monocyte-derived growth factor, růstový faktor monocytů
NF-κB	nukleární faktor kappa B
NO	oxid dusnatý
OTC	tissue freezing medium, zmrazovací směs

OxLDL	oxidované LDL částice
PAF	faktor agregace destiček
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PBS	phosphate buffered saline, fosfáový pufr, pH 7,4
PC	phycocyanin
PDGF	platelet-derived growth factor, destičkový růstový faktor
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1, adhezní molekula
PGI	prostacyklin
ROS	reactive oxigen species
SePC	selenem obohacený phycocyanin
SeSP	selenem obohacená spirulina platensis
SP	spirulina platensis
TAG	triacylglyceroly
TGF β	transforming growth factor β, transformující růstový faktorβ
TIMP-1	tkáňový inhibitor metaloproteinázy 1
TNF α	tumor necrosis factor α, tkáňový nekrotizující faktor α
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1, adhezní molekula
VLDL	very low density lipoproteins, lipoproteiny o velmi nízké hustotě

OBSAH

1. ÚVOD 7

2. TEORETICKÁ ČÁST 8

2.1. Rizikové faktory aterosklerózy 8
2.1.1. Neovlivnitelná rizika 8
2.1.2. Ovlivnitelná rizika 9
2.3. Lipoproteiny 23
2.4. Spirulina platensis (Arthrospira platensis) 25
2.5. Endotel a regulace cévního tonu 27

3. CÍL PRÁCE 31

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 32

4.1. Zvířata a předepsaná dieta 32
4.2. Biochemická analýza 33
4.3. Imunohistochemie 33
4.4. Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí 35
4.5. Statistická analýza 35

5. VÝSLEDKY 36

5.1. Biochemická analýza 36
5.2. Imunohistochemické barvení eNOS v oblasti aortálního sinu 37
5.3. Stereologická analýza imunohistochemického barvení eNOS. 40

6. DISKUSE 42

7. ZÁVĚR 45

8. ABSTRAKT 46

9. ABSTRACT 47

10. POUŽITÁ LITERATURA 48

1. ÚVOD

Ateroskleróza se někdy označuje jako „nemoc 20. století“. Netrápí ale jen naši moderní civilizaci. Provází lidstvo už dlouhá tisíciletí. Známky kornatění tepen můžeme pozorovat i na mumiích staroegyptských faraónů. Změn na cévách postižených aterosklerózou si všímal už italský renesanční génius Leonardo da Vinci. V roce 1761 popsal italský lékař Giovanni Battista Morgagni ve svém stěžejním díle „O sídlech a příčinách nemocí“ zvápenatění věnčitých tepen na srdci. Podrobnějšího studia se však onemocnění dočkalo až v 19. století a probíhá stále. Přesto ateroskleróza a její komplikace zůstávají přes řadu pokroků v poznatcích o tomto onemocnění vedoucími příčinami morbidity a mortality ve vyspělých zemích a stejně je tomu i v České republice.

K současné situaci přispívá náš životní styl, špatné stravovací návyky, nedostatek tělesné aktivity, kouření, stres a některá další onemocnění, která spadají také do rizikových faktorů aterosklerózy.

Ateroskleróza je systémové onemocnění postihující cévy tepenného řečiště je charakterizováno velmi specifickými buněčnými reakcemi na ukládání lipidů ve stěně cévní. Toto vede ke vzniku aterosklerotických plátů tzv. ateromů, které zužují průsvit tepny a mohou ji i zcela uzavřít pro průchod krve, což vede k život ohrožujícím komplikacím onemocnění. Ateroskleróza se rozvíjí zvolna a nenápadně, dlouhou dobu probíhá bez příznaků a v tom je její určitá zrádnost. Proto je velice důležité dbát na prevenci a tím pádem na správnou životosprávu.

Tato rigorózní práce je pilotní prací, která se zabývá možným antiaterogenním působením Spiruliny platensis na experimentálním myším modelu aterosklerózy.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Rizikové faktory aterosklerózy

Aterosklerózu nezůsobí jedna příčina, ale celá řada tzv. rizikových faktorů. U každého jedince záleží na tom, kolik rizikových faktorů, v jaké síle a jak dlouho působí. Celkový stav nemocného záleží na komplexu vnějších vlivů a genetickém základu jedince, na které vnější vlivy působí [1].

Rizikové faktory aterosklerózy můžeme rozdělit do dvou základních skupin tzv. nemodifikovatelné a modifikovatelné.

Mezi nemodifikovatelné rizikové faktory (osobní charakteristiky) patří:

- věk
- osobní anamnéza aterosklerotického onemocnění
- rodinný výskyt předčasného aterosklerotického onemocnění
- mužské pohlaví

2.1.1. Neovlivnitelná rizika

Věk - je prakticky vůbec nejsilnější rizikový faktor, riziko konkrétní kardiovaskulární příhody prudce narůstá přibližně od 45. roku života u mužů a od 55. roku života u žen. U jedinců nad 60 let je riziko několikanásobně vyšší než ve věku 40 let, a to i u osob s minimální úrovní rizikových faktorů [2].

Osobní anamnéza aterosklerotického onemocnění - (respektivě jeho důsledků), tedy předchozí výskyt u konkrétního jedince, v podstatě ukazuje na již existující postižení, které samozřejmě velmi zvyšuje riziko dalších komplikací do budoucna.

Rodinný výskyt předčasného aterosklerotického onemocnění - (tím se myslí vznik onemocnění ve věku do 65 let) je v zásadě ukazatelem genetické náchylnosti k nemoci.

Příslušnost k mužskému pohlaví - rovněž představuje zvýšené kardiovaskulární riziko díky odlišné hormonální výbavě. Ženy jsou do menoupazy v nižším riziku vzhledem k ochraně estrogeny. Po menopauze se ovšem riziko žen progresivně zvyšuje a

vyrovnává se s mužským rizikem ve věkové skupině 70-79 roků.

Nemodifikovatelné rizikové faktory nemůžeme nijak ovlivnit, ale jejich znalost u jedince je důležitá pro posouzení celkového rizika [2].

2.1.2. Ovlivnitelná rizika

Z hlediska možné prevence mají tedy největší praktický význam ovlivnitelné faktory. Ovlivnitelných rizikových faktorů aterosklerózy je mnoho, za nejdůležitější se považují: hyperlipoproteinémie, kouření cigaret, arteriální hypertenze, diabetes mellitus a inzulínová rezistence, nedostatek fyzické aktivity a obezita, zvýšení koncentrace homocysteinu a fibrinogenu [3].

Jejich výčet je znázorněn v přehledu níže:

Obě dvě skupiny jsou ovlivnitelné, ale ne stejným způsobem a stejně snadno. Faktory životního stylu jsou ovlivnitelné přímo. Jedná se vlastně o určitý způsob chování, a záleží na vůli a rozhodnutí samotného jedince, jaký styl zvolí. Biochemické a fyziologické charakteristiky jsou rovněž ovlivnitelné, ale nepřímo a sekundárně, jako následek změn v životním stylu.

Mezi významné rizikové faktory aterosklerózy také řadíme metabolický syndrom, zvýšenou hladinu C-reaktivního proteinu, psychický stres a některá infekční agens.

Kouření a kardiovaskulární riziko

Věkově satndardizované riziko infarktu myokardu je u kuřáků přibližně dvojnásobné oproti nekuřákům. Kouření nepříznivě působí na cévní stěnu a dochazí k endoteliální dysfunkci, snižuje hladinu HDL cholesterolu, zvyšuje krevní srážlivost, má proarymtogenní efekt, oxid uhelnatý snižuje kapacitu hemoglobínu pro přenos kyslíku, inaktivuje NO zvýšením tvorby superoxidového radikálu a oxiduje LDL.

Strava a riziko aterosklerózy

Skladba stravy má pro riziko vzniku aterosklerózy zásadní význam. Toto riziko ovlivňuje:

- Složení a množství tuků
- Energetická hodnota (nadměrný energetický příjem)
- Zastoupení zdrojů ochranných látek (vitamíny, antioxidanty, vláknina)

Pohybová aktivita a kardiovaskulární riziko

Významným a silným ochraným faktorem proti ateroskleróze a kardiovaskulárním onemocněním je pohybová aktivita. Zvyšuje energetický výdej a působí tím proti nadváze a obezitě, má přímý ochranný účinek na cévy. Příznivě ovlivňuje také krevní tlak a hladinu krevního cholesterolu.

Alkohol a kardiovaskulární riziko

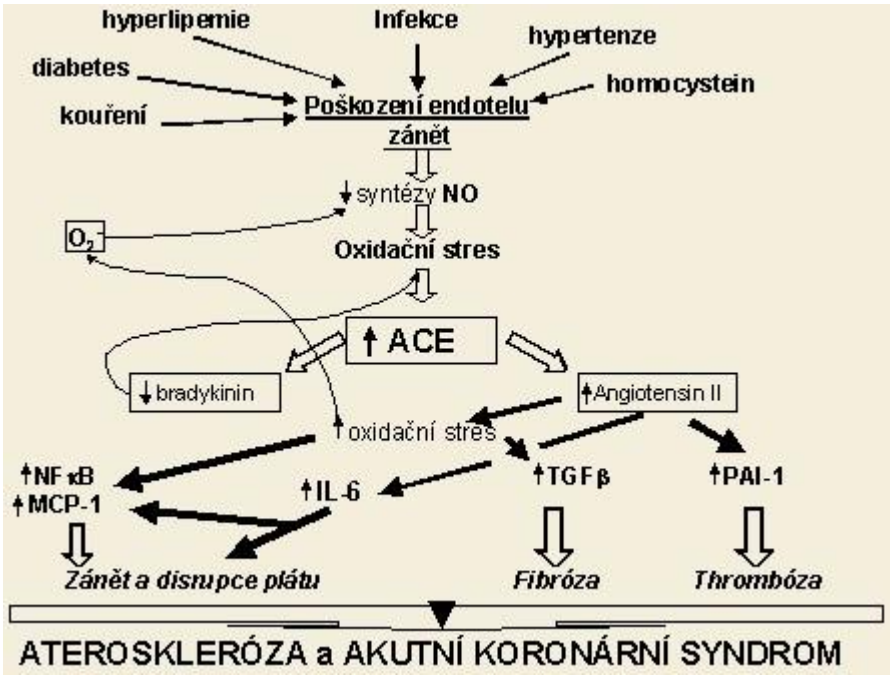
Alkohol konzumovaný v přiměřeně malém množství působí ochranně proti ateroskleróze. Jestliže je však konzumace nadměrná, mění se účinek na jednoznačně škodlivý, riziko aterosklerózy se naopak zvyšuje, zvyšuje se riziko hypertenze, nepříznivý je účinek na srdeční sval, zvyšuje se riziko h srdečních arytmií [4].

