

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové 2009

Kateřina Hanusová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Sledování vlivu *Spirulina platensis* na proces aterogeneze u myšího modelu aterosklerózy.

Spirulina platensis effects on atherogenesis in mouse model of atherosclerosis.

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Vedoucí katedry: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Hradec Králové 2009

Kateřina Hanusová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem zadanou diplomovou prací vypracovala sama s přispěním vedoucího práce a veškerá použitá literatura a podkladové materiály, použité v této práci, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Dále prohlašuji, že nemám námitek proti půjčování nebo zveřejňování mé diplomové práce nebo jejích částí se souhlasem katedry.

V Hradci Králové 5. 5. 2009

.....

podpis diplomanta

Poděkování

Tímto bych si dovolila poděkovat PharmDr. Petru Nachtigalovi za odborné vedení diplomové práce, konzultace a poskytnuté rady při práci v laboratoři.

Abstrakt

Spirulina platensis je jednobuněčná modrozelená řasa patřící do kmenu Cyanobacteria. *Spirulina* patří mezi potraviny s nejvyšším obsahem proteinů, které obsahují všechny esenciální aminokyseliny. Je zdrojem i některých neesenciálních aminokyselin, významných nutrientů jako kyselina gama linolenová, mnoha vitamínů (B₁, B₂, B₆, B₁₂, biotin atd.) a stopových prvků (např. selen, chrom, železo, vápník). Dále obsahuje přírodní barviva karotenoidy, chlorofyl a phycocyanin.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit potenciální hypolipidemické a protizánětlivé účinky *Spiruliny platensis* na experimentálním zvířecím modelu, kterým byly apoE/LDLr-deficientní myši. K tomu byly sledovány parametry lipidového spektra v krvi a exprese VCAM-1 v cévním endotelu

Myši s deficitem apolipoproteinu E (apoE^{-/-}) a LDL receptoru byly odstaveny a po dobu 2 týdnů krmeny standardní dietou. Ve věku 8 týdnů jim začala být podávána aterogenní dieta s obsahem 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 lipidového spektra, histochemická a imunohistochemická analýza velikosti aterosklerotických plátů a exprese VCAM-1.

Výsledky biochemické analýzy potvrdily hypolipidemický efekt *Spiruliny platensis* pouze u třech z devíti myší. Výsledky histochemické a imunohistochemické analýzy dále potvrdily snížení velikosti aterosklerotických plátů a exprese VCAM-1 u těch myší, kde došlo hypolipidemickému efektu *Spiruliny platensis*.

Výsledky tedy potvrzují hypolipidemické účinky *Spiruliny platensis* a také možné antiaterogenní účinky této substance, které však bude nutné v dalších studiích ještě potvrdit zejména s ohledem na selhání hypolipidemického efektu u dalších šesti myší.

Abstract

Spirulina platensis is a single cell blue-green algae of Cyanobacteria strain. *Spirulina* belongs among foodstuffs with the highest protein content and contains all essential amino-acids. It is also a source of some non essential amino-acids, important nutrients as for example gamma linol acid, a lot of vitamins (B1, B2, B6, biotin, etc.) and trace elements (e.g. selenium, chrome, iron, calcium). Moreover it contains natural pigments carotenoids, chlorophyll and phycocyanin.

The aim of this thesis was to test potential hypolipidemic and anti-inflammatory effects of *Spirulina platensis* on an experimental animal model of apoE/LDLr deficient mice. Therefore the parameters of lipid spectrum in blood and VCAM-1 expressions in arterial endothelium were monitored.

Mice with deficit of apolipoprotein E (apoE^{-/-}) and LDL receptor were weaned of and for two weeks fed with a standard diet. At the age of eight weeks they started to be fed with atherogenic diet containing 0.15% of cholesterol. This continued for eight weeks (control group). In *Spirulina platensis* group the mice were fed with the same atherogenic diet with daily addition of 20 mg of *Spirulina platensis*. Biochemical analysis of lipid spectrum as well as histochemical and immunohistochemical analyses of atherosclerotic plates and VCAM-1 expressions were carried out.

The results of biochemical analysis confirmed hypolipidemic effect of *Spirulina platensis* only in three mice out of nine. The results of histochemical and immunohistochemical analysis further confirmed decrease in size of atherosclerotic plates and VCAM-1 expressions in the mice where hypolipidemic effect of *Spirulina platensis* took place.

The results therefore confirm hypolipidemic effects of *Spirulina platensis* and also possible anti-atherogenic effects of this substance, which will have to be confirmed by other studies especially with regards to the failure of hypolipidemic effect in the other six mice.

SEZNAM ZKRATEK

apoE	apolipoprotein E
ATII	angiotensin II
C57BL/6	druh myšního modelu aterosklerózy
CO	oxid uhelnatý
EDHF	endotelem derivovaný hyperpolarizující faktor
ET-1	endotelin-1
HDL	high density lipoprotein, lipoproteiny o vysoké hustotě
ICAM	intercellular adhesion molecule, adhezní molekula
LDL	low density lipoprotein, lipoproteiny o nízké hustotě
LDLR	jaterní receptor pro LDL
LRP	LDL-related protein
NH ₃	amoniak
NO	oxid dusnatý
NOS	enzym syntáza NO
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PDGF	platelet derived growth factor
PGH ₂	prostaglandin H ₂
PGI ₂	prostacyklin PGI ₂
RAGE	receptors for advanced glycosylation endproducts
ROS	reactive oxygen species
TGF-β	transforming growth factor β
tPA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TXA ₂	tromboxan A ₂
VCAM	vascular cellular adhesion molecule, adhezní molekula
VEGF	vascular endothelial growth factor

OBSAH

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	10
2.1 Mikroskopická anatomie cév	10
2.2 Endoteliální dysfunkce	12
2.2.1 Funkce zdravého endotelu	13
2.3 Ateroskleróza	15
2.3.1 Rizikové faktory	15
2.3.2 Patogeneze aterosklerózy	17
2.3.2.1 Faktory patogeneze aterosklerózy (aterogeneze).....	19
2.4 Adhezní molekuly.....	21
2.4.1 Leukocytární adhezní molekuly	21
2.4.2 VCAM-1 a ICAM-1.....	22
2.5 Myší model aterosklerózy	23
2.5.1 Výhody použití myších modelů aterosklerózy.....	24
2.5.2 Nevýhody použití myších modelů aterosklerózy.....	24
2.5.3 Geneticky modifikované kmeny aterosklerózy.....	24
2.6 Spirulina platensis.....	26
2.6.1 Předpokládané účinky Spiruliny	26
2.6.2 Phycocyanin a allophycocyanin.....	27
3. Cíl práce.....	28
4. Experimentální část	29
4.1 Zvířata a předepsaná dieta	29

4.2	Biochemická analýza	30
4.3	Histologické barvení olejovou červení.....	30
4.4	Imunohistochemie	31
4.5	Statistická analýza	33
5.	Výsledky.....	34
5.1	Biochemická analýza	34
5.2	Histologické barvení olejovou červení.....	35
5.3	Imunohistochemické barvení VCAM-1 v oblasti aortálního sinu	39
6.	Diskuze	43
7.	Závěr.....	46
8.	Použitá literatura	47

1. Úvod

Ateroskleróza je systémové onemocnění a postihuje velké i střední cévy tepenného řečiště. Jedná se o dlouhodobý proces, při kterém se ukládají cholesterol, fibrózní tkáň a některé další komponenty krve do intimy cév, čímž ji ztlušťují. Protože tepny se silnými stěnami nejsou dostatečně pružné a špatně se roztahují, zvyšuje se v nich tlak krve a dochází také k postupnému zužování lumen cév. Současně je to místo vzniku krvácení a tvorby trombů. Tento proces vede ke zpomalení toku krve a orgány nejsou zásobeny tak, jak by měly a dochází k jejich poškození.

Ateroskleróza se rozvíjí zvolna a nenápadně, je to onemocnění, které nebolí. Začíná u každého z nás už v dětství. Rychlost jejího vzniku závisí na řadě rizikových faktorů, které můžeme rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi ovlivnitelné rizikové faktory patří: hyperlipidemie, hypertenze, kouření, diabetes mellitus a hyperhomocysteinemie. Mezi neovlivnitelné rizikové faktory patří: věk, mužské pohlaví a rodinná dispozice.

Ateroskleróza se někdy označuje jako “nemoc 20. století” a netrápí jen naši moderní civilizaci, provází lidstvo už celá tisíciletí. Ateroskleróza je nejčastější příčinou úmrtí ve vyspělých státech v dnešní době a naše republika v této souvislosti drží smutné prvenství.

Cílem této diplomové práce bylo ověřit potenciální antiaterogenní účinky *Spiruliny platensis* na experimentálním myším modelu aterosklerózy.

2. Teoretická část

2.1 Mikroskopická anatomie cév

Ateroskleróza je onemocnění cév, proto je vhodné krátce se zmínit o jejich struktuře. Stěny artérií a vén jsou tvořeny třemi vrstvami (obr. 1) (1):

Tunica intima

- vnitřní vrstva, která je v bezprostředním kontaktu s krevním proudem, je relativně tenká a vyskytuje se ve všech cévách
- strana přivrácená k lumen cévy je vystlána endotelem, který přisedá k subendotelové vrstvě řídkého vaziva a obsahuje buňky hladké svaloviny, intima je tak dostatečně pružná

Tunica media

- cirkulárně uspořádaná střední vrstva, kde převažuje hladká svalovina a elastické složky vazivové tkáně
- tato vrstva je zodpovědná za schopnost kontrakce cév a jejich odolnost vůči krevnímu tlaku