Hypercholesterolémie

Zvýšená hladina lipoproteinů v krvi je považována za hlavní rizikový faktor aterosklerózy. Z hlediska aterogeneze jsou důležité hodnoty celkového cholesterolu (>4,5mmol/l), LDL cholesterolu (>2,5mmol/l), HDL cholesterolu (<1mmol/l) a triacylglycerolů (>2mmol/l). Štěpením lipoproteinů bohatých na triglyceridy, a to jak exogenních – chylomikronů, tak endogenních – velmi nízko denzitních lipoproteinů (VLDL), vznikají remnantní lipoproteiny účinkem lipoproteinové lipázy (LP). Aterogenita remnantních proteinů je nepochybně prokázaná. Rovněž částice, které brání aterogenezi – lipoproteiny vysoké hustoty (HDL), jsou tvořeny v průběhu lipolýzy LP bohatých na triglyceridy z jejich povrchových částí. Ochranná role HDL v aterogenezi spočívá v reverzním transportu cholesterolu ze všech extrahepatálních buněk včetně buněk arteriální stěny, chrání LDL před oxidací, stimuluje syntézu NO, inhibuje adhezi monocytů, agregaci trombocytů, snižuje krevní viskozitu a tlumí aktivitu t-PA a PAI-1. Plazmatická koncentrace aterogenních LDL je regulovaná jejich tvorbou v játrech na jedné straně a utilizací na specifických receptorech (zejména v játrech) na straně druhé. Počet těchto fungujících LDL receptorů je regulován geneticky (vlastním genem pro LDL receptor a geny pro dva ligandy – apoprotein B a apoprotein E) a rovněž vlivem vnějšího prostředí. Dieta s nízkým obsahem nasycených mastných kyselin a cholesterolu a vysokým obsahem dietních vláken zvyšuje počet LDL receptorů, a tak snižuje jejich koncentraci. Monocyty vstupující do arteriální stěny za stavu zvýšené koncentrace LDL intravazálně, a tedy i v endoteliálním prostoru, pohlcují nadbytečné LDL částice (zejména oxidované) prostřednictvím scavengerových receptorů. Postupně se monocyty zvětšují a přeměňují na rezidenční makrofágy a pěnové buňky. Tvorba pěnových buněk představuje iniciální fázi aterogeneze, ale tyto buňky jsou rovněž časté v pokročilých aterosklerotických lézích, které jsou náchylné k prasknutí a způsobují klinickou komplikaci – infarkt myokardu a mozkovou mrtvici [5].

Hypertenze

Hypertenze významně zvyšuje kardiovaskulární riziko. Zvýšené hodnoty systolického krevního tlaku jsou významnější, než hodnoty diastolického. Za rizikové hodnoty TK považujeme < 140/90, u diabetiků <130/85, a to vede ke zvýšené koncentraci angiotenzinu II (silný vazokonstriktor), který přispívá k rozvoji aterogeneze stimulací proliferace buněk cévní hladké svaloviny. Jeho vazbou na specifický receptor dochází k uvolnění reaktivních forem kyslíku a dusíku v různých buňkách stěny arterií. Oxidační stres navozuje atrakci a aktivaci monocytů. Zvyšuje se proteosyntéza a hypertrofie hladké svaloviny stěny cévní. Receptor angiotensinu II (AT-1) také zvyšuje aktivitu lipoxygenasy v buňkách hladké svaloviny, což podporuje zánětlivou reakci a lipoperoxidaci LDL. Exprimuje se receptor pro oxLDL – LOX-receptor [6].



Obr. 1: Mechanismus účinku angiotensin-konvertujícího enzymu na aterosklerózu

Diabetes mellitus

Diabetes mellitus je sice samostatné onemocnění, které ale kromě jiného výrazně zvyšuje riziko aterosklerózy a veškerých jejích důsledků a komplikací. Závažnost tohoto rizika je daná i vysokým současným výskytem ostatních rizikových faktorů, zejména obezity, hypertenze a poruchami krevních lipidů. Konečné produkty pokročilé glykace (AGE) mohou měnit buněčný metabolismus vazbou na specifický receptor (RAGE), který navozuje aktivaci NF-kB (faktor spouštějící transkripci zánětlivých genů) a intracelulární oxidační stres. Hyperglykemie podporuje adhezi leukocytů k endotelu zvýšením exprese VCAM-1 a dalších adhezních molekul na povrchu buněk. To vede ke zvýšení tonu stěny arterií, k větší proliferaci buněk hladké svaloviny a tím ke ztluštění intimy už v časné fázi aterogeneze. Navozuje aktivaci vaskulární hladké svaloviny. [7].

Nadváha a obezita

Nadváha a obezita významně přispívá k riziku aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění. Ukazatelem přiměřenosti hmotnosti je hodnota BMI (index tělesné hmotnosti), která by měla být nižší než 25. U kardiovaskularních chorob je typická obezita centrálního typu („tvaru jablka“), mužského typu. Obvod pasu nad 102 cm u mužů a nad 88 cm u žen je parametrem viscerální obezity. Intraabdominální tukové buňky jsou metabolicky aktivnější než periférní adipocyty a uvolňují více mastných kyselin. To vede ke zvýšení jaterní tvorby VLDL a hypertriglyceridémii. Obvod pasu koreluje s kardiovaskulárním rizikem lépe než BMI [3].

Trombogenní faktory

Jako trombogenní se označují faktory, které usnadňují vznik krevní sraženiny, která může ucpat cévu. Jedná se o složité vlastnosti krve, které jsou závislé např. na výživě (příjem různých mastných kyselin), na případném kuřáctví a moha dalších faktorech.

C-reaktivní protein

Tento velmi nespecifický, ale velmi citlivý marker zánětlivé reakce je produkován hepatocyty, endoteliálními buňkami, hladkosvalovými buňkami a makrofágy po stimulaci mediátory zánětu (IL-6, IL-8, TNF-α). Díky poškození funkce endotelu, posílení prozánětlivého a prokoagulačního stavu se spolupodílí na rozvoji aterosklerózy.

Infekce

Je stále více důkazů, že chronická infekce má souvislost s rozvojem aterogeneze. Byla nalezena přítomnost herpetických virů a Chlamydia pneumoniae v ateromových plátech a zvýšený titr protilátek proti různým infekčním agens (Helicobacter pylori, cytomegalovirus, virus Epsteina a Barrové, Hemophilus influenzae, Mycoplasma pneumoniae) u pacientů s akutním koronárním syndromem. Rovněž chronický zánět periodontia je považován za přispívající faktor rozvoje aterosklerózy. Infekce cévní stěny indukuje tvorbu látek, které napomáhají rozvinout dysfunci endotelu i cévních svalových buněk [8].

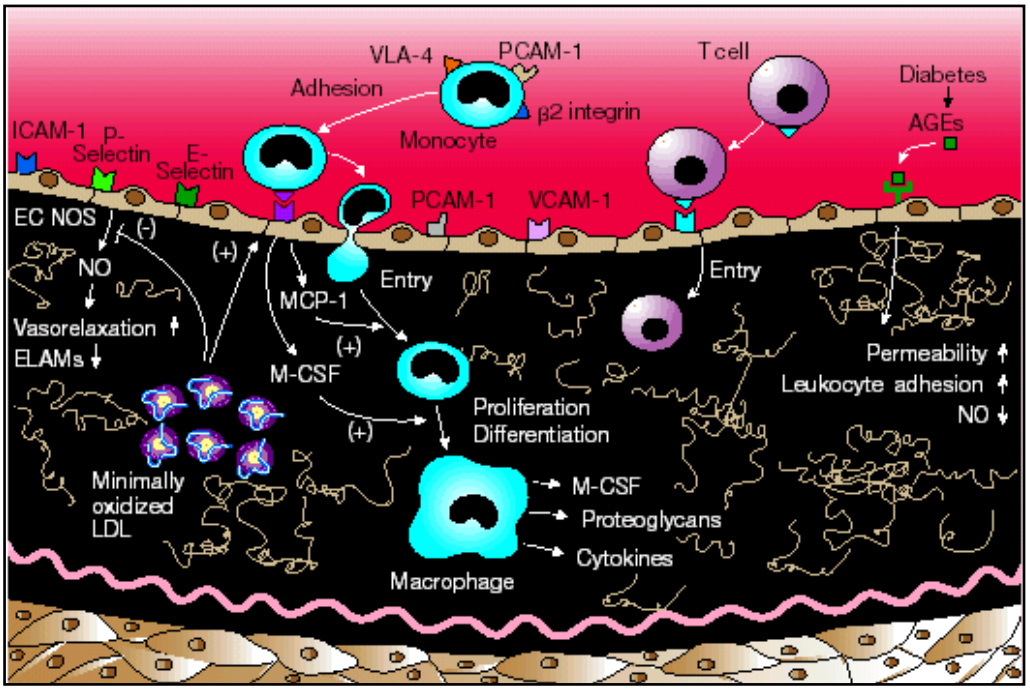
2.2. Ateroskleróza

Vznik choroby

Pohled na vznik aterosklerózy prošel velkým vývojem, a to od infiltrační teorie aterosklerózy patologa Virgchowa v 19 století. Podle které byl iniciačním faktorem vzniku aterosklerózy lipidová infiltrace skrz endotel.

V sedmdesátých letech 20. století byla předchozí teorie vystřídána teorií mechanického poškození endotelu. Podle ní léze endotelových buněk s následným odkrytím subendotelového vaziva způsobí aktivaci krevních destiček a jejich nasednutí na poškozenou část cévní stěny. Aktivované destičky produkují řadu působků, z nichž především platelet derived growth factor (PDGF) byl pokládán za spouštěcí faktor celého procesu. Silný aktivační faktor pro hladkosvalové buňky PDGF podporuje jejich migraci z médie skrz lamina elastica interna a následnou proliferaci v intimě. Hladkosvalové buňky pak v intimě produkují proteiny extracelulární matrix (ECM), dochází k akumulaci lipidů a vzniku léze. Tato teorie nezůstala konečnou, jelikož se neprokázal defekt integrity endotelu na počátku vývoje léze dále jelikož krevní destičky nehrajou roli v počátečních stádií aterosklerózy, ale hlavně při jejích komplikacích. Zmíněná proliferace hladkosvalových buněk je dnes pokládána spíše za pozitivní jev zajišťující stabilitu aterosklerotického plátu.

Dnes je podkladem tohoto onemocnění teorie inflamatorní (zánětlivé) choroby a vznik endoteliální dysfunkce, což vede ke vzniku aterosklerotické léze [9].



Obr. 2: Vznik aterosklerózy, inflamace. Lusis, Nature 2000.

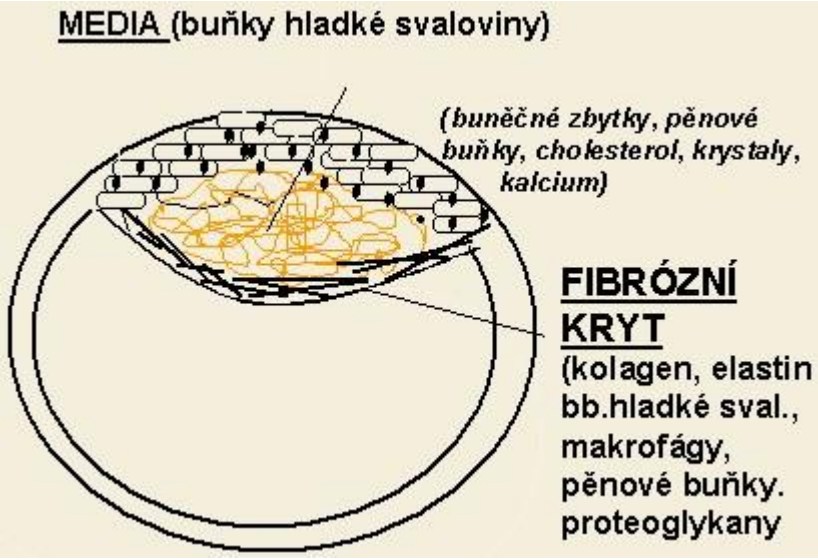
Základní stádia (formy) aterosklerózy

1.Časná léze - tukové proužky

Tukové proužky jsou nejčastější formou aterosklerózy a vyskytují se již v dětském věku. Nacházíme je především v intimně velkých cév. Jsou žluté barvy a neprominují do lumina arterie, neovlivňují tedy průtok krve. Základními elementy jsou pěnové buňky, které vznikají z makrofágů a buněk hladké svaloviny, které akumulují lipidy (ve formě esterů cholesterolu). Tukové proužky nejsou stabilní, během života se vyvíjejí a může dojít také k jejich regresi [10].