Tunica adventitia

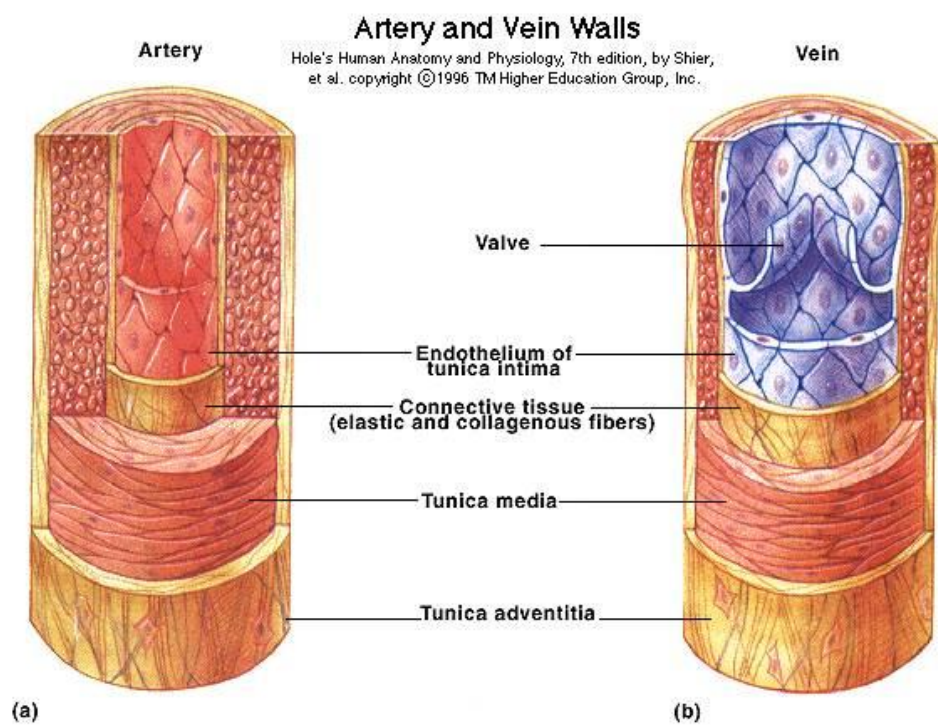
- zevní vazivová vrstva připojující cévy k okolním tkáním, je tvořena kolagenními a elastickými vlákny, v některých cévách je její součástí ještě také hladká svalovina a v těchto případech je tunica adventitia nejtlustší vrstvou cévní stěny
- u větších cév prochází touto vrstvou ještě cévy cév neboli tzv. vasa vasorum, které zásobí tuto vrstvu živinami

- pleteně vazomotorických nervů – jejich podráždění způsobuje vazokonstrikci

Obrázek 1. *Průřez cévou.*

Zdroj:

<http://faculty.stcc.edu/AandP/AP/AP2pages/Units18to20/vessels/blood.htm>

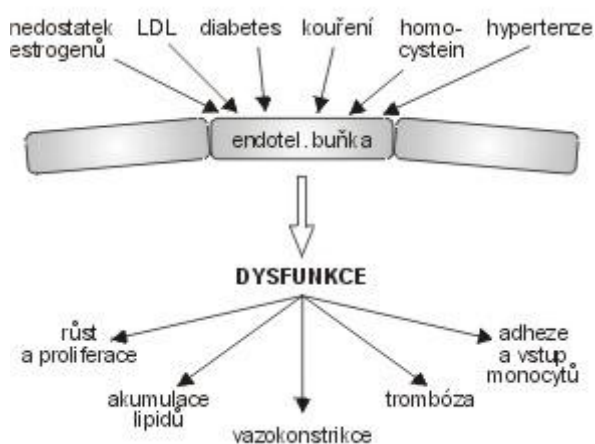


2.2 Endoteliální dysfunkce

Endoteliální dysfunkcí se rozumí lokalizované postižení endotelu, které vede ke zvýšené propustnosti cévní stěny a k nerovnováze mezi vazoaktivními a hemokoagulačními mechanismy (2). Endoteliální dysfunkce je způsobena celou řadou podnětů, mezi něž patří především kouření, hypertenze, diabetes mellitus, hyperlipoproteinemie a hyperhomocysteinemie (obr. 2). Dále se mohou uplatňovat např. vlivy virů, bakterií, toxinů, imunitních komplexů a léčiv. Endoteliální dysfunkce hraje důležitou roli při rozvoji onemocnění cévní soustavy, jako je cévní ateroskleróza, arteriální hypertenze, cévní mozková příhoda nebo srdeční selhání (3).

Obrázek 2.: Příčiny a důsledky endoteliální dysfunkce.

Zdroj: www.zdravcentra.cz/cps/rde/xchg/zc/xsl/3141_6764.html#113



2.2.1 Funkce zdravého endotelu

Endotel je jednovrstevná výstelka tvořená endoteliálními buňkami, které mají řadu regulačních funkcí.

Zásadním způsobem je endotel zodpovědný za cévní tonus – podílí se na vazoregulaci systémem protikladně působících látek: oxidu dusnatého - NO, z endotelu odvozeného hyperpolarizujícího faktoru – EDHF, prostacyklinu – PGI₂, endotelinu 1 – ET1, angiotenzinu II – ATII a tromboxanu – TXA₂. Ovlivňuje i fibrinolýzu pomocí tkáňového aktivátoru plazminogenu – tPA a inhibitoru aktivátoru plazminogenu – PAI-1. Zasahuje též do zánětlivé reakce přes selektiny P a E, adhezní molekuly – vascular cellular adhesion molecules, tj. VCAM a intercellular adhesion molecules – ICAM. Permeabilita endotelu je ovlivňována receptory glykosylovaných konečných produktů (systém RAGE = receptors for advanced glycosylation endproducts). Angioneogeneze řízená endotelem je zprostředkována růstovými faktory VEGF, PDGF a TGF- β (4).

Nepoškozené endoteliální buňky jsou stimulovány hormony, neurotransmitery, působky odvozenými z destiček a koagulačního systému. To vede k uvolňování relaxačně působících substancí, stejně tak působí i samotný tok krve. Nejdůležitějším vazodilatačně působícím činitelem je oxid dusnatý NO. Jeho prekurzorem je L-arginin, který se na oxid dusný přeměňuje pomocí enzymu – syntázy NO (NOS). Jeho tvorba je závislá na množství prekurzoru a dostatečné aktivitě enzymu. Některé látky, vyskytující se za patologických situací v organismu, mohou vést k inhibici aktivity tohoto klíčového enzymu (např. u nemocných s diabetem mellitem, hypercholesterolémií). Hlavní funkcí NO je tedy vazodilatace, inhibice adheze a agregace destiček, zamezení proliferativních procesů v cévní stěně protizánětlivým působením (5).

Kromě NO, působí relaxačně i prostacyklin PGI₂, který se uvolňuje vlivem hypoxie, zvýšeným průtokem a řadou působků. Synergicky s těmito relaxačními činiteli působí i hyperpolarizující endoteliální faktor (6).

Nejdůležitějšími kontrakčně působícími činiteli jsou: endotelin-1 ET-1 působící konstričně, čímž může vést k ischemii a arytmiím. Má i prozánětlivé a

promitogenní vlastnosti. Tromboxan A_2 TXA_2 a prostaglandin H_2 PGH_2 , kteří aktivují tromboxanové receptory destiček a hladké svaloviny cévní, čímž působí antagonisticky vůči NO. A angiotensin II ATII, který aktivuje angiotensinové receptory. Ty pak stimulují tvorbu ET-1 a dalších mediátorů, např. inhibitoru aktivátoru plazminogenu (7).

V prevenci trombózy se endotel uplatňuje:

- tvorbou NO (inhibicí adheze a agregace krevních destiček), obdobně působí i prostacyklin
- uvolňování tkáňového aktivátoru plazminogenu z endotelu (opačně působí angiotensin II, a to potenciací tvorby inhibitoru plazminogenového aktivátoru)

2.3 Ateroskleróza

2.3.1 Rizikové faktory

Kardiovaskulární onemocnění jsou hlavní příčinou úmrtí ve vyspělých průmyslových státech. Úmrtnost na tato onemocnění je v České republice jedna z nejvyšších v celé Evropě. Vyšší výskyt srdečně cévních onemocnění je spojen s charakteristikami, které lze označit jako rizikové faktory. Dají se dělit z mnoha různých hledisek, ale výhodné je jejich dělení na ovlivnitelné a neovlivnitelné.

Vyskytuje-li se u někoho více rizikových faktorů současně, jejich účinek se nesčítá, ale násobí.

Neovlivnitelné rizikové faktory

Neovlivnitelné rizikové faktory jsou takové, se kterými se jedinec už narodí nebo k nim v průběhu života dospěje, aniž bychom je mohli nějakým způsobem ovlivnit (8). Patří sem:

Věk: Rizikový je věk u mužů od 45 let, u žen od 55 let a tato hranice se snižuje u žen s předčasným klimakteriem a neužívající hormonální léky.

Pohlaví: Jednoznačně je prokázáno, že muži jsou více ohroženi rizikem aterosklerózy než ženy před menopauzou. Riziko žen po menopauze se však výrazně zvyšuje. Tato skutečnost se vysvětluje ochranným vlivem ženských pohlavních hormonů zejména estrogenů.

Rodinná zátěž: Jako pozitivní rodinná zátěž se považuje výskyt onemocnění nebo úmrtí na ischemickou chorobu srdeční u rodičů nebo sourozenců do 55 let u mužů a do 65 let u žen.

Ovlivnitelné rizikové faktory

Ovlivnitelných rizikových faktorů je mnoho. Jde o faktory, které lze eliminovat úplně, nebo jejich negativní působení vhodnou životosprávou nebo farmakologickou léčbou výrazně snížit. (9) Patří sem:

Hyperlipoproteinemie: Zvýšená koncentrace LDL-cholesterolu, celkového cholesterolu a triglyceridů. Pokud je jejich zvýšená hladina vrozená, o to více je nutné dbát na dodržování správné životosprávy. V dalších případech je nezbytné dosáhnout žádoucích hodnot nejen vhodným dietním režimem s omezením celkového množství tuků, zejména živočišných, pohybovou aktivitou a v situacích, kdy tato opatření nestačí, je nutno přistoupit k farmakologické léčbě.

Snížená hladina HDL-cholesterolu: Jeho vysoká hladina funguje jako ochrana proti vzniku aterosklerózy.

Kouření: Je jedním z nejrozšířenějších rizikových faktorů. Mechanismem účinku kouření je endoteliální dysfunkce, rozvoj dyslipidemie (nízký HDL, vysoký LDL), hemodynamický stres (tachykardie, přechodný vzestup krevního tlaku), zvýšení koagulační pohotovosti, vyšší arytmogenní pohotovost a relativní hypoxie (9).

Hypertenze: Patří mezi hlavní rizikové faktory rozvoje aterosklerózy. Dostatečně účinná léčba vysokého krevního tlaku snižuje riziko kardiovaskulárních příhod bez ohledu na věk (8).

Diabetes mellitus: Při tomto onemocnění se ateroskleróza objevuje dříve a má závažnější průběh, díky dalším komplikacím souvisejícím s diabetem. Proto je nutné co nejdříve objevit pacienty s diabetem a co nejúčinněji je léčit, aby se komplikace podařilo co nejvíce oddálit či zcela zamezit jejich vzniku (10).

Nadváha a obezita: Pro srdce znamená práci navíc. S obezitou je spojený vysoký krevní tlak, zvýšená hladina cholesterolu a triglyceridů v krvi. Se stoupající hmotností stoupá riziko výskytu závažných onemocnění cév a srdce (11).

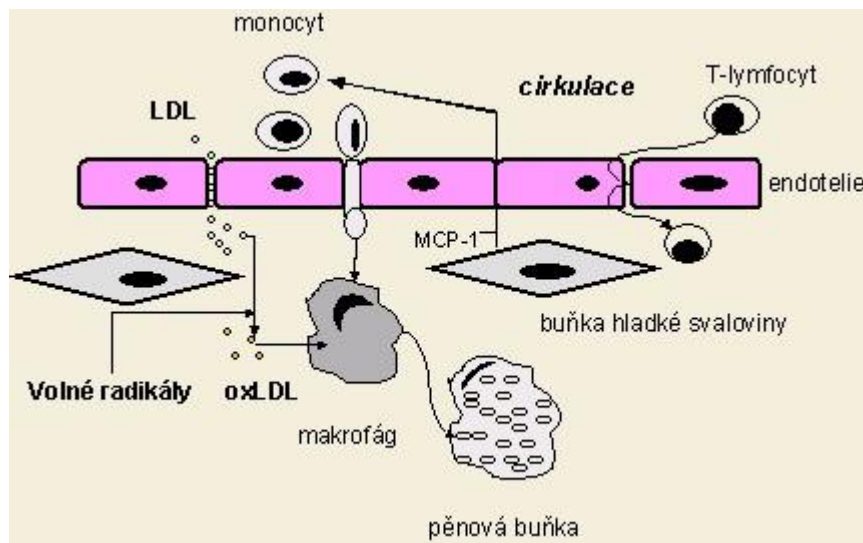
Nízká fyzická aktivita: Studie prokázaly, že pravidelná fyzická aktivita snižuje riziko vzniku ischemické choroby srdeční, kardiovaskulární i celkové mortality mužů i žen. Pohyb ale musí být součástí celkové sekundární prevence.

2.3.2 Patogeneze aterosklerózy

Ateroskleróza je zánětlivé systémové onemocnění postihující zejména velké a střední cévy. Na její patogenезi se podílí komplex po sobě jdoucích situací, zahrnující vznik a rozvoj chronického zánětlivého procesu stěny artérií jako odpověď na hemodynamické poškozování cévní stěny v nejvíce namáhaných místech a její příčina nebyla odstraněna (12).

Dochází k poškození cévního endotelu s tvorbou cytokinů, adhezních molekul, růstových faktorů. Tyto buňky přitahují monocyty (které se následně transformují v makrofágy) a T-lymfocyty z krevní cirkulace a buňky hladké svaloviny cév do místa poškození (13)

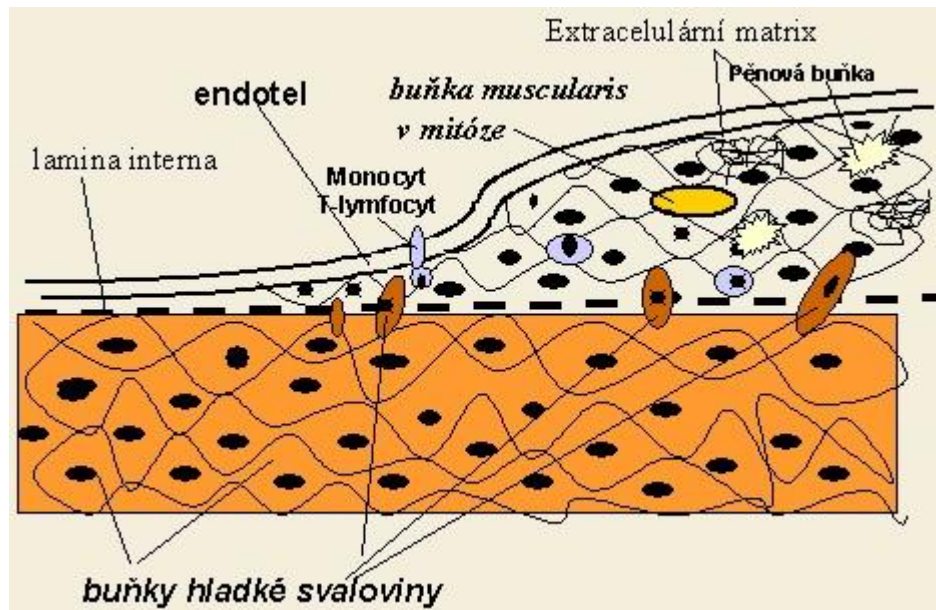
Obrázek 3.: Schéma počáteční fáze endoteliální dysfunkce (14)



Subendotelový prostor se postupně zvětšuje. Současně se zvyšuje permeabilita endotelu, což usnadňuje prostupování lipoproteinových částic. Dochází zde k lipoperoxidaci působením reaktivních forem kyslíku a dusíku.

Makrofágy pohlcují uvolněný cholesterol za vzniku pěnových buněk. Stěna cévy se v místě poškození postupně ztlušťuje a získává prokoagulační vlastnosti. Celý proces vyúsťuje do tvorby ateromového plátu (ateromu) (15).

Obrázek 4.: Schéma ztlušťování stěny artérie v průběhu aterogeneze (14).



2.3.2.1 Faktory patogeneze aterosklerózy (aterogeneze)

LDL-částice. - mohou být modifikovány oxidací, glykací, agregací, asociací s proteoglykany a jsou hlavní příčinou poškození stěny artérií. Jestliže tyto částice proniknou do subendotelového prostoru intimy, podléhají zde k lipoperoxidaci a uvolněný cholesterol je pohlcován makrofágy, vytvářejí se pěnové buňky. Odstranění oxidovaných LDL-částic v počáteční části má ochranný účinek a minimalizuje škodlivý účinek na endotel cévní stěny a hladkou svalovinu.

Homocystein - jeho zvýšená koncentrace v plazmě způsobuje poškození endotelu, ovlivňuje tloušťku intimy a medie arterií, pružnost stěny arterií a protrombotický účinek. Podáváním folátu, vitamínu B₁₂ a B₆ můžeme hladinu homocysteinu normalizovat (8).

Diabetes mellitus - hyperglykemie přispívá ke vzniku oxidačního stresu a tím i tedy k dysfunkci endotelu. Hyperglykemie podporuje také adhezi leukocytů k endotelu zvýšením exprese VCAM-1 a dalších adhezních molekul na povrchu buněk. Také navozuje aktivaci hladké svaloviny cév, což vede ke zvýšení tonu stěny artérií, k růstu buněk hladké svaloviny a tím ke ztluštění intimy (16).

Hypertenze. - angiotensin II (způsobuje hypertenzi) přispívá k rozvoji aterogeneze stimulací proliferace buněk cévní hladké svaloviny. Váže se na specifický receptor (AT-1) a to má za následek uvolnění reaktivních forem kyslíku a dusíku v buňkách cévní stěny, způsobuje oxidační stres (17).

Infekce - stále více se ozývají hlasy odborníků na podezření na zánětlivou etiologii aterosklerózy. Nejvíce podezřelé mikroorganismy jsou *Chlamydia pneumoniae*, cytomegalovirus a *Helicobacter pylori* (18).

Zánětlivá reakce - je ji možno definovat jako reakci cévami prostoupené tkáně na lokální poškození. Slouží ke zničení, rozpuštění nebo ohraničení škodliviny, ale také k rekonstrukci a náhradě zničené tkáně. Na rozvoji zánětu se podílí endotel, trombocyty, leukocyty, koagulační systém a komplement a všechny prozánětlivé mediátory (19).

Kouření cigaret – cigaretový kouř obsahuje kromě známých kancerogenních látek také řadu toxických látek jako např. CO, NH₃, akrolein, aceton, nikotin, benzpyreny, atd. Některé z těchto látek modulují funkci imunokompetentních buněk.

2.4 Adhezní molekuly

Jde o molekuly umístěné na buněčném povrchu, které umožňují, aby buňky přilnuly jednak navzájem a jednak k mezibuněčné hmotě. Umožňují komunikaci buněk navzájem i s okolním prostředím a regulují řadu buněčných funkcí, včetně proliferace, exprese genů, diferenciaci, apoptózy a migrace. Mají obvykle větvenou strukturu s náboji, které se při vzájemné reakci s jinými buňkami, molekulami přitahují. Exprimují se např. na leukocytech, lymfocytech, aktivovaných endoteliích. Jejich zvýšená exprese na buněčném povrchu je součástí aktivace příslušných buněk a je stimulována některými cytokiny (20).

2.4.1 Leukocytární adhezní molekuly

Tyto buněčné adhezní molekuly se účastní každé fáze vývoje aterosklerotických lézí. Přilnavost krevních monocytů a lymfocytů je jedním z prvních zaznamenaných projevů nástupu aterosklerózy, jak u lidí, tak i u modelových zvířat. Monocyty přecházejí do intimy cév a transformují se v makrofágy, ty pohlcují lipidy a stávají se pěnovými buňkami. Jelikož se rané tukové pláty skládají téměř výhradně z makrofágních pěnových buněk, přecházení monocytů do intimy je považováno za rozhodující pro tvorbu lézí. Dochází-li k tomuto procesu na okraji léze, může to vést k šíření lézí (21).

Uvnitř lézí ovlivňují leukocyty organizaci buněk a vytvářejí růstové faktory, které podporují migraci buněk hladké svaloviny do intimy a stimulují jejich dělení a proliferaci. Leukocyty, zejména však makrofágy jsou též schopny tvořit enzymy, tzv. matrix metaloproteinázy, které mohou přispět k přetváření a destabilizaci pokročilých lézí (22).