2.Fibrózní ateromové pláty

Fibrózní pláty (ateromy) jsou větší, ostře ohraničená, šedožlutá ložiska, tužší až chrupavčité konzistence. Prominují do lumina arterie a působí její obstrukci. Ateromy obsahují proliferující buňky hladkých svalů, makrofágy, lymfocyty, kolagenní matrix a tuková depozita. Mohou podléhat nekróze a kalcifikovat.



Obr. 3: Schéma ateromového plátu

3. Stádium komplikované léze

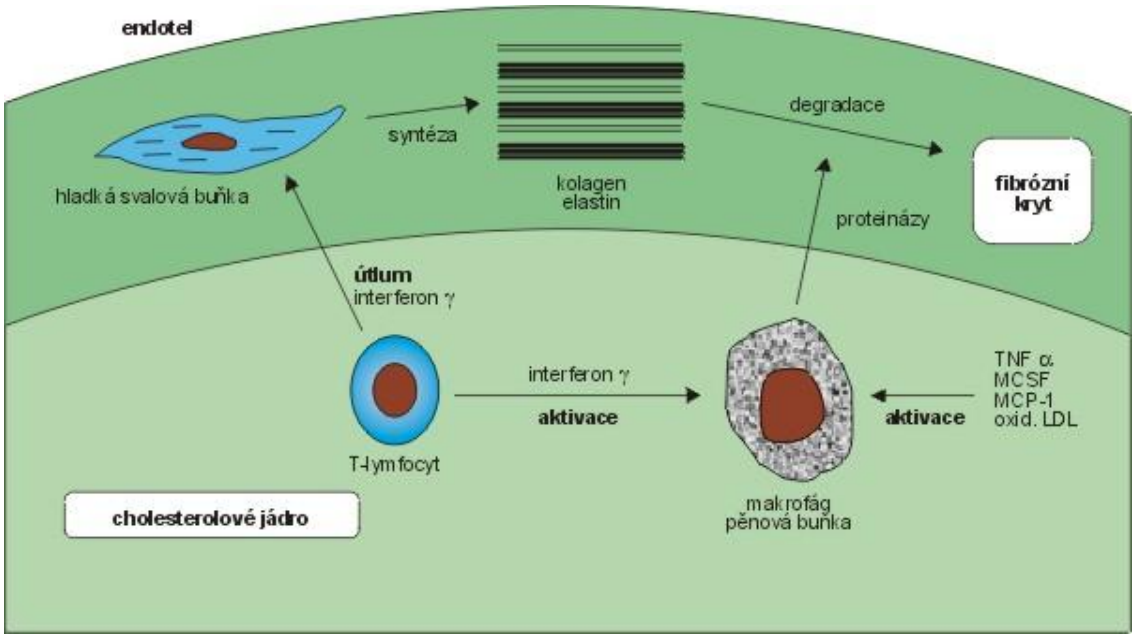
Komplikované léze vznikají kalcifikací, degenerativními změnami (ulcerace, ruptura), které se stávájí místem adherence trombocytů, agregace trombózy. Trombóza je pak příčinou náhlého cévního uzávěru.

Lokalizace lézí je variabilní, ale nejčastěji v epikardiální části věnčité tepny, nejčastěji excentrického typu, v místě odstupu nebo větvení artérií. Distálním směrem aterosklerotických změn přibývá [11].

Patofyziologie

Nejprve dochází k aktivaci endoteliálních buněk (vlivem oxidovaných lipoproteinů, především LDL, hemodynamického stresu atd.) Po aktivaci tyto buňky produkují růstové faktory (PDGF, ….., MCP-1) a cytokiny (IL-1, TNF-α), na povrchu endotelu je zvýšená exprese buněčných adhezních molekul (CAM): např. VCAM-1 a ICAM-1). Změnou permeability a vyšší expresí CAM vstupují LDL částice do intimy. Prostupem přes endotel, stykem s monocyty, makrofágy, hladkosvalovými buňkami a T-lymfocyty je LDL v cirkulaci a přímo v cévní stěně oxidativně modifikován, vyšší měrou zejména za situací zvyšujících oxidační stres (kouření, hyperglykémie, chronický zánět) [12].

Cytokiny přitahují do místa léze monocyty a T-lymfocyty z krevní cirkulace, dochází k jejich migraci do intimy a aktivaci. Monocyty se zde transformují na makrofágy (působením EDGF, M-CSF), které pohlcují oxLDL prostřednictvím receptorů pro oxLDL nebo scavengerových receptorů (SR-AI, SR-AII, CD-36, CD-68) a zvýšnou kumulací cholesterolu bez zpětnovazebné regulace tak vznikají pěnové buňky. Ty jsou makroskopicky patrné jako ploché žlutavé tečky či proužky v subendotelu, odtud „tukové proužky“ (fatty streaks). Tukové proužky mají definovanou histologickou strukturu a vznikají v místech se zvýšeným obsahem lipoproteinů v intimě díky jejich zvýšené vazbě na makromolekuly extracelulární matrix [9].

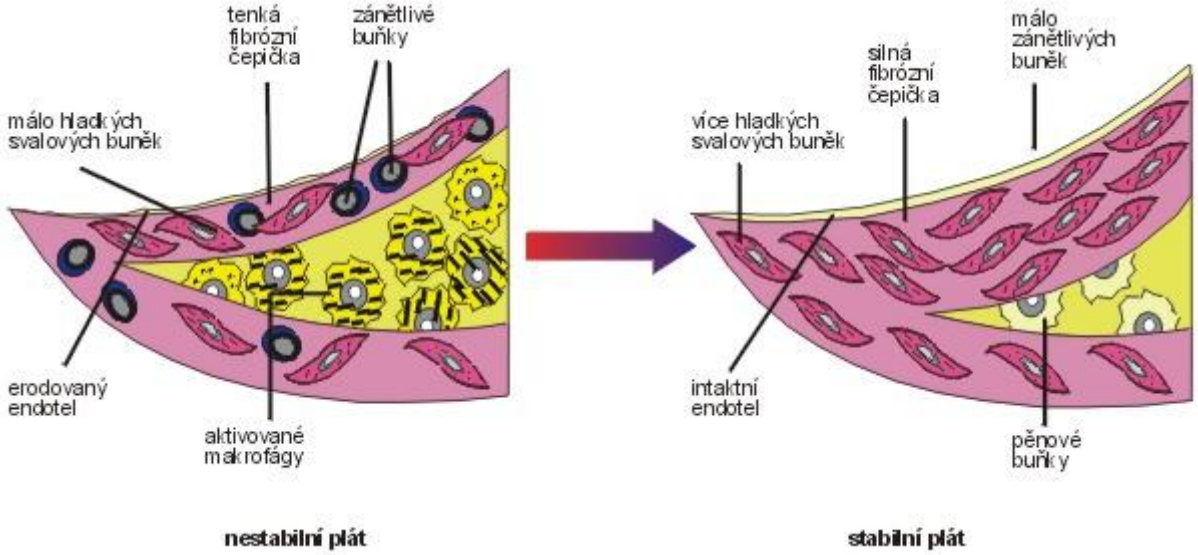


Obr. 4: Zjednodušené schéma tvorby a degradace fibrózního krytu aterosklerotického plátu

Makrofágy jsou hlavním buněčným typem zastoupeným v lézi, spouštějí a udržují inflamaci v subendotelu. Makrofágy taktéž produkují růstové faktory (PDGF, MCP-1) a cytokiny (IL-1, TNF-α) a tím zvyšují chemotaxi a kumulaci dalších makrofágů a T- lymfocytů. Společně s endotelem produkují PDGF (destičkový růstový faktor), MDGF (monocytový růstový faktor) a zánětlivé mediátory (IL-8). Díky těmto působkům dochází ke změně fenotypu hladkých svalových buněk. Fenotyp kontraktilní (udržuje cévní tonus a podílí se na reparaci při poškození) přechází na fenotyp sekreční (produkuje růstové faktory, cytokiny, elastin a kolagen). Dochází k proliferaci a vstupu hladkosvalových elementů do intimy. Díky cytokinům jsou přitahovány další hladkosvalové buňky, a ty syntetizují kolagenní matrix a tvoří se tzv. fibrózní čepička. Makrofágy stále pohlcují lipoproteinové částice (hlavně volný cholesterol) a kumulují se zejména ve střední střední části plátu. Volný cholesterol působí nekrózu a apoptózu makrofágu. Tyto procesy vedou ke vzniku ateromového plátu [13].

Fibrózní ateromový plát je pevná světlešedivá vyvýšenina v lumen cévy, skládá se z fibrózní čepičky a jádra. Pod nejsvrchnější vrstvou čepičky tvořenou endotelem jsou proliferované hladkosvalové buňky, zánětlivé buňky, T-lymfocyty, makrofágy, pěnové buňky a extracelulární matrix. Čepička kryje utvářející a zvětšující se lipidní jádro, které obsahuje buněčnou drť extracelulárních lipidů s krystalky cholesterolu a pěnových buněk a je vysoce trombogenní.

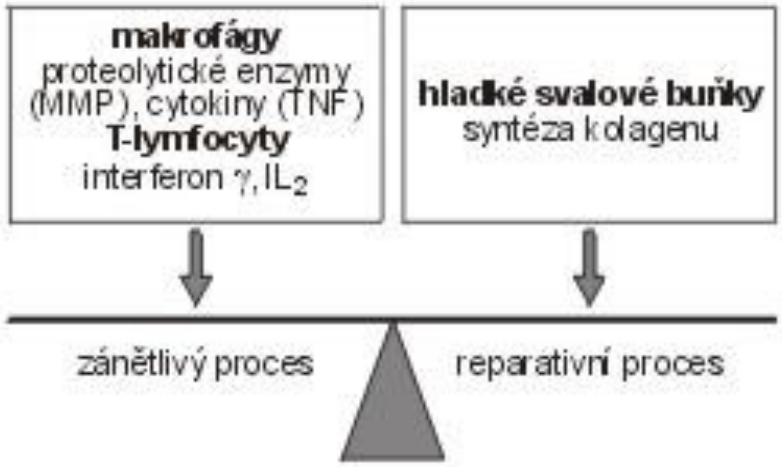
Fibrozní plát může růst pozvolna a postupně obturovat cévní lumen, klinicky se manifestuje např. jako stabilní angina pectoris nebo se stane nestabilním, vede k trombotizaci a akutní obstrukci, klinicky se projeví jako infarkt myokardu nebo nestabilní angina pectoris.