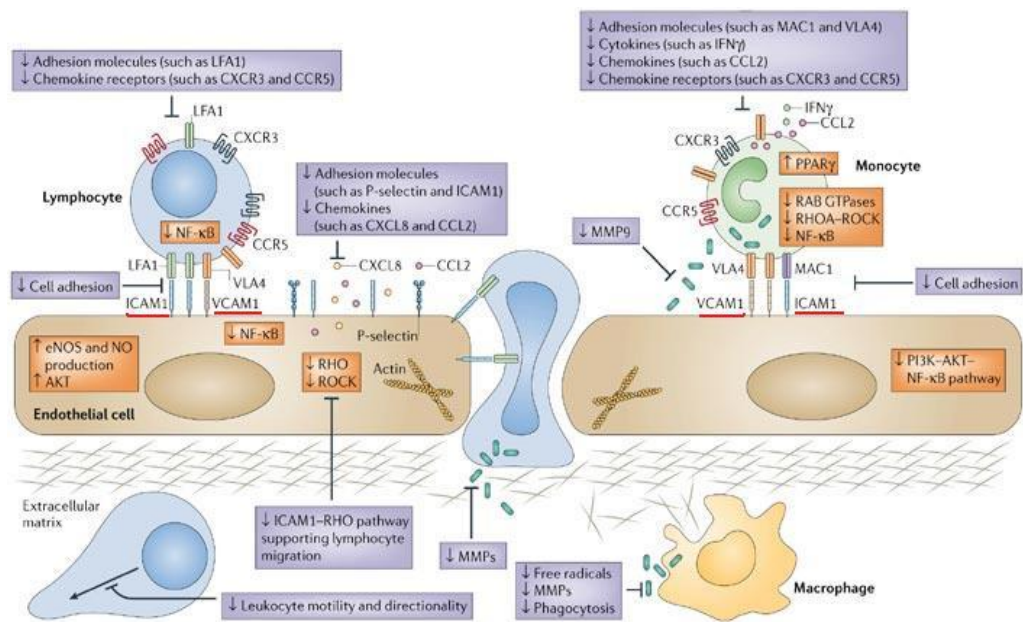
U živočišných druhů (od holuba až po člověka) se transmigrace leukocytů a formování aterosklerózy objevuje na specifických místech cévního systému, zejména v oblastech odstupů cév, malých zaoblení cév (aortální oblouk). V aterosklerotických lézích se vyskytují zejména makrofágy, T-lymfocyty, naopak v její patogenezi zřejmě nehrají roli neutrofilů.

2.4.2 VCAM-1 a ICAM-1

VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule) a ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) jsou strukturálně i funkčně podobné adhezni molekuly. Oba jsou transmembránové glykoproteiny a patří do imunoglobulinové superrodiny (Ig). Řetězce jsou ukotveny v membráně, extracelulární část je složena z různého počtu imunoglobulinových domén. VCAM-1 má sedm mimobuněčných Ig podobných domén, zatímco ICAM-1 jich má pět (23).

Oba mohou stabilizovat přilnavost leukocytů k endotelu a účastnit se diapedézy. Mimo účinků na cévní endotel mohou být obě molekuly tvořeny jinými typy buněk, včetně buněk cévního hladkého svalstva a makrofágů (24).

Obrázek 5.: *Expresse adhezních molekul na buňkách endotelu.*



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Immunology

Zdroj: http://www.nature.com/nri/journal/v6/n5/fig_tab/nri1839_F3.html

2.5 Myší model aterosklerózy

Hlodavci a tedy také myši jsou obecně vysoce odolné vůči ateroskleróze. Nejvíce náchylným kmenem k rozvoji aterogenních změn je kmen C57BL/6. Přesto i v případech, kdy jsou krmeny stravou bohatou na cholesterol, se jejich cévní léze malé, liší od lidských histologickými vlastnostmi a umístěním, a jsou spíše následkem chronického zánětu než genetické predispozice (25).

Speciální strava obsahující 30% tuku, 5% cholesterolu a 2% cholové kyseliny, vedla k ateroskleróze i u myší C57BL/6. Byla to však toxická strava, při které myši ztrácely hmotnost a často onemocněly patologickými respiračními chorobami. Proto byla upravena tak, že byla vydělena třemi, tedy: 10% tuku, 1,25% cholesterolu a 0,5% cholové kyseliny.

I když byl tento model široce užívaný, měl také mnohé nevýhody. Léze u myší 4 až 5 měsíců starých jsou velmi malé, vyskytují se pouze v ústí aorty a obvykle se nerozvinou dále, než do rané fáze pěnových buněk a tukových plátů.

Byly vyvinuty metodiky, které jsou široce používány k posuzování aterosklerózy u myší. Nejvíce se hodnotí tzv. oblast kořene aorty neboli aortální sinus. Tyto řezy jsou dobarvovány nejčastěji olejovou červení ke zvýraznění lipidů a velikost lézí se pak může kvantitativně hodnotit (26).

Po mnoho let se myši jako experimentální model nepoužívaly, protože se věřilo, že nemohou přežít na aterogenní stravě bohaté na tuky, že se léze nedají reprodukovat, že se u většiny myší léze nerozvinou, a že jejich patologie nepřipomíná aterosklerózu u lidí.

Existuje několik významných rozdílů z hlediska srovnání myší a lidské aterogeneze. Průměrná délka života myši je přibližně 2 roky v porovnání se 75 lety u člověka. Myši mají daleko menší hmotnost (30g u dospělého jedince). Také profil lipidů myší je značně odlišný od lidského, kde je 75% cholesterolu plazmy přenášeno LDL, kdežto u myší je většina jejich cholesterolu přenášena HDL (lipoproteinem o vysoké hustotě). Je o něm známo, že u lidí chrání před aterosklerózou. To znamená, že pokud jsou myši krmeny běžnou stravou

s nízkým obsahem tuků, aterosklerózu nedostanou, zatímco u lidí je tato choroba častá.

Jeden rozdíl, který je výhodou všech zvířecích modelů, je to, že jsme schopni zcela ovládat prostředí a stravu při bádání na myších, což není možné při dlouhodobých výzkumech na lidech. U myší je možno provádět mnoho dalších genetických experimentů zahrnující i množení a genetické inženýrství (27).

2.5.1 Výhody použití myších modelů aterosklerózy

Použití myší pro experimentální výzkum aterosklerózy má mnoho výhod zahrnující jejich snadnou dostupnost, hospodárnost a nenáročnou péči. Čas jejich generační výměny je krátký, kolem 9 týdnů (3 týdny těhotenství a 6 týdnů k dosažení pohlavní zralosti). Je jednoduché chovat velké množství myší a ateroskleróza se u nich vyvine během krátkého časového rámce (26).

2.5.2 Nevýhody použití myších modelů aterosklerózy

Hlavní nevýhodou modelování na myších je jejich malá velikost, což činí chirurgické manipulace a zobrazování in vivo obtížnými, ale nikoli nemožnými. Ale nedávný pokrok v těchto technikách umožnil překonat mnohá z omezení v oblasti velikosti, jako například provádět zobrazování abdominálních aterosklerotických lézí u živých myší, srdeční katetrizace k určení kardiovaskulární činnosti u volně se pohybujících myší a chirurgické podvázání koronárních artérií, které vede k myokardiální ischemii.

2.5.3 Geneticky modifikované kmeny aterosklerózy

V roce 1992 vytvořily 2 na sobě nezávislé skupiny kmen apolipoprotein E – deficientních myší (apoE^{-/-}) (28).

Apolipoprotein E (apoE) se vyskytuje na povrchu některých lipoproteinů, zejména chylomikronů, VLDL a HDL. Je velmi důležitý pro

interakci těchto lipoproteinů s jaterním receptorem pro LDL (LDLR) a také s tzv. „LDL-related proteinem (LRP)“. Kromě toho apoE ovlivňuje také lipoproteinovou lipázu, může stimulovat produkci VLDL játry a je zcela zásadní pro eflux cholesterolu do HDL z různých buněk a tkání včetně cév (29, 30). Dále je apoE aktivně sekretován makrofágy a tak inhibuje přeměnu makrofágů na pěnové buňky. Deficit apoE pak vede k poruše clearance chylomikronů vznikajících ve střevě, VLDL vznikajících v játrech a IDL (31). Myši s tímto deficitem mají tedy podobný lipidový profil jako lidé s hyperlipoproteinémií III typu dle Fredricksonovy klasifikace. Vznik aterosklerózy u apoE^{-/-} myší je tedy patogeneticky dán díky spontánnímu nárůstu hladin cholesterolu především ve VLDL frakci (32). Navíc je výrazně limitován eflux cholesterolu z intimy cév, což nakonec vede k rozvoji aterosklerotických plátů u těchto myší (33). Tyto myši jsou v současnosti asi nejpoužívanějším myším modelem aterosklerózy a zároveň i základem pro další genetické modifikace, zejména pro podobnost typů a výskytu aterosklerózy, jako je tomu u lidí (34).

Modelem, který jsme použili v této diplomové práci, byl kmen s dvojitým deficitem, a to apolipoproteinu E a LDL receptoru (apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}). Tento model byl vyvinut v roce 1994 a byl původně použit pro studium clearance lipoproteinů a pro studium receptorů pro jednotlivé lipoproteiny u myší (35). U tohoto modelu dochází opět ke spontánní hypercholesterolémii, která je ovšem vyšší, než u apoE^{-/-} myší a LDLR^{-/-} myší. Zároveň také dynamika rozvoje aterosklerózy je rychlejší, než u výše zmíněných kmenů (36). Z tohoto důvodu byl tento model deklarován jako velmi vhodný pro studium vlivu různých substancí na proces aterogeneze (37-39). My jsme u tohoto modelu popsali výrazné hypolipidemické a protizánětlivé účinky, které jsou poměrně vzácné ve studiích statinů u myších modelů aterosklerózy (40).

2.6 Spirulina platensis

Spirulina platensis je modrozelená jednobuněčná řasa, která patří do kmenu Cyanobacteria. Svůj název dostala díky svému spirálovitému tvaru viditelnému pod mikroskopem. Roste v teplých a hlavně neznečištěných jezerech. Používá se jako funkční potravina pro lidi díky vysoké koncentraci proteinů a dalších výživných látek (41).

Obrázek 6.: *Spirulina platensis*.

Zdroj: <http://www.algacsoda.com/thealgae.html>



2.6.1 Předpokládané účinky Spiruliny

Stopový prvek selen (Se) je nezbytný jak pro lidi, tak i pro zvířata. Nedostatek selenu ve stravě může zapříčinit nemoci, jako jsou kardiovaskulární choroby, rakovinu, revmatickou artritidu a anémii (42).

Selen se v potravinách vyskytuje v organické formě a vázaný na proteiny. Organické sloučeniny selenu jako potravinové doplňky jsou obecně považovány za lepší a bezpečnější než anorganické, proto byly vyvinuty a na trh uvedeny potraviny obohacené o selen. Jako ekonomicky výhodný zdroj organických forem selenu se stala *Spirulina platensis* pěstovaná v médiu

obohaceném selenem. Přestavuje tak slibný zdroj pro komerční velkovýrobu organického selenu ve srovnání s jinými rostlinami.

2.6.2 Phycocyanin a allophycocyanin

Jsou to modré, ve vodě rozpustné fotosyntetické pigmenty odvozené od modrozelených řas, jako je *Spirulina*. Byly používány jako přírodní potravinová barviva, barviva pro kosmetiku a také jako léčiva (43).

Bylo prokázáno, že proteinový extrakt ze *Spiruliny platensis* je účinný „pohlcovač“ volných radikálů (hydroxylové a peroxidové) a potlačuje mikrozomální lipidovou peroxidaci.

Zvýšení obsahu phycocyaninu souvisí se zvýšením antioxidační aktivity, a proto phycobiliprotein phycocyanin je složka nejvíce zodpovědná za antioxidační aktivitu (44).

Phycocyanin je silným antioxidantem a také přírodní protizánětlivá sloučenina. Její chemická struktura je podobná bilirubinu a funguje jako účinný „pohlcovač“ metabolických produktů volných radikálů (reactive oxygen species ROS) v různých in vitro a in vivo experimentálních modelech (44).

3. Cíl práce

Cílem této diplomové práce bylo ověřit potenciální hypolipidemické a protizánětlivé účinky *Spiruliny platensis* na experimentálním zvířecím modelu, kterým byly apoE/LDLr-deficientní myši. K tomu byly sledovány parametry lipidového spektra v krvi a exprese VCAM-1 v cévním endotelu. K hodnocení morfologických nálezů byly použity imunohistochemické metody.

4. Experimentální část

4.1 Zvířata a předepsaná dieta

Samice myši kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E (apoE^{-/-}) a LDL receptoru, vážící 15-20 gramů, byly získány Jackson Laboratories (USA) a ustájeny v SEMEDu (Praha, Česká Republika). Všechny myši byly v 6ti týdnech života odstaveny od matky, ponechány dále 2 týdny na standardní dietě a poté náhodně rozděleny do 2 skupin.

Ve věku 8 týdnů jim začala být podávána aterogenní dieta s obsahem 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 6g 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 zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při – 80°C.

4.2 Biochemická analýza

Biochemická analýza vzorků krve byla provedena na Klinice gerontologické a metabolické Fakultní nemocnice Hradec Králové. Celkové koncentrace cholesterolu byly hodnoceny enzymaticky na základě konvenčních diagnostických metod (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometrické analýzy (cholesterol při 510 nm, triglyceridy při 540 nm vlnové délky). (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

4.3 Histologické barvení olejovou červení

Barvení olejovou červení se používá k detekci lipidů ve tkáních. Zde byla tato metodika použita pro stanovení množství lipidů v aterosklerotických lézích.

Postup barvení olejovou červení:

Barvení Oil Red O:

- | | | |
|----|--------------------------|-------------------|
| 1) | Oil Red O | 15 minut (králík) |
| 2) | pramenitá voda | oplach |
| 3) | Gill hematoxylin | asi 5 sekund, RT |
| 4) | pramenitá voda | modrání 1 minuta |
| 5) | montování nevodné medium | |

Zásobní roztok Oil Red O se připraví rozpuštěním 0,5 g Oil Red O ve 100 ml isopropanolu. Pracovní roztok se připravuje v čas potřeby z 60 ml zásobního roztoku smíchaného se 40 ml destilované vody a filtruje se přes papírový filtr.

4.4 Imunohistochemie

Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a v části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm na zmrazovacím mikrotomu. Řezy byly přeneseny na sklíčka, která byla předem upravena v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout (60 minut) a pak se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v -20°C . Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Poté se řezy po patnáctiminutovém usušení vložily na 10 minut do destilované vody, následně se vložily do roztoku PBS (2x5 minut). 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). V další fázi byly na sklíčka napipetovány roztoky anti-avidinu a anti-biotinu, které byly použity k zablokování reaktivity těchto látek v myší tkáni. Sklíčka se pak 1 hodinu inkubovala s primární protilátkou při pokojové teplotě. Poté se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut), dále do roztoku 3% H_2O_2 (15 minut). Po oplachu v PBS (2x5 minut) se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou (30 minut) – goat anti-rat IgG (Vector Laboratories), které byly značeny biotinem a opět se řezy vložily do roztoku PBS (2x5 minut). Dále byl na sklíčka nanesen avidin-biotinový komplex obsahující peroxidázový substrát (Vector Laboratories). K vizualizaci navázaných protilátek se použil diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty ve vodě a poté odvodněny v acetonu, aceton – xylenu (10:1) asi 3 minuty, aceton – xylenu (1:10) také 3 minuty, 3x v xylenu (po 2 minutách). Na závěr byla sklíčka zamontována do eukittu.

Byla použita následující primární protilátka:

monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD106 (VCAM-1) – zředění 1/100

Pracovní postup:

nechat uschnout řezy	60 minut
Fixace aceton (uschovaný v-20°C)	15 minut
Usušit	15 minut
PBS	10 minut
10% zvířecí sérum v PBS (900 µl PBS + 100 µl séra)	30 minut
inkubace s avidinem D	15 minut
Oplach v PBS	5 minut
inkubace s biotinem	15 minut
PBS	Oplach
primární protilátka (ředí se v BSA)	60 minut
PBS 1	2x5 minut
10% zvířecí sérum v PBS (900 µl PBS + 100 µl séra)	15 minut
sekundární protilátka (+ mouse sérum v PBS)	30 minut
PBS 3	5 minut
3% H ₂ O ₂ (8 ml H ₂ O ₂ + 70 ml H ₂ O)	15 minut
PBS 4	2x5 minut
ABC komplex elite	30 minut
PBS 5	5 minut

DAB (podle návodu)	nutno určit čas
destilovaná voda	Oplach
Aceton	Oplach
Aceton – xylen (10:1)	3 minuty
Aceton – xylen (1:10)	3 minuty
3x xylen	2 minuty
Eukitt – montování krycího sklíčka	

4.5 Statistická analýza

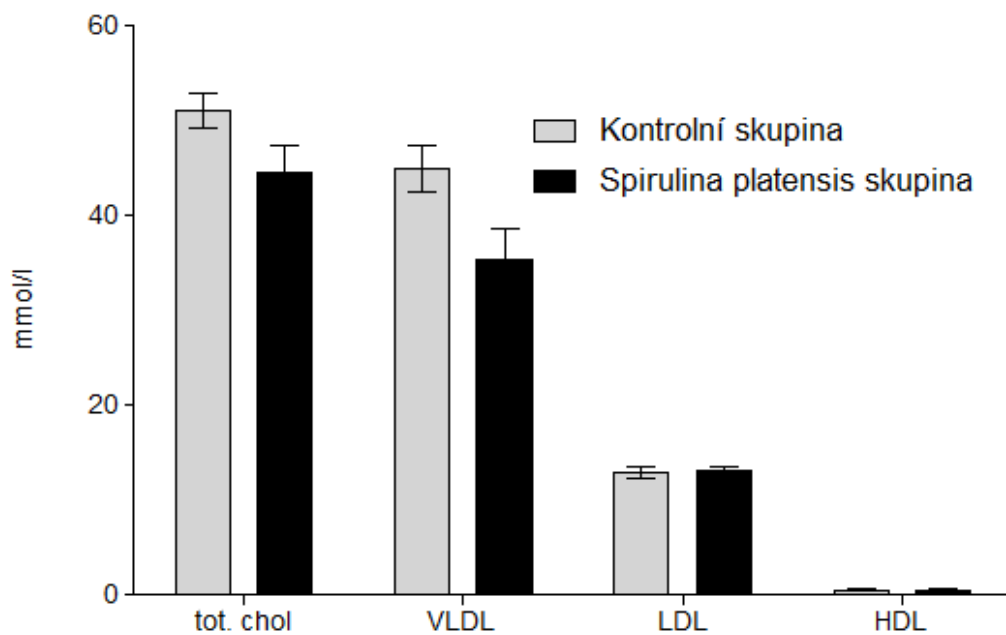
Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u atorvastatinové a kontrolní skupiny byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$. K výpočtu byl použit GraphPad Prism software (verze 4.0)

5. Výsledky

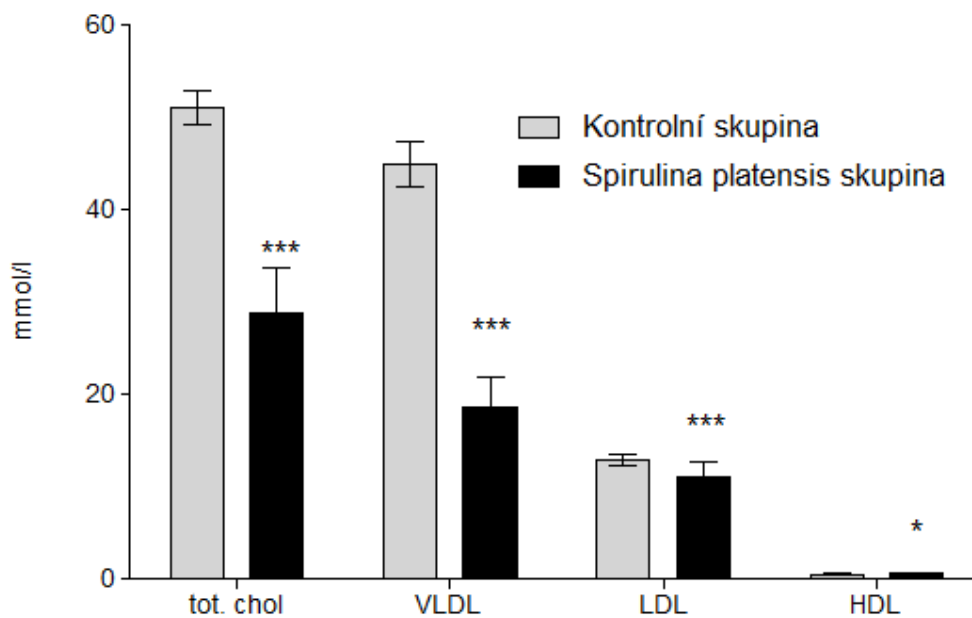
5.1 Biochemická analýza

Výsledky biochemické analýzy přinesly velké překvapení. U 6 myší nedošlo po podání Spiruliny k žádnému hypolipidemickému efektu (graf 1). Naopak u zbylých 3 myší došlo k velmi výraznému statisticky významnému poklesu v jednotlivých lipoproteinových frakcích (graf 2).