Obr. 5.: Shéma stabilního a nestabilního aterosklerotického plátu (Libby, 1995; materiál "IMPPACT", BMS ČR)

Plát náchylný k rubtuře se označuje jako plát vulnerabilní, nebo nestabilní. Nestabilní aterosklerotický plát (obr. 2) je typický zvýšeným množstvím zánětlivých buněk, makrofágů, zvýšenou apoptózou těchto makrofágů, velkým lipidním jádrem krytým jen úzkou fibrózní čepičkou. Zvláště pak fibrózní čepička infiltrovaná makrofágy a T lymfocyty je rizikovým faktorem. Makrofágy totiž sekretují jednak pro-inflamatorní cytokiny jako TNF, IFN-γ a IL-1, které působí apoptózu hladkosvalových buněk, blokují tvorbu kolagenu a jednak metaloproteázy, které rozkládají kolagen a jiné složky ECM. Toto všechno jsou faktory působící degradaci a zúžení fibrózního krytu plátu a tedy jeho náchylnost k ruptuře. Trombogenicita aterosklerotické léze je rovněž závislá na přítomnosti tkáňového faktoru. Tkáňový faktor (TF) je protein, který je spouštěcím signálem vnější cesty koagulační kaskády. V aterosklerotické lézi může být produkován endoteliálními buňkami a makrofágy aktivovanými různými podněty a je uvolňován během smrti buňky v asociaci s apoptotickými mikropartikulemi. Navíc jedna z charakteristik apoptotických buněk je externalizace fosfatidylserinu do vnější vrstvy membrány, čímž se vytváří vhodné prostředí pro aktivaci TF. Tento proces determinuje trombogenicitu uvnitř plaku a může vysvětlit tvorbu trombu po ruptuře plaku, kdy se dostává do kontaktu lipidní jádro s krví [14].

Ruptura je komplikace ateromového plátu, který obsahuje lipidní jádro zaujímající víc než 40% objemu léze a úzkou fibrózní čepičku bohatou na makrofágy a chudou na hladkosvalové buňky. Je výsledkem nerovnováhy mezi silami působícími na čepičku a vnitřní pevnosti čepičky, která určuje rezistenci k ruptuře. U ruptury se jedná o hluboké „prasknutí“ s uvolněním trombogenního materiálu do krve, kdežto u eroze se jedná o povrchové odstranění endotelu. Příčinou endoteliální eroze by mohla být například apoptóza endotelových buněk na povrchu aterosklerotického plátu. Vlivem pro-adhezívních a pro-koagulačních vlastností apoptotických buněk by tento jev mohl hrát podstatnou roli v iniciaci koagulační kaskády a v tvorbě luminálního trombu [15].



Obr. 6: Buněčné elementy v aterosklerotickém plátu

2.3.Lipoproteiny

Lipidy jsou krví transportovány v podobě kulovitých molekulárních komplexů, lipoproteinů .(LP)

Jejich obal tvoří amfifilní lipidy (fosfolipidy, cholesterol), jejich jádro tvoří silně hydrofobní lipidy (triacylglyceroly) a estery cholesterolu (chol-ester), což je transportní a skladovací forma cholesterolu. Lipoproteiny mimoto obsahují některé apolipoproteiny a rozlišují se podle velikosti, hustoty, složení lipidů, místa tvorby a rovněž na základě svých apolipoproteinů, které slouží jako strukturní elementy LP, jako ligandy pro LP-receptory v membráně LP-cílových buněk a také jako aktivátory enzymů. Především zvýšená hladina lipoproteinů v krvi je považována za hlavní rizikový faktor vzniku aterosklerózy. Nejrizikovější z hlediska aterogeneze jsou LDL částice. Ovšem nověji se diskutuje již i zvýšení VLDL i IDL a remnant chylomiker jako rizikové. Protektivní charakter mají pouze HDL. Problematice lipoproteinů a aterosklerózy se věnuje česká monografie Doc.MUDr.Sošky, Csc [16].

Nebezpečí nepředstavují nativní LDL, ale LDL modifikované. LDL difundují, víceméně dle koncentrace, skrz spoje mezi endotelovými buňkami i skrz buňky do subendotelu a pokud je porušena rovnováha mezi jejich příjmem a výdejem může zde docházet k jejich akumulaci. Což je hlavní předpoklad pro možnost jejich změny – oxidace, lipolýza, proteolýza, agregace. Nejčastější strukturální změnou je pak lipidová oxidace [17].

Dnes se předpokládají tři hlavní enzymové mechanismy, které produkcí volných radikálů kyslíku způsobují tuto oxidaci:

- 12/15 lipoxygenáza.
  U myší se lipoxygenázy jeví jako hlavní způsob oxidace LDL, neboť defekt lipoxygenázy výrazně snižuje celkový povrch vzniklých aterosklerotických lézí, ale u člověka to zřejmě v takové míře neplatí.

- NADPH oxidáza, jednotka P47 phox.

- Mitochondrie, jejich enzymatická tvorba volných radikálů.

Později, s postupem vývoje léze, se jedná exkluzivně o neenzymatickou lipoperoxidaci,

tvorbu volných radikálů bez účasti enzymů .

Oxidativní modifikace LDL udájně probíhá ve dvou fázích. K první fázi oxidace dochází ještě před vstupem monocytů do subendotelu a jedná se o oxidaci lipidů bez změny apolipoproteinů B (apoB) (mildly nebo minimally oxidized LDL). Druhá fáze nastává, když jsou monocyty rekrutovány do léze, přeměňovány na makrofágy a přispívají svou obrovskou oxidační kapacitou. Lipidy v LDL jsou tak dále oxidovány, ale oxiduje se i jejich proteinová složka (highly oxidized LDL), což vede ke ztrátě rozpoznávání těchto částic LDL receptory, jejich vychytávání přes „scavenger" receptory a masivní akumulaci cholesterolu v makrofázích za vzniku pěnových buněk.

Oxidované lipidy představují inflamatorní substance – mají chemoatrakční vlastnosti pro monocyty, aktivují T lymfocyty, endotelové buňky atd. Vyvolávají taktéž autoimunitní reakci organismu projevující se tvorbou specifických cirkulujících protilátek. Studie u lidí pak prokázaly zvýšené hladiny těchto autoprotilátek u pacientů s progresivní koronární aterosklerózou a považují je za nezávislý faktor předpovídající vývoj aterosklerózy [18].

2.4.Spirulina platensis (Arthrospira platensis)

Tato modrozelená mikrořasa se vyskytuje v tropických a subtropických vysoce alkalických vodách v Africe, Asii a Jižní Americe.

Spirulina je zdrojem přirozených lehce zpracovatelných bílkovin (cca 60%) a bohatým přírodním zdrojem zeleného rostlinného barviva chlorofylu. Vedle toho Spirulina obsahuje i velké množství železa v chelátové formě, vápník, zinek, draslík a hořčík. Z mikroelementů ve Spirulině najdeme selen, chrom, lithium a mangan [19].

Obr. 7: Spirulina platensis

Selen má obvykle velkou pozornost jako esenciální mikroprvek pro zvířata i pro člověka. Jeho funkce je spojena s antiaterogenními a s dalšími fyziologickými funkcemi díky velkému množství enzymů závislých na selenu. Nedostatek selenu v potravě může být příčinou odlišných poruch jako např. onemocnění kardiovaskulární soustavy, rakoviny, reumatické artritidy, katarakty a anémie. Hlavní formy selenu vyskytující se v potravě jsou organické na proteiny navázané SeMet (selenomethionin, zdrojem jsou rostliny i zvířata) a SeCys (selenocystein, zdrojem jsou zvířata). Selenan je přítomný v některých potravinách a v oblastech s malým výskytem selenu je do potravy přidáván. Organický selen jako doplněk stravy je považován za lepší a bezpečnější než anorganický selen. Jako odezva na potřebu selenu v organismu jsou velmi rozšířené potraviny obohacené o selen [20]. 11 Při hledání zdroje organického selenu se vědci pokoušeli zvýšit normálně nízkou hladinu selenu ve Spirulině platensis jejím růstem v mediu obohacené o selen Tento pokus by mohl sloužit jako zdroj pro produkci organického selenu. Spirulina je modrozelená mikrořasa patřící do skupiny cyanobakterií. Je využívána jako zdroj proteinů a dalších nutričních prvků. Phycocyanin (PC) a alophycocyanin jsou modré, ve vodě rozpustné fotosyntetické proteiny získané z cyanobakterií jako je Spirulina. Jsou používány jako nutrienty nejen pro člověka, ale také pro zvířata, jako přírodní potravinářská a kosmetická barviva a také jako léky.

Proteinový extrakt ze Spiruliny je silným scavangerem volných radikálů (hydroxylových a peroxylových) a inhibuje peroxidaci mikrosomálních lipidů. Zvýšená hladina phycocyaninu je spojena se zvýšením antioxidační aktivity a tím je phycocyanin

hlavní složkou podílející se na antioxidační aktivitě. 16 Phycocyanin je také silný antioxidant a protizánětlivá složka. Chemickou strukturou je podobný bilirubinu a působí jako významný scavanger ROS (reactive oxygen species) na mnoha modelech jak in vitro tak i in vivo [21].

Spirulinou platensis se také zabývali Jérome Riss, Kelly Décordé, Thibault Sutura atd. ve své práci: "*Phycobiliprotein C-phycocyanin ze Spiruliny platensis redukuje oxidační stres a expresi NADPH oxidázy indukovanou při aterogenní dietě u křečků"*.

Studovány byly účinky spiruliny a phycocyaninu, obou jak obohacené i neobohacené o selen, na plazmatický cholesterol, počáteční aterosklerózu, srdeční produkci superoxidového aniontu a na expresi NAD(P)H oxidázy u křečků [19].

Při tomto pokusu bylo rozděleno čtyřicet křečků do pěti skupin po osmi a krmeno aterogenní dietou 12 týdnů. Sondou do žaludku jim bylo podáno buď mL/kg denně phycocyaninu (PC), selenem obohacený phycocyanin (SePC), spiruliny (SP) nebo selenem obohacené spiruluny (SeSP) ve vodě. U jedné ze skupin byla použita pro kontrolu voda. SeSP a SePC obsahovaly 0,4μm Se/100g. Koncentrace plazmatického cholesterolu a non-HDL cholesterolu byla nižší ve skupině konzumující SePC. HDL cholesterol nebyl nikdy ovlivněn. SePC významně zvýšil plazmatickou antioxidační kapacitu o 42% oproti kontrole. Ve všech skupinách v porovnání s kontrolou byl zaznamenán ochranný efekt aktivity gluthation peroxidázy (v průměru 87%) a superoxid dismutázy (56%) v játrech. Tukové proužky v aortální části byly vyznamně redukovány hlavně u experimentálních skupin, kde byl podáván PC (o 82%) a SePC (o 85%). Srdeční produkce superoxidového aniontu se podstatně snížila asi o 46 - 76% ve čtyřech pokusných skupinách a zvláště ve skupině SePC (76%). Po konzumaci SePC se snížila exprese podjednotky p22phox NAD(P)H oxidázy o 34% [22].

Výsledky ukazují, že chronická konzumace Se-bohatého phycocyaninu spiruliny je schopná zabránit rozvoji aterosklerózy. Základní mechanismus souvisí především s inhibicí pro-oxidačních faktorů a druhotný význam má zlepšení lipidového profilu v krvi.

2.5. Endotel a regulace cévního tonu

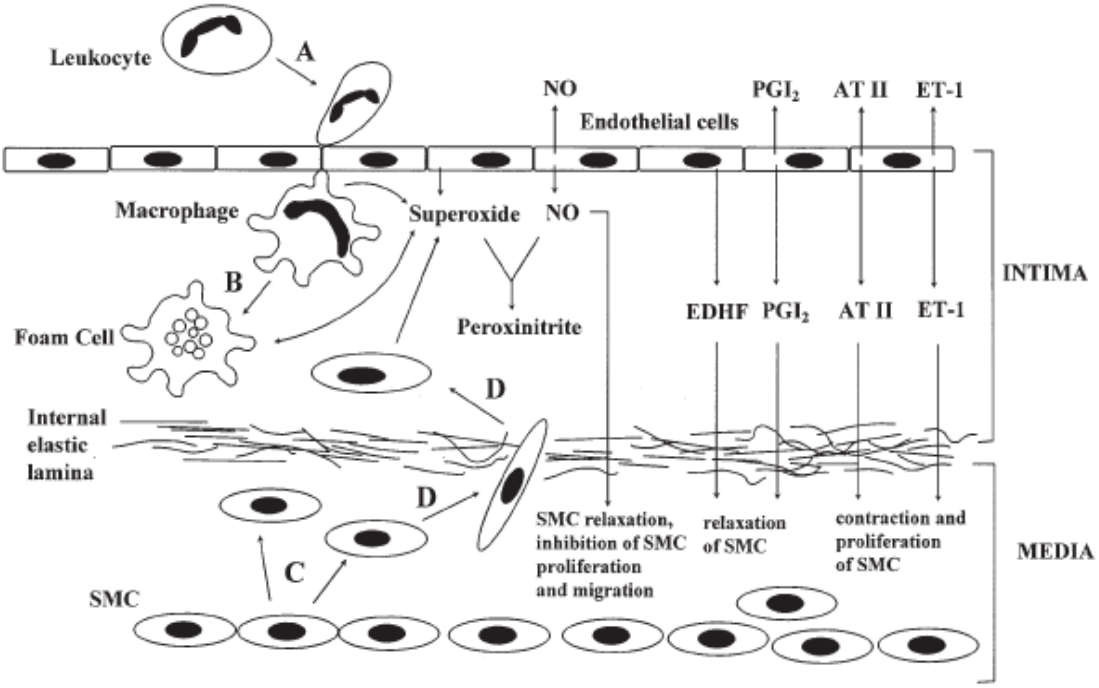
Endotel hraje dvojí roli v regulaci vasomotorického napětí. Produkuje a uvolňuje jak relaxační tak i konstrikční faktory (viz. obr. 8). V normálním endotelu mají převahu vasorelaxační faktory nad faktory vasokonstrikčními [23]. Vasoaktivní faktory uvolňované endotelem jsou znázorněny na obr. 8, jejich seznam je v tabulce 1.

Tab. 1 Vasoaktivní látky produkované endoteliálními buňkami

Vasoaktivní modulátor	Vasoaktivní efekt
Oxid dusnatý (NO)	vasodilatace, inhibice agregace krevních destiček, proliferace hladkosvalových buněk a migrace
Prostacyklin (PGI)	inhibice krevních destiček, vasokonstrikce
Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)	vasodilatace
Endothelin (ET-1)	vasokonstrikce
Renin-angiotensin systém	vasokonstrikce, stimulace proliferace hladkosvalových buněk
Superoxidové anionty	vasokonstrikce

Obr. 8: Schéma strukturálních elementů cévního endotelu, počáteční děje ateroskleróz (levá část), a zástupci regulace cévního tonu zprostředkovani endotelovými buňkami (pravá část).

***A,** infiltrace leukocytu; **B,** tvorba pěnových buněk; **C,** proliferace hladkosvalových buněk; **D,** migrace hladkosvalových buněk.*



OXID DUSNATÝ

NO je hlavní vasorelaxační faktor produkovaný buňkami endotelu. V endotelu je syntetizován eNOS (NO syntetáza)

L-arginin → L-citrullin NO

Syntéza zahrnuje oxidaci dusíku guanidinu na L-arginin po aktivaci specifických G-proteinů. Přestože exprese genů pro eNOS je konstitutivní, může být regulována mnoha elementy v promotorové oblasti. Například promotorová sekvence eNOS obsahuje odpovědi elementů na shear stres stejně jako aktivátory proteinu 1(AP-1) a nukleárního faktoru 1 (NF-1). Dalším důkazem je, že stimulace proteinkinázy C (α nebo ε) může vést k aktivaci promotoru eNOS u lidského endotelu. eNOS se vyskytuje zejména u

endotelových buněk, ale byla nalezena i u krevních destiček a selektivní populace neuronů.Molekulární hmotnost eNOS je 135 kDa. Fosforylace enzymu může vést k jeho přemístění do cytosolu a tím regulovat aktivity eNOS [24].

Aktivace eNOS vyžaduje několik kofaktorů. Ačkoliv eNOS je především kalcium- a kalmodulin-dependentní enzym, nedávné důkazy ukazují možnost kalcium-independentní aktivace. Tento druh eNOS aktivace byl prokázán při odpovědi na shear stres. Signál transdukčních procesů, které mohou vést ke kalcium-independentní aktivaci, vyžaduje fosforylaci tyrosinu, aktivaci fosfolipázy C-γ_1 a nárůst 1,4,5-trifosfátu. Aktivace eNOS pravděpodobně vyžaduje další kofaktory jako NADPH, 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin, FMN a FAD [25]

Bazální sekrece NO endoteliálními buňkami způsobuje vasodilataci cév. Poločas rozpadu NO je asi 3-5 sekund a po uvolnění z endoteliálních buněk se snadno rozšíří do okolních tkání. Z endotelu proniká do hladkých svalových buněk, kde aktivuje jejich rozpustnou guanylátcyklázu a způsobí nárůst cGMP. Výsledkem zvýšení cGMP je inhibice kontraktilních mechanismů hladkých svalových buněk a vede k vasorelaxaci. Endoteliální buňky uvolňují NO také do krevního proudu. Předtím než je NO inaktivován oxyhemoglobinem, může zůstat biologicky aktivní v blízkosti endotelu a potlačit adhezi leukocytů na buňky endotelu. Část z těchto procesů může vyžadovat NO indukovanou down-regulaci exprese adhesivních buněk na endotel např. ICAM-1 A VCAM-1. NO ale nechrání před stimulací upregulace ICAM-1 způsobenou LPS (lipopolysacharidy). NO je silný inhibitor agregace krevních destiček a může spolu s prostacyklinem inhibovat aktivaci destiček a uplatnit se ve fibrinolytických procesech. Kromě toho NO ovlivňuje lokální prostředí uvnitř cévní stěny. Například NO zabraňuje proliferaci a migraci hladkých svalových buněk a produkci matrix těmito buňkami [26].

Regulace tvorby NO byla hojně studována. Zpočátku se věřilo, že eNOS se projevuje v endoteliálních buňkách. Důkazy ukazují, že funkce eNOS může být regulována několika odlišnými podněty. Nejlépe známé fyziologické aktivátory tvorby NO jsou fyzikální podněty jako shear stres. Za nejdůležitější fyzikální podnět pro eNOS je považován shear stres. Je prokázáno, že fyzikální pokusy mohou stimulovat tvorbu NO v cévním řečišti u lidí, stejně tak indukovat genovou expresi eNOS u experimentálních zvířat. Kromě toho produkce endoteliálního NO může být stimulována hormony např. acetylcholinem, vasopresinem, estrogeny, autakoidy (bradykinin a histamin), destičkovými faktory (serotonin a ADP) a faktory tvořícími se při koagulaci krve (trombin). Exprese eNOS a tím i produkce NO může být zvýšena

TGF-β a vysokou hladinou glukózy. Zánětlivé cytokiny jako je TNF a LDL mohou vést k snížení exprese eNOS. [27].

Dysregulace metabolismu NO je detekována u mnoha cévních onemocnění např. u aterosklerózy, hypercholesterolémii, ischemické reperfuzi, diabetu a hypertenze. Silné důkazy naznačují, že cévní relaxace závislá na endotelu je výrazně poškozena u zvířat krmených cholesterolem nebo u izolovaných aterosklerotických lidských koronárních arterií. Poškození relaxace odpovídá stupni aterosklerózy [28].

Samotný NO produkovaný endoteliálními buňkami nemůže udržet normální integritu endotelu, ale naproti tomu zvýšení jeho hladiny může vyvolat jeho poranění. NO tudíž hraje dvojí roli v aterogenezi. Vysoké hladiny NO způsobující poškození buňky jsou produkované tzv. iNOS (induktivní syntáza) jako odezva na stimulaci cytokiny. Tato izoforma NOS je prezentována především na makrofázích, u hepatocytů, u buněk myokardu a hladkých svalových buněk. iNOS byla také identifikována u buněk endotelu, ale jejich stimulace interferonem-γ TNF nebo LPS zvyšuje produkci NO pouze nepatrně. Zvýšení NO, přímo nebo pomocí jeho derivátů, může být příčinou několika cytotoxických efektů jako je nitrace proteinů, ribosylace ADP a inhibice aktivity enzymů. NO může tedy indukovat apoptózu u cévních buněk, zatímco u endoteliálních buněk se projevují procesy inhibující apoptózu. NO je volný radikál a při zvýšení jeho hladiny může dojít k poškození vlivem zvýšeného oxidačního stresu [29]. Například NO reaguje se superoxidem a vzniká forma peroxynitritu, který je velice silný oxidant. Reakce NO se superoxidem je třikrát rychlejší než dismutace superoxidu katalyzovaná superoxiddismutázou. Tato reakce může být významně ovlivněna lokální regulací krevního proudu. Kromě toho se předpokládá, že tvorba peroxynitritu může být hlavním faktorem pro oxidativní poškození buněk. Mitochondrie mohou být primárním místem produkce peroxynitritu v buňkách a mohou být snadno ovlivnitelné ke zvyšování jeho hladin. Peroxynitrit může porušit funkci mitochondrií a tím přispět k jejich dysfunkci nebo smrti. Předpokládá se, že indukce iNOS pomocí cytokínů a zvýšení hladiny superoxidu mohou přispívat ke tvorbě peroxynitritu uvnitř aterosklerotických lézí. Zvýšené hladiny NO způsobují zvýšený oxidační stres a tkáňovépoškození u aterogeneze [30].

3. CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo ověřit potenciální hypolipidemické účinky Spiruliny platensis a pokusit se popsat stav cévního endotelu pomocí endoteliální NO syntézy na experimentálním zvířecím modelu, kterým byly apoE-deficientní myši. K tomu byly sledovány parametry lipidového spektra v krvi a detekována exprese eNOS na cévním endotelu. K hodnocení morfologických nálezů byly použity imunohistochemické a sterolo-gické metody.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Zvířata a předepsaná dieta

Samci myši kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E (apoE$^{-/-}$), vážící 15-20 gramů, byli laskavě poskytnuti Prof. Polednem (IKEM, Praha, Česká Republika) a ustájeni v SEMEDu (Praha, Česká Republika). Všechny myši byly v 6-ti týdnech života odstaveny od matky, náhodně rozděleny do 2 skupin.

ApoE-deficientní myši (n=8) byly krmeny po odstavení standardní dietou po dobu 2 týdnů. Ve věku 8 týdnů jim začala být podávána aterogenní dieta (Western type diet) obsahovala 21% tuku (11% nasycených mastných kyselin) a 0,15% cholesterolu po dobu 8 týdnů (kontrolní skupina). Ve Spirulina platensis skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou, ke které bylo přidáváno 20 mg Spirulina platensis denně.

Každá z myší ve skupině krmené Spirulinou byla chována v samostatné kleci. Dostávaly denně 6 g potravy (ve speciálně upravených granulích) a měly volný přístup k vodě po celou dobu studie. Během experimentu nebyly nalezeny změny tělesné hmotnosti v souvislosti se spotřebou potravy.

Na konci experimentu byla zvířata přes noc vylačněna a byla provedena euthanasie předávkováním v parách éteru. Zvířatům byly odebrány ze srdce vzorky krve pro biochemické vyšetření. Dále byly odebrány segmenty tkáně tvořené aortou spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty se ponořily do OCT media (Leica, Praha, Česká republika), následně byly zmraženy v tekutém dusíku a uskladněny při – 80°C.