Graf 1.: Lipidový profil u kontrolních a 6 myší krmených *Spirulinou platensis*. Osmítýdenní podávání Spiruliny nevedlo ke statisticky významnému poklesu hladin cholesterolu a ani jednotlivých lipoproteinových frakcí.



Graf 2.: Lipidový profil u kontrolních a 3 myší krměných *Spirulinou platensis*. Osmítýdenní podávání *Spiruliny* statisticky významně snížilo hladiny celkového cholesterolu, VLDL, LDL ($P \leq 0,0001$) a HDL cholesterolu ($P \leq 0,05$).

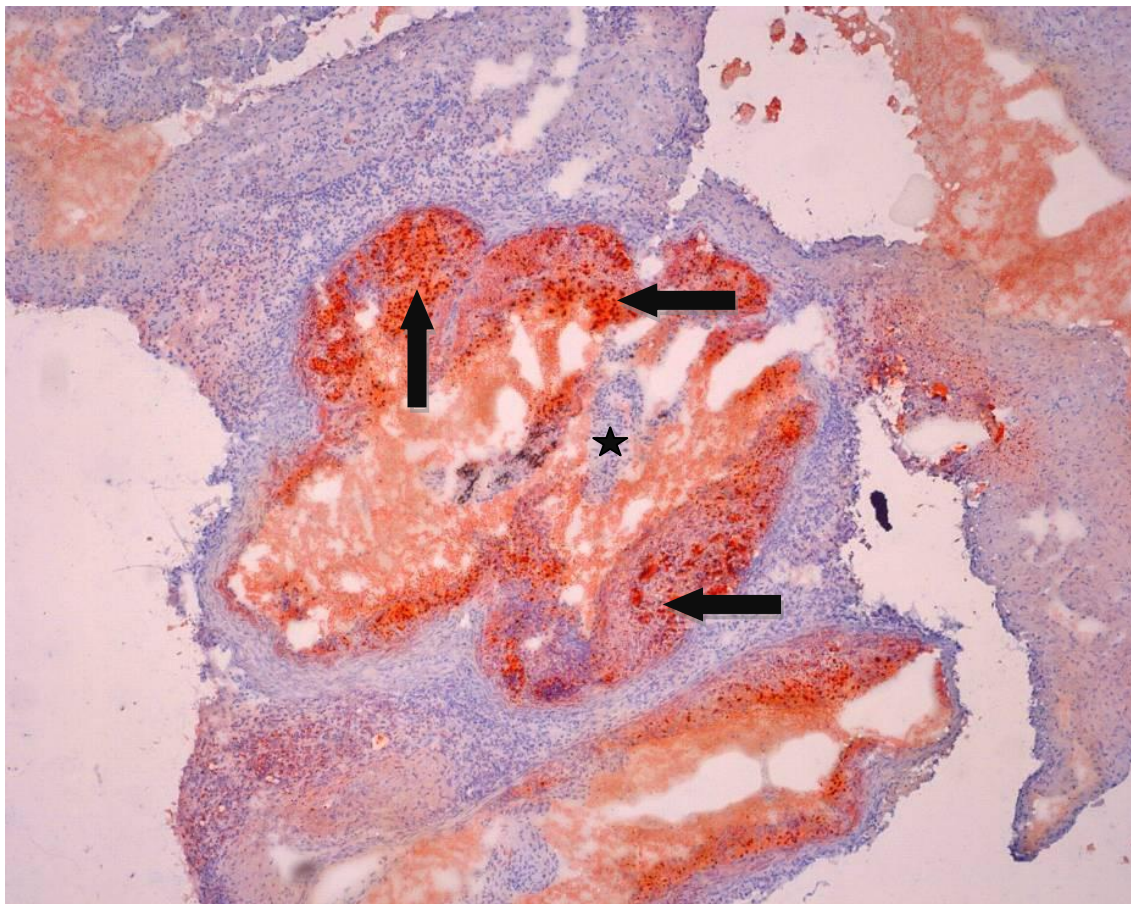


5.2 Histologické barvení olejovou červení

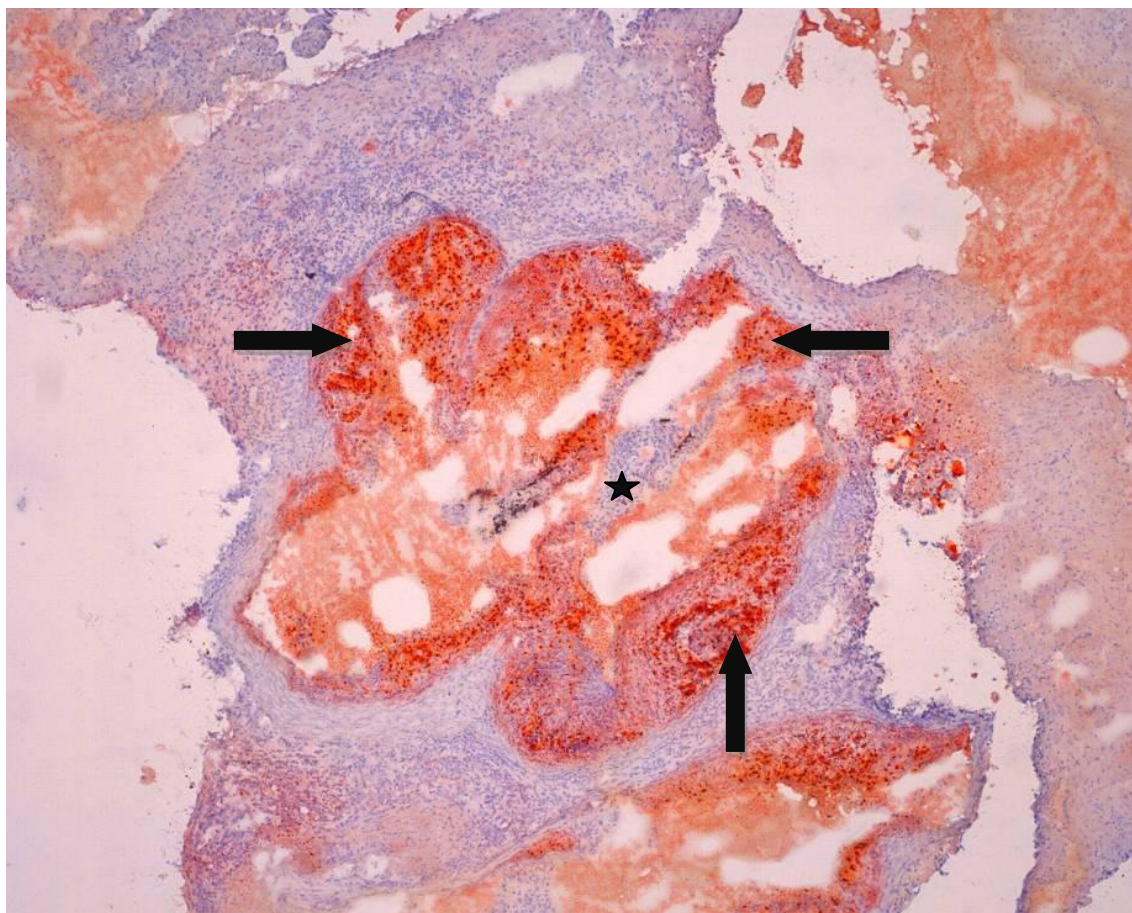
U všech řezů v kontrolní i *Spirulinou* léčené skupině byla pozorována přítomnost aterosklerotických lézí (obr 7). Léze byly největší v oblasti aortálního sinu, ale pokračovaly také v oblasti aortálního oblouku. Aterosklerotické léze byly výrazně vyvinuty, přičemž u řady z nich byla již nalezena ateromová nekrotická jádra. Podávání *Spiruliny* 6 myším, u kterých nedošlo k poklesu cholesterolu ani k viditelné změně ve velikosti plátů (obr 8). Podávání *Spiruliny* 3 myším, kde byl prokázán výrazný hypolipidemický účinek, již však vedlo ke snížení velikosti plátů (obr 9).

..