4.2. Biochemická analýza

Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol v 510 nm, triglyceridy v 540 nm vlnové délky) (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

4.3. Imunohistochemie

Imunohistochemická a stereologická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Vzorky se ponořily do OCT směsi, následně byly zmrazeny v kapalném dusíku a uloženy v ledničče při - 80°C. Na zmrazovacím mikrotomu byly poté nakrájeny série příčných řezů o tloušťce (7 μm) 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°C. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Poté se řezy vložily do 0,3% roztoku peroxidu vodíku v PBS (15 minut), čímž se zablokovala endogenní peroxidázová aktivita. Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné ještě zablokovat nespecifická vazebná místa, proto se řezy na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). 1 hodinu se pak inkubovaly s primární protilátkou při pokojové teplotě. Po oplachu v PBS se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou – goad anti-mouse Ig konjugovaným na peroxidázou označený polymer (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 PBS.

<u>Byly použity následující primární protilátky:</u>

- monoklonální protilátka rabbit anti-mouse eNOS BD Pharmingen (California, USA).

Pracovní postup

EnVision systém

1. sušení tkáňových řezů v termostatu (60min)
2. fixace v acetonu (-20°C; 30min)

3. oschnutí řezů (15min)
4. promytí v PBS (2 x 5 min)
5. aplikace 10% blokujícího zvířecího séra (30 min)
6. aplikace primární protilátky (inkubace 60 min)
7. promytí v PBS (2 x 5 min)
8. promytí v 3% H_2O_2 (15 min)
9. promytí v PBS (2 x 5 min)
10. aplikace sekundární protilátky (inkubace 30 min)
11. promytí v PBS (2 x 5 min)
12. inkubace s roztokem chromogenu (DAB) (doba inkubace různá pro každou protilátku)
13. oplach řezů v acetonu
14. odvodnění řezů (aceton)
15. odvodnění řezů (aceton-xylen 10/1) (3 min)
16. odvodnění řezů (aceton-xylen 1/10) (3 min)
17. odvodnění řezů (xylen) (3 x 2 min)
18. montování řezů do Eukittu

4.4. Kvantitativní analýza imunohistochemie a velikost lézí

Plocha exprese eNOS byla kvantifikovány pomocí stereologických metod [31]. Nejprve se nakrájela série řezů o tloušťce 7 μm (0,385 mm dlouhé úseky cévy tvořící tzv. referenční objem). Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez byl pro každé imunohistochemické barvení vybrán náhodně, a pak se vybral každý pátý řez, takže bylo pro každé barvení použito pět řezů ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 200 průsečíků mezi body sítě a pozitivitou (hnědá barva) na jednu cévu [32]. Odhadovaná plocha exprese se vypočetla podle vzorce:

$$estA = a * P$$

kde parametr a charakterizuje plochu příslušející jednomu testovacímu bodu a P je počet průsečíků mezi body testovací sítě a imunohistochemickým barvením.

Fotodokumentace a digitalizace snímků z mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., USA) a za pomoci softwaru NIS verze 2.3 (Laboratory Imaging Prague, Česká republika).

Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

4.5. Statistická analýza

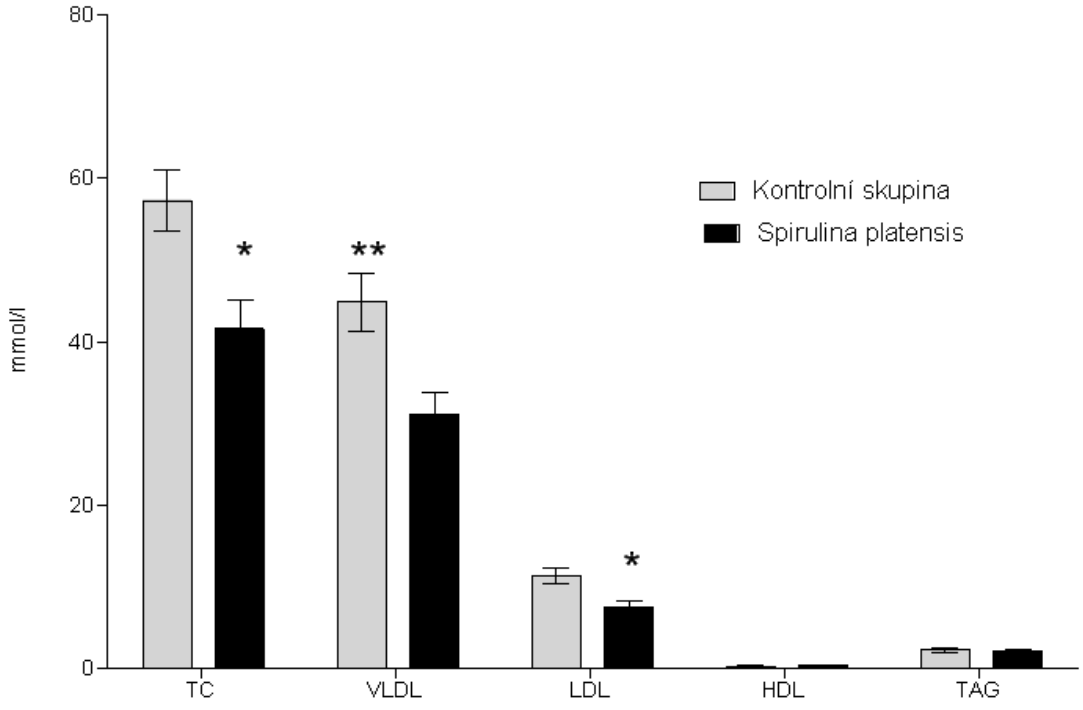
Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u Spirulina platensis a kontrolní skupiny byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$. K výpočtu byl použit GraphPad Prism software (verze 5.0).

5. VÝSLEDKY

5.1. Biochemická analýza

U všech myší v experimentu byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu (TC), jednotlivých lipoproteinů (VLDL, LDL a HDL) a triacylglycerolů. Podávání Spiruliny platensis vedlo k signifikantnímu snížení hladiny celkového cholesterolu i, VLDL a také LDL ve srovnání s kontrolní neléčenou skupinou (viz graf. 1).

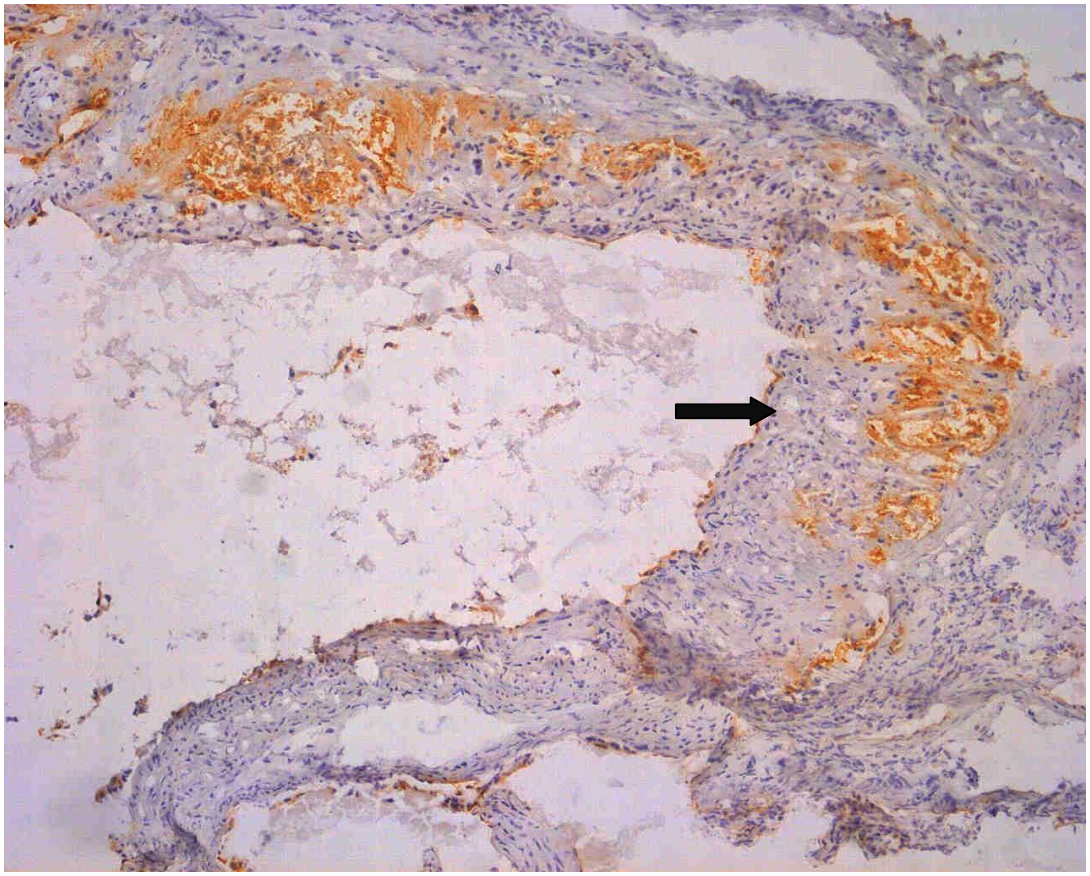
Graf 1 : Lipidový profil u kontrolních a Spirulinou krmených myší. Osmitýdenní podávání Spiruliny statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu, LDL ($^{*}P\leq0,05$) a VLDL cholesterolu ($^{**}P\leq0,01$). Triacylglyceroly byly sníženy bez statistické významnosti.



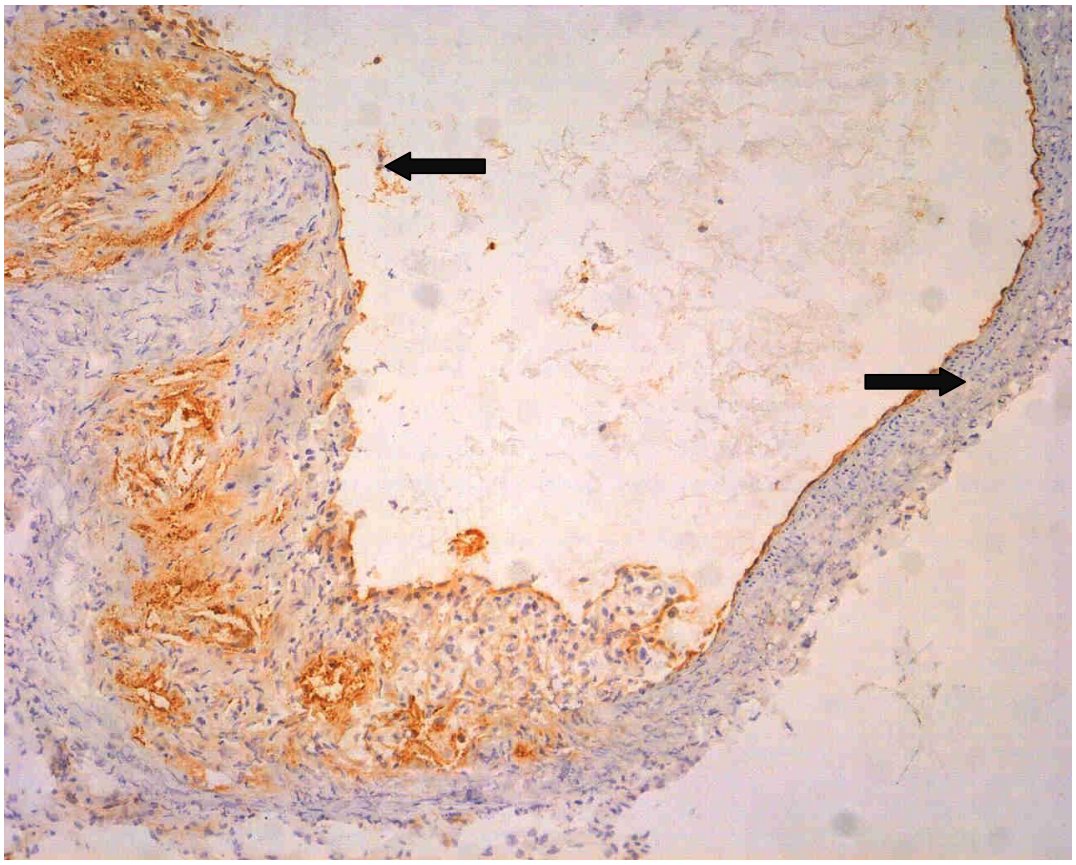
5.2. Imunohistochemické barvení eNOS v oblasti aortálního sinu

Exprese endoteliální NO syntázy byla pozorována u obou skupin zvířat. Silná exprese byla pozorována na cévním endotelu a to jak na povrchu aterosklerotického plátu tak i mimo něj (viz. Obr.9). Dále byla u některých cév pozorována exprese v aterosklerotických plátech, což pokazuje na expresi některými buňkami uvnitř plátu (viz. Obr 10).

Obr. 9 : Imunohistochemické barvení eNOS u kontrolní skupiny zvířat. Silná exprese je pozorována v aterosklerotickém plátu, slabší exprese pak na cévním endotelu (šipka). Zvětšení 100x.



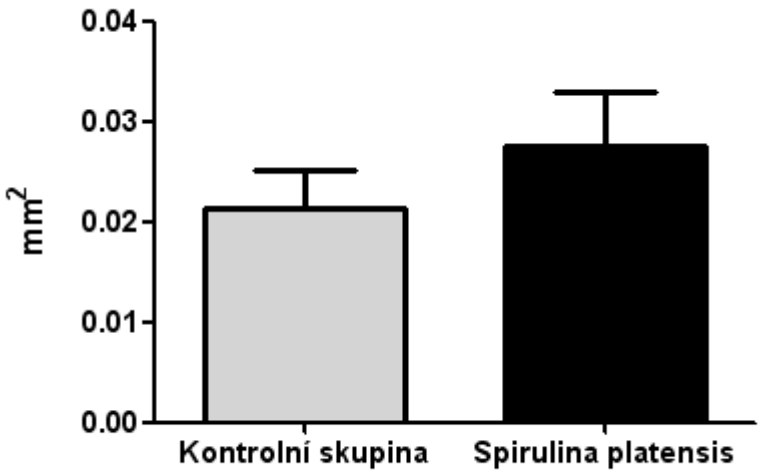
Obr.10 : Imunohistochemické barvení eNOS u skupiny zvířat, kterým byla podávána Spirulina. Silná exprese je pozorována v aterosklerotickém plátu, avšak ve srovnání s kontrolní skupinou je silná exprese pozorována na cévním endotelu na povrchu plátu i mimo něj (šipky). Zvětšení 100x.



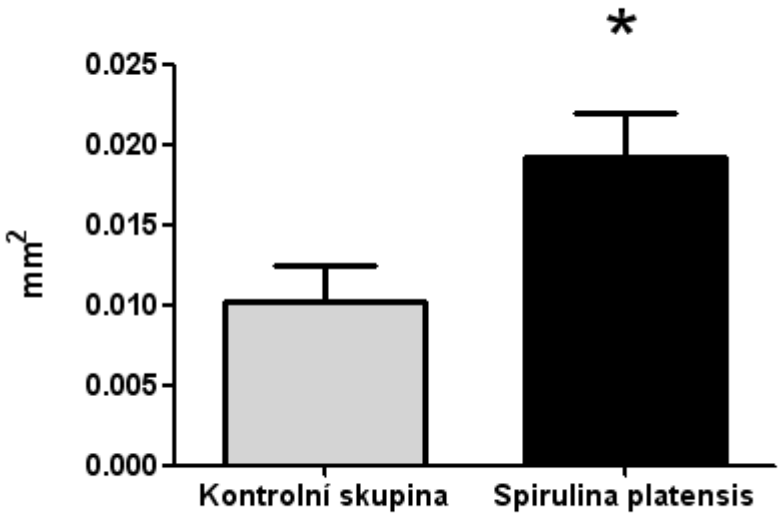
5.3. Stereologická analýza imunohistochemického barvení eNOS.

Stereologická analýza exprese eNOS byla provedena jak v oblasti cévní intimy tak také pouze na cévním endotelu, z toho důvodu abychom selektivně také zachytili expresi endotelem bez ohledu na celkovou expresi v intimě. Stereologická analýza celkové intimální exprese eNOS neprokázala vliv podávání Spiruliny platensis na expresi eNOS (viz graf 3). Na druhé straně ale selektivní analýza exprese cévním endotelem ukázala statisticky významné zvýšení exprese eNOS po podávání Spiruliny platensis ve srovnání s kontrolní skupinou (viz graf 4).

Graf 3 : Stereologická analýza celkové exprese eNOS v cévní intimě. Podávání Spiruliny platensis nevedlo k signifikantnímu ovlivnění exprese eNOS ve srovnání s kontrolní skupinou.



Graf 4 : Stereologická analýza pouze ednoteliální exprese eNOS v cévní stěně. Podávání Spiruliny platensis vedlo k signifikantnímu zvýšení endoteliální exprese eNOS ve srovnání s kontrolní skupinou.



6. DISKUSE

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným onemocněním, které určitým způsobem postihuje všechny věkové skupiny obyvatelstva. Klinické příznaky aterosklerózy, které se ve většině případů objevují, až v pozdějších letech života jsou dnes velmi frekventované a ateroskleróza je v současné době příčinou téměř 50% všech úmrtí. Rozsáhlý výzkum v oblasti aterosklerózy odhalil v posledních letech řadu nových poznatků, které přispívají k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze [12]. V souvislosti se zánětem se intenzivně studuje úloha adhezivních molekul, složek imunitního systému, ale i dalších faktorů modifikujících zánětlivou reakci, které tak obecně participují na rozvoji a vzniku klinických komplikací aterosklerózy. Studium aterogenních změn na morfologické úrovni je dnes často doplňováno používáním různých morfometrických metod, které se snaží detekované aterogenní změny objektivizovat. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze.[33].

Od roku 1986 se vědecké skupiny v různých laboratořích snažily vyvolat aterosklerózu u myší za účelem zavedení nového zvířecího modelu. Myši jsou obvykle vysoce rezistentní vůči ateroskleróze. Při příjmu běžné stravy mají nízkou hladinu celkového cholesterolu a vyšší hladinu protektivního HDL cholesterolu, tudíž se u nich nevyvíjejí aterosklerotické léze. Ovšem pokud jsou myši krmeny stravou s vysokým podílem cholesterolu a tuků, která též obsahuje žlučové kyseliny, hladina jejich celkového cholesterolu roste a po několika měsících se u vybraných kmenů myší začnou tvořit vrstvy pěnových buněk, zejména v subendotelu cév v okolí aortálního sinu [34].

Ačkoli se tento model zprvu vyvíjel slibně, měl dva zásadní problémy. Oproti lidským aterosklerotickým lézím, které se vyskytují ve větvích hlavních cév, kde pláty progredují, myší léze jsou malé a vyskytují se pouze v oblastech aortálního oblouku a nedochází k jejich progresi. Strava, kterou jsou myši krmeny, je nefyziologická, obsahuje 10 – 20x více cholesterolu a žlučových kyselin. Tato strava vyvolá chronický zánět pouze u citlivých kmenů myší, nikoli u kmenů aterosklerotický rezistentních, což zvyšuje možnost dohadu, že genetické rozdíly mezi danými kmeny myší jsou dány spíše rozdíly v reakci na podanou stravu.

V roce 1992 použily dvě laboratoře speciální genovou technologii, která dala vzniknout myším deficientním v apolipoproteinu E (apoE) [35]. ApoE jsou tvořeny primárně v játrech a mají na svém povrchu základní lipoproteinové částice a ligandy pro rozpoznání lipoproteinů a také pro clearance lipoproteinových receptorů. ApoE-deficientní myši mají zpožděné vylučování lipoproteinů a při nízkocholesterolové stravě hladina jejich cholesterolu stoupá – jako důsledek akumulace chylomikronů a VLDL zbytků, obohacených esterifikovaným i volným cholesterolem. U těchto myší se vyvíjejí nejen lipidní proužky, ale také fibromuskulární pláty, typické pro aterosklerózu u lidí. Tyto léze se formují v aortě, v břišní aortě, v hlavních větvích karotid, interkostálních, mesenterických, renálních a iliálních arteriích a také v proximálních částech koronárních, femorálních a podklíčkových arterií. Lipidní proužky se objevují po deseti týdnech, léze obsahující pěnové buňky a hladkosvalové buňky se objevují po patnácti týdnech. Fibromuskulární pláty jsou patrné po dvaceti týdnech, obsahují nekrotické jádro a fibromuskulární čepičku z hladkosvalových buněk obklopených elastickými vlákny a kolagenem. U starších myší se fibromuskulární pláty vyvíjejí, u pokročilých lézí je patrná destrukce buněk medie s příležitostným vývojem aneuryzmat. Rozsáhlá proliferace fibrózní tkáně může zúžit lumen cévy, či dokonce způsobit její úplnou okluzi. Komplikované léze charakterizované trombózou se však nevyskytly [36].

V terapii hyperlipidemií a cévních komplikací (aterosklerózy) jsou dnes asi nejvýznamnějšími léky *statiny*.

Nicméně bylo také prokázáno, že je stále snaha najít nová léčiva, či dietární doplňky, které by přinesly pozitivní vliv na aterogenní proces.

Tato rigorózní práce byla tedy zaměřena na sledování účinků Spiruliny platensis, na aterogenezi u apoE-deficientním myším modelu krmeným aterogenní dietou.

Spirulina je modrozelená řasa patřící mezi spirálovité mikrořasy. Jako potravinový doplněk je připravována na slunečných farmách v Asii. Spirulina je zdrojem přirozených lehce zpracovatelných bílkovin a bohatým přírodním zdrojem zeleného rostlinného barviva chlorofylu. Vedle toho Spirulina obsahuje i velké množství železa v chelátové formě (10 g spiruliny obsahuje stejné množství železa jako 450 g špenátu), vápník, zinek, draslík a hořčík. Z mikroelementů ve Spirulině najdeme selen, chrom, lithium a mangan. Důležitý je i obsah antioxidačně působících látek, prekurzoru vitamínu A - beta-karotenu (10 g Spiruliny jej obsahuje stejně jak o 4,5 litru kravského mléka anebo 14 vajec) a vitamínů skupiny B. Zvláště významná je přítomnost vitamínu

B12, zcela netypická pro rostlinnou říši [19]. Řasa obsahuje přibližně 65 % bílkovin, včetně všech osmi esenciálních aminokyselin, a proto je ideálním doplňkem stravy pro sportovce, vegany, starší a oslabené lidi. Další pro život nezbytnou skupinou, kterou organismus nedokáže syntetizovat jsou polynenasycené mastné kyseliny, jakou například je kyselina gama-linolenová, obsažená i v mateřském mléce a podílející se mimo jiné také na snižování hladiny plazmatického cholesterolu. C-Phycocyanin obsažený v tomto extraktu má podobnou strukturu jako bilirubin a působí jako silný antioxidant metabolických produktů volných radikálů [21] (ROS – reactive oxygen species), ale byly prokázány také jeho hypolipidemické efekty [20].