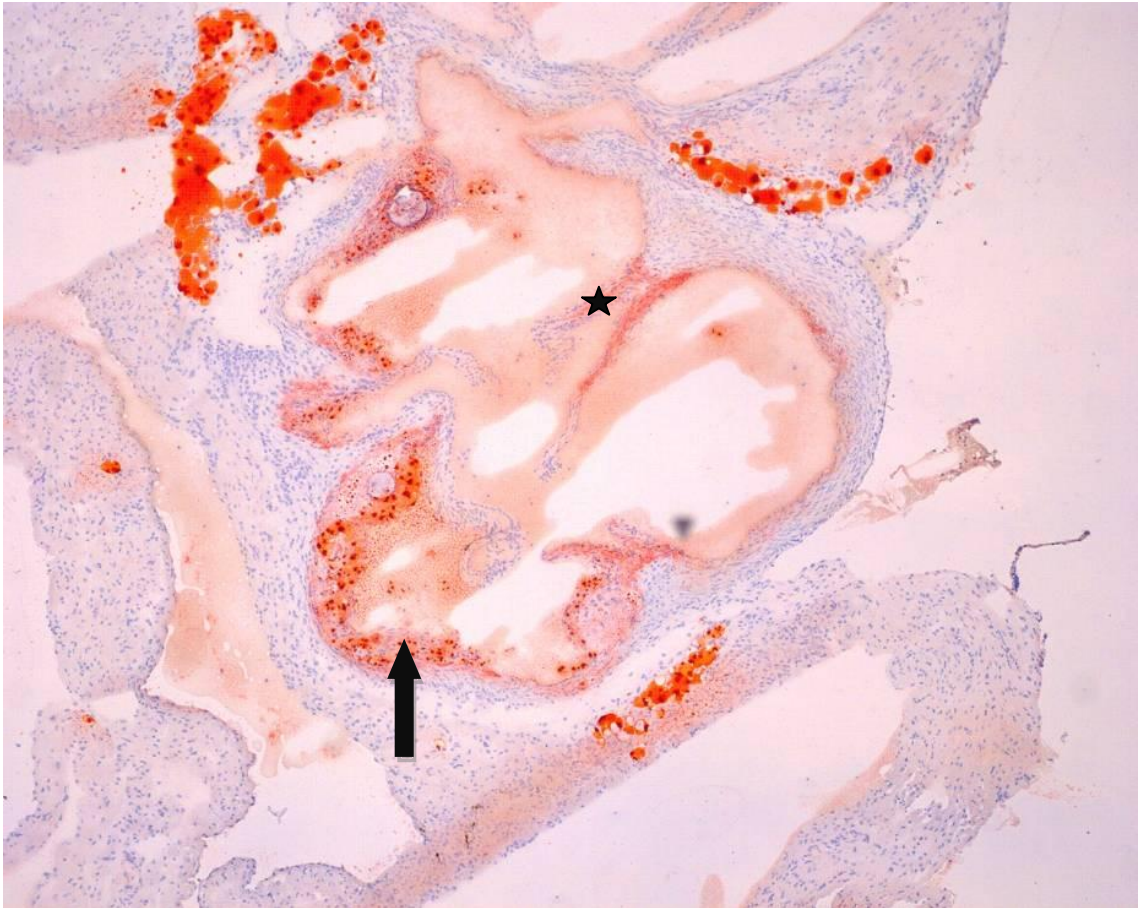
Obr. 7 : Barvení olejovou červení u kontrolní skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů aterogenní dieta. Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní (hvězdička). Zvětšení preparátu 40x.



Obr. 8 : Barvení olejovou červení u skupiny 6 zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů aterogenní dieta společně se *Spirulinou platensis* a u které nebyl prokázán hypolipidemický účinek. Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní. Intenzita a plocha barvení olejovou červení není změněna ve srovnání s kontrolní skupinou. Zvětšení preparátu 40x.



Obr. 9 : Barvení olejovou červení u skupiny 3 zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů aterogenní dieta společně se *Spirulinou platensis* a u které došlo k výraznému hypolipidemickému účinku. Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní. Intenzita a plocha barvení olejovou červení je menší ve srovnání s kontrolní skupinou. Zvětšení preparátu 40x.



5.3 Imunohistochemické barvení VCAM-1 v oblasti aortálního sinu

Silná exprese VCAM-1 byla pozorována u všech myší v experimentu. Silná intenzita byla pozorována v medii cév pod aterosklerotickými pláty. Dále byla pozorována exprese v aterosklerotických plátech. Silná exprese byla pozorována také na cévním endotelu v oblasti plátu i mimo něj (obr. 10). Barvení VCAM-1 nebylo nijak ovlivněno ve skupině zvířat, kde Spirulina neměla hypolipidemický efekt (obr 11). Nicméně ve skupině, kde Spirulina významně snížila cholesterol, byla pozorována nižší exprese VCAM-1 zejména uvnitř aterosklerotického plátu (obr 12).

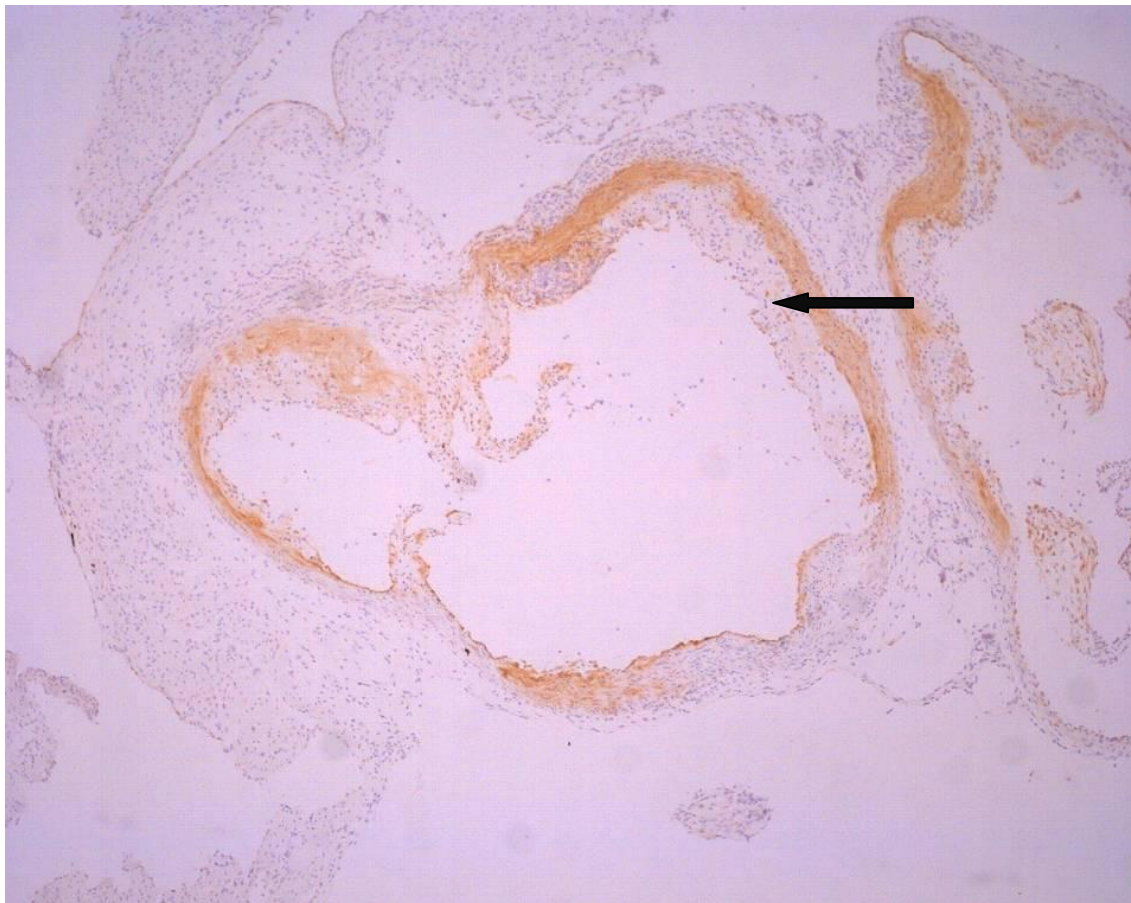
Obr. 10 : *Imunohistochemické barvení VCAM-1 u kontrolní skupiny zvířat. Silná exprese je pozorována v medii cévy pod aterosklerotickým plátem, v plátu a na cévním endotelu (šipky). Zvětšení 40x.*



Obr. 11.: *Imunohistochemické barvení VCAM-1 u skupiny zvířat, kterým byla podávána Spirulina a kde nedošlo k hypolipidemickému efektu. Silná exprese je pozorována v medii cévy pod aterosklerotickým plátem, v plátu a na cévním endotelu. Zvětšení 40x.*



Obr. 12.: *Imunohistochemické barvení VCAM-1 u skupiny zvířat, kterým byla podávána Spirulina a kde došlo k výraznému hypolipidemickému efektu. Exprese VCAM-1 byla snížena zejména v oblasti aterosklerotické léze (šipka). Naopak exprese na endotelu a v medii zůstala nezměněna ve srovnání s kontrolní skupinou. Zvětšení 40x.*



6. Diskuze

Ateroskleróza jako chronické zánětlivé onemocnění je velice rozšířeným onemocněním. 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 přispívajících k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu. Mnohé poznatky týkající se aterogenního procesu zdůrazňují úlohu zánětlivé reakce v procesu aterogeneze (4).

Tato diplomová práce byla zaměřena na sledování účinků *Spiruliny platensis*, na aterogenezi u apoE/LDLr-deficientního kmene myší.

Použití geneticky modifikovaných myší je z hlediska aterogeneze nutností, protože „normální“ myš není schopna rozvoje aterosklerózy (45). Hlavním důvodem je velmi nízká hladina cholesterolu (kolem 1-1,15 mmol/l) a to zejména v HDL frakci, což je mimochodem typický jev pro všechny hlodavce (25).

My jsme v této diplomové práci použili kmen s dvojitým deficitem, a to apolipoproteinu E a LDL receptoru (apoE^{-/-}/LDLR^{-/-}). Tento model byl vyvinut v roce 1994 a byl původně použit pro studium clearance lipoproteinů a pro studium receptorů pro jednotlivé lipoproteiny u myší (35). U tohoto modelu dochází opět ke spontánní hypercholesterolemii, která je ovšem vyšší než u apoE^{-/-} myší a LDLR^{-/-} myší. Zároveň také dynamika rozvoje aterosklerózy je rychlejší než u výše zmíněných kmenů (36). Z tohoto důvodu byl tento model deklarován jako velmi vhodný pro studium vlivu různých substancí na proces aterogeneze (37-39). My jsme u tohoto modelu popsali výrazné hypolipidemické a protizánětlivé účinky, které jsou poměrně vzácné ve studiích statinů u myších modelů aterosklerózy (40).

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 (10g Spiruliny obsahuje stejné množství železa jako 450g špenátu), vápník, zinek, draslík a hořčík. Z mikroelementů ve Spirulině najdeme selen, chrom, lithium a mangan. Důležitý je i obsah antioxidantně působících látek, prekurzoru vitamínu A - beta-karotenu (10g 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 (41). 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.