V této diplomové práci jsme ukázali, že 8 týdenní aplikace Spiruliny apoE-deficientním myším má za následek signifikantní snížení celkového cholesterolu, VLDL a LDL cholesterolu. Tento hypolipidemický účinek byl vysvětlen přítomností právě výše zmiňovaného C-Phycocyaninu. Bylo totiž prokázáno, že tato substance inhibuje absorpci cholesterolu ve střevě, s následným zvýšením exkrece žlučových kyselin [20].

Z hlediska funkce a stavu endotelu jsme se zaměřili na studium endoteliální NO syntázy. Tento enzym je klíčový z hlediska endoteliální produkce oxidu dusnatého [24]. Oxid dusnatý má mnoho pozitivních funkcí ve vztahu k cévnímu endotelu. Má vazodilatační, antiadhezní, antiproliferační účinky. Je produkován právě eNOS, který je sice do jisté míry konstitutivní enzym nicméně jeho exprese je ovlivněna řadou faktorů, které ovlivňuji proces aterogeneze jako např. zvýšená hladina LDL cholesterolu, oxidační stres a další [37]. Snížená exprese eNOS ja také základním markerem rozvoje endoteliální dysfunkce. V této rigorózní práci jsme zjistili, že celková exprese eNOS nebyla podávání Spiruliny platensis ovlivněna. Naproti tomu ale pouze endoteliální exprese byla po podání Spiruliny platensis statisticky významně zvýšena v porovnání s kontrolní neléčenou skupinou. Zvýšená exprese eNOS po podávání léčiv jako např. statinů byla již dříve prokázána a zároveň bylo také ukázáno, že tento efekt je příznivý na chování cévního endotelu [38].

Tato rigorózní práce tedy prokázala pozitivní vliv podávání Spiruliny platensis na parametry lipidového spektra u apoE-deficientních myší. Podávání Spiruliny také vedlo ke zvýšení endoteliální exprese eNOS, což poukazuje na její pozitivní vliv na cévní endotel, který pravděpodobně souvisí s jejími hypolipidemickými vlastnostmi.

7. ZÁVĚR

Tato rigorózní práce se zabývala vlivem Spiruliny platensis na parametry lipidového spektra a expresi eNOS u apoE-deficientního modelu aterosklerózy.

Výsledky ukázaly na pozitivní vliv Spiruliny platensis na hladinu celkového cholesterolu, VLDL, LDL, přičemž triacylglyceroly byly sníženy pouze statisticky nevýznamně.

Stereologická analýza imunohistochemického barvení dále prokázala, že endoteliální exprese eNOS byla po podávání Spiruliny signifikantně zvýšena.

Dosavadní výsledky této pilotní studie se Spirulinou platensis ukazují na její potenciální hypolidemické účinky u apoE-deficientního modelu aterosklerózy. Tento hypolipidemický účinek, zřejmě také vedl ke zvýšení endoteliální exprese eNOS, což lze považovat za pozitivní vliv Spiruliny platensis na endotel u apoE-deficientních myší.

8. ABSTRAKT

Spirulina platensis je modrozelená řasa patřící do cyanobakterií. Řasa je velkým zdrojem lehce zpracovatelných bílkovin, nenasycených mastných kyselin a dalších elementů, např. z makroelementů železo a vápník z mikroelementů chrom, lithium a selen. Dále obsahuje přírodní barviva chlorofyl, phycocyanin. Byly popsány její antioxidační a protizánětlivé účinky.

Tato rigorózní práce se zabývala vlivem Spiruliny Platensis na parametry lipidového spektra a expresi eNOS u apoE-deficientního modelu aterosklerózy.

ApoE deficientní myši (n=8) byly krmeny po odstavení standardní dietou po dobu 2 týdnů. Ve věku 8 týdnů jim začala být podávána aterogenní dieta (Western type diet) obsahovala 21% tuku (11% nasycených mastných kyselin) a 0,15% cholesterolu po dobu 8 týdnů (kontrolní skupina). Ve Spirulina platensis skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou, ke které bylo přidáváno 20 mg Spirulina platensis denně. Byla provedena biochemická analýza lipidního spektra, a dále provedena imunohistochemická a stereologická analýza exprese endoteliální NO syntázy (eNOS).

Výsledky ukázaly na pozitivní vliv Spiruliny platensis na hladinu celkového cholesterolu, VLDL, LDL, přičemž triacylglyceroly byly sníženy pouze statisticky nevýznamně. Stereologická analýza imunohistochemického barvení dále prokázala, že endoteliální exprese eNOS byla po podávání Spiruliny signifikantně zvýšena.

Dosavadní výsledky této pilotní studie se Spirulinou platensis ukazují na její potenciální hypolidemické účinky u apoE-deficientního modelu aterosklerózy. Tento hypolipidemický účinek, zřejmě také vedl ke zvýšení endoteliální exprese eNOS, což lze považovat za pozitivní vliv Spiruliny platensis na endotel u apoE-deficientních myší.

9. ABSTRACT

Spirulina platensis is a blue-green microalga belonging to the cyanobacteria family. Microalga is a large source of proteins and good fatty acid and other nutritional elements, for example iron, calcium, chromium, lithium, selenium. It also contains natural dyes chlorophyll, phycocyanin. Its antioxidant and anti-inflammatory were described.

The aim of this thesis was to determine potencial hypolipidemic effects and potential effects on endothelium of Spirulina platensis in apoE-deficient mice.

ApoE-deficient mice were fed standard diet for 2 weeks. At the age of 8 weeks the control group of animals were fed with the western type diet, which contained 21% fat and 0,15% cholesterol for 8 weeks. The same atherogenic diet was used in Spirulina platensis group, where Spirulina platensis was added to the atherogenic diet at the dosage of 20 mg per day. The biochemical analysis of lipid spectrum was done, area of atherosclerotic lesions was determined and imunohistochemical and stereological analysis of eNOS expression was performed as well.

The results of this thesis showed positive effects of Spirulina platensis on cholesterol levels, VLDL and LDL cholesterol. Moreover stereological analysis of imunohischemical staining revealed that, that endotelial expression eNOS was significantly increased by Spirulina treatment as well.

These results of this pilot study with Spirulina platensis shows its potencial hypolipidemic effects in apoE-deficient mice. Moreover these hypolipidemic effects resulted in a significant increase of eNOS in vessel endothelium suggesting positive effect of Spirulina treatment on vessel endothelium.

10. POUŽITÁ LITERATURA

[1] Hallan S, de Mutsert R, Carlsen S *et al.* Obesity, smoking, and physical inactivity as risk factors for CKD: are men more vulnerable? Am J Kidney Dis 2006; 47:396-405.

[2] Muntner P, He J, Astor BC *et al.* Traditional and nontraditional risk factors predict coronary heart disease in chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities study. J Am Soc Nephrol 2005; 16:529-38.

[3] Coniglio RI, Colombo O, Vasquez L *et al.* [Central obesity: relationship between conicity index and lipoprotein risk factors for coronary atherosclerosis]. Medicina (B Aires) 1997; 57:21-8.

[4] Iacoviello L, Donati MB, de Gaetano G. [Novel risk factors for atherosclerosis. A comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a) and cholesterol as predictors of peripheral arteriopathy]. Ital Heart J Suppl 2001; 2:1031-3.

[5] Pedraza A. [Hyperlipoproteinemia in the production of atherosclerosis. Risk factors: diagnosis and treatment]. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba 1993; 51:21-33.

[6] Catena C, Novello M, Lapenna R *et al.* New risk factors for atherosclerosis in hypertension: focus on the prothrombotic state and lipoprotein(a). J Hypertens 2005; 23:1617-31.

[7] D'Agostino RB, Jr., Hamman RF, Karter AJ *et al.* Cardiovascular disease risk factors predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. Diabetes Care 2004; 27:2234-40.

[8] Mehta JL, Saldeen TG, Rand K. Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 1998; 31:1217-25.

[9] Brasen JH, Niendorf A. [Atherosclerosis. Formal pathogenesis, classification and functional significance]. Pathologe 1997; 18:218-27.

[10] Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. Curr Vasc Pharmacol 2005; 3:63-8.

[11] Dargel R. [Lipoproteins and the etiopathogenesis of atherosclerosis]. Zentralbl Allg Pathol 1989; 135:501-4.

[12] Dansky HM, Barlow CB, Lominska C *et al.* Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21:1662-7.

[13] Keaney JF, Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. Mol Aspects Med 2000; 21:99-166.

[14] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med 1999; 340:115-26.

[15] Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE *et al.* A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15:1512-31.

[16] Soška V. Poruchy metabolismu lipidů. Praha: Grada Publishing; 2001.

[17] Lind L. Lipids and endothelium-dependent vasodilation--a review. Lipids 2002; 37:1-15.

[18] Gudev A. [The role of the oxidative modification of LDL in the pathogenesis of atherosclerosis]. Mol Med (Sofia) 1996; 1:31-8.

[19] Mazo VK, Gmoshinskii IV, Zilova IS. [Microalgae Spirulina in human nutrition]. Vopr Pitan 2004; 73:45-53.

[20] Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H *et al.* A novel protein C-phycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of Spirulina platensis concentrate in rats. J Nutr 2005; 135:2425-30.

[21] Riss J, Decorde K, Sutra T *et al.* Phycobiliprotein C-phycocyanin from Spirulina platensis is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. J Agric Food Chem 2007; 55:7962-7.

[22] Huang ZX, Mei XT, Xu DH *et al.* [Protective effects of polysacchride of Spirulina platensis and Sargassum thunbeergii on vascular of alloxan induced diabetic rats]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2005; 30:211-5.

[23] Cines DB, Pollak ES, Buck CA *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood 1998; 91:3527-61.

[24] Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P *et al.* Protective role of endothelial nitric oxide synthase. J Pathol 2003; 199:8-17.

[25] Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation 2004; 109:III27-32.

[26] Toborek M, Kaiser S. Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. Basic Res Cardiol 1999; 94:295-314.

[27] Vanhoutte PM. [Endothelial dysfunction and atherosclerosis]. Arch Mal Coeur Vaiss 1997; 90 Spec No 6:9-19.

[28] Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ, Hayoz D. Nitric oxide synthase expression in

endothelial cells exposed to mechanical forces. Hypertension 1998; 32:351-5.

[29] Sessa WC. eNOS at a glance. J Cell Sci 2004; 117:2427-9.

[30] Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS *et al.* Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. J Biol Chem 1999; 274:32512-9.

[31] Nachtigal P, Semecky V, Kopecky M *et al.* Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. Pathol Res Pract 2004; 200:219-29.

[32] Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF *et al.* The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. Apmis 1988; 96:857-81.

[33] Mareckova Z, Heller S, Horky K. [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. Vnitr Lek 1999; 45:46-50.

[34] Paigen B, Holmes PA, Mitchell D, Albee D. Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. Atherosclerosis 1987; 64:215-21.

[35] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW *et al.* ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. Arteriosclerosis and Thrombosis 1994; 14:133-40.

[36] Hofker MH, Breuer M. Generation of transgenic mice. Methods Mol Biol 1998; 110:63-78.

[37] Cannon RO, 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. Clin Chem 1998; 44:1809-19.

[38] Auer J, Berent R, Weber T, Eber B. Clinical significance of pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. Curr Med Chem 2002; 9:1831-50.