Zdá se však, že za pozitivní efekty Spiruliny mohou jiné obsahové látky. Některé studie prokázaly, že C-Phycocyanin obsažený v tomto extraktu má působí jako silný antioxidant metabolických produktů volných radikálů (44) (ROS – reactive oxygen species), ale byly prokázány také jeho hypolipidemické efekty (43). Dalšími obsahovými látkami jsou Fykokyanobiliny, které mají podobnou strukturu jako bilirubin. Právě u bilirubinu byly prokázány zajímavé antiaterogenní, protizánětlivé účinky v souvislosti s kardiovaskulárními nemocemi (46). Z těchto důvodů jsme chtěli sledovat, jestli podávání Spiruliny platensis povede k antiaterogenním účinkům. Jako marker zánětu jsme zvolili adhezní molekulu VCAM-1. VCAM-1, patřící mezi buněčné adhezní molekuly se účastní každé fáze vývoje aterosklerotických lézí. Přilnavost krevních monocytů a lymfocytů je jedním z prvních zaznamenaných projevů nástupu aterosklerózy, jak u lidí, tak i u modelových zvířat. Monocyty přecházejí do intimy cév a transformují se v makrofágy, ty pohlcují lipidy a stávají se pěnovými buňkami. Jelikož se rané tukové pláty skládají téměř výhradně z makrofágních pěnových buněk, přecházení monocytů do intimy je považováno za rozhodující

pro tvorbu lézí. Dochází-li k tomuto procesu na okraji léze, může to vést k šíření lézí (21).

Výsledky biochemické analýzy však poukázaly, na námi zatím neobjasněný jev. U 6 myší z 9 nedošlo po podávání *Spiruliny platensis* k žádnému ovlivnění hladin lipidů. Naopak u 3 myší došlo k výraznému a signifikantnímu snížení celkového cholesterolu, VLDL, 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 (43).

V souladu s tímto překvapujícím výsledkem biochemické analýzy se ukázaly i výsledky histologické analýzy aorty v oblasti kořene aorty. U myší kde nedošlo k hypolipidemickému efektu nebyly pozorovány žádné změny ve velikosti aterosklerotických plátů a exprese prozánětlivé VCAM-1 ve srovnání s kontrolní skupinou. Naopak u myší, kde *Spirulina platensis* snížila hladiny cholesterolu, se velikost plátů zmenšila a došlo také ke snížení exprese VCAM-1 to zejména v oblasti aterosklerotického plátu. Tento pokles exprese VCAM-1 se zdá být závislý na hypolipidemickém účinku *Spiruliny platensis*, protože řada prací poukázala na vztah cholesterolu a expresi VCAM-1 (40). V dalších studiích se však bude testovat i varianta, že by za pozitivní výsledky podávání *Spiruliny* mohly být také již výše zmíněné fykocyklybily.

Závěrem lze tedy říci, že podávání *Spiruliny platensis* vedlo u třech myší z devíti k signifikantnímu hypolipidemickému efektu, což mělo za následek snížení velikosti plátů a snížení exprese VCAM-1. Výsledky tedy potvrzují hypolipidemické účinky *Spiruliny platensis* a také možné antiaterogenní účinky této substance, které však bude nutné v dalších studiích ještě potvrdit.

7. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo ověřit potenciální hypolipidemické a protizánětlivé účinky *Spiruliny platensis* na experimentálním zvířecím modelu, kterým byly apoE/LDLr-deficientní myši. K tomu byly sledovány parametry lipidového spektra v krvi a exprese VCAM-1 v cévním endotelu.

Výsledky biochemické analýzy potvrdily hypolipidemický efekt *Spiruliny platensis* pouze u třech z devíti myší.

Výsledky histochemické a imunohistochemické analýzy dále potvrdily snížení velikosti aterosklerotických plátů a exprese VCAM-1 u těch myší, kde došlo hypolipidemickému efektu *Spiruliny platensis*.

Výsledky tedy potvrzují hypolipidemické účinky *Spiruliny platensis* a také možné antiaterogenní účinky této substance, které však bude nutné v dalších studiích ještě potvrdit zejména s ohledem na selhání hypolipidemického efektu u dalších šesti myší.

8. Použitá literatura

1. Klika: Histologie. Praha, 1986.
2. Davignon J and Ganz P: Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109: III27-32, 2004.
3. Keaney JF, Jr.: Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* 21: 99-166, 2000.
4. Mareckova Z, Heller S and Horky K: [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitr Lek* 45: 46-50, 1999.
5. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH and van Goor H: Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 199: 8-17, 2003.
6. Gryglewski RJ: Interactions between endothelial mediators. *Pharmacol Toxicol* 77: 1-9, 1995.
7. Ishizuka T, Takamizawa-Matsumoto M, Suzuki K and Kurita A: Endothelin-1 enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in tumor necrosis factor alpha-stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 369: 237-45, 1999.
8. Muntner P, He J, Astor BC, Folsom AR and Coresh J: 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* 16: 529-38, 2005.
9. Hallan S, de Mutsert R, Carlsen S, Dekker FW, Aasarod K and Holmen J: Obesity, smoking, and physical inactivity as risk factors for CKD: are men more vulnerable? *Am J Kidney Dis* 47: 396-405, 2006.
10. Geiss HC and Parhofer K: [Diabetic dyslipoproteinemia]. *MMW Fortschr Med* 148: 30-3, 2006.
11. Daubresse JC: [Atherosclerosis and nutrition]. *Rev Med Brux* 21: A359-62, 2000.
12. Bjorkbacka H: Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 19: 548-9, 2008.
13. Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Miana M, de las Heras N, Cachofeiro V and Luno J: Endothelial dysfunction, oxidative stress and

inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem* 14: 243-8, 2007.

14. Najemnik C, Sinzinger H and Kritz H: Endothelial dysfunction, atherosclerosis and diabetes. *Acta Med Austriaca* 26: 148-53, 1999.
15. Galkina E, Kadl A, Sanders J, Varughese D, Sarembock IJ and Ley K: Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. *J Exp Med* 203: 1273-82, 2006.
16. Vasdev S, Gill V and Singal P: Role of advanced glycation end products in hypertension and atherosclerosis: therapeutic implications. *Cell Biochem Biophys* 49: 48-63, 2007.
17. Mysliwiec M, Borawski J, Naumnik B and Rydzewska-Rosolowska A: Endothelial dysfunction, atherosclerosis and thrombosis in uremia--possibilities of intervention. *Rocz Akad Med Bialymst* 49: 151-6, 2004.
18. Mangge H, Hubmann H, Pilz S, Schauenstein K, Renner W and Marz W: Beyond cholesterol--inflammatory cytokines, the key mediators in atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 42: 467-74, 2004.
19. Linton MF and Fazio S: Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3: S35-40, 2003.
20. Krieglstein CF and Granger DN: Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens* 14: 44S-54S, 2001.
21. Cybulsky MI, Lichtman AH, Hajra L and Iiyama K: Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clin Chim Acta* 286: 207-18, 1999.
22. DeGraba TJ: Expression of inflammatory mediators and adhesion molecules in human atherosclerotic plaque. *Neurology* 49: S15-9, 1997.
23. Luc G, Arveiler D, Evans A, Amouyel P, Ferrieres J, Bard JM, Elkhailil L, Fruchart JC and Ducimetiere P: Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and incident coronary heart disease: The PRIME Study. *Atherosclerosis* 170: 169-76, 2003.
24. Galkina E and Ley K: Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 2292-301, 2007.
25. Breslow JL: Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272: 685-8, 1996.

26. Daugherty A: Mouse models of atherosclerosis. *Am J Med Sci* 323: 3-10, 2002.
27. Shih DM, Welch C and Lusis AJ: New insights into atherosclerosis from studies with mouse models. *Mol Med Today* 1: 364-72, 1995.
28. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA and Maeda N: Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258: 468-71, 1992.
29. Ji ZS, Brecht WJ, Miranda RD, Hussain MM, Innerarity TL and Mahley RW: Role of heparan sulfate proteoglycans in the binding and uptake of apolipoprotein E-enriched remnant lipoproteins by cultured cells. *J Biol Chem* 268: 10160-7, 1993.
30. Rensen PC and van Berkel TJ: Apolipoprotein E effectively inhibits lipoprotein lipase-mediated lipolysis of chylomicron-like triglyceride-rich lipid emulsions in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 271: 14791-9, 1996.
31. Reddick RL, Zhang SH and Maeda N: Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14: 141-7, 1994.
32. Nachtigal P, Jamborova G, Pospisilova N, Pospechova K, Solichova D, Zdansky P and Semecky V: Atorvastatin has distinct effects on endothelial markers in different mouse models of atherosclerosis. *J Pharm Pharm Sci* 9: 222-30, 2006.
33. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL and Ross R: ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 14: 133-40, 1994.
34. Meir KS and Leitersdorf E: Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1006-14, 2004.
35. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL and Brown MS: The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4431-5, 1994.

36. Witting PK, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Eriksson AW and Stocker R: Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *Faseb J* 13: 667-75, 1999.
37. Jawien J, Csanyi G, Gajda M, Mateuszuk L, Lomnicka M, Korbut R and Chlopicki S: Ticlopidine attenuates progression of atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor double knockout mice. *Eur J Pharmacol* 556: 129-35, 2007.
38. Olszanecki R, Jawien J, Gajda M, Mateuszuk L, Gebska A, Korabiowska M, Chlopicki S and Korbut R: Effect of curcumin on atherosclerosis in apoE/LDLR-double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 56: 627-35, 2005.
39. Jawien J, Gajda M, Mateuszuk L, Olszanecki R, Jakubowski A, Szlachcic A, Korabiowska M and Korbut R: Inhibition of nuclear factor-kappaB attenuates atherosclerosis in apoE/LDLR - double knockout mice. *J Physiol Pharmacol* 56: 483-9, 2005.
40. Nachtigal P, Pospisilova N, Jamborova G, Pospechova K, Solichova D, Andrys C, Zdansky P, Micuda S and Semecky V: Atorvastatin has hypolipidemic and anti-inflammatory effects in apoE/LDL receptor-double-knockout mice. *Life Sci* 82: 708-17, 2008.
41. Mazo VK, Gmshinskii IV and Zilova IS: [Microalgae Spirulina in human nutrition]. *Vopr Pitan* 73: 45-53, 2004.
42. Huang ZX, Mei XT, Xu DH, Xu SB and Lv JY: [Protective effects of polysaccharide of Spirulina platensis and Sargassum thunbergii on vascular of alloxan induced diabetic rats]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 30: 211-5, 2005.
43. Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H, Shibayama F, Morikawa K, Kanamaru Y, Otsuka A, Hirahashi T and Kato T: A novel protein C-phycoerythrin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of Spirulina platensis concentrate in rats. *J Nutr* 135: 2425-30, 2005.
44. Riss J, Decorde K, Sutra T, Delage M, Baccou JC, Jouy N, Brune JP, Oreal H, Cristol JP and Rouanet JM: Phycobiliprotein C-phycoerythrin 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* 55: 7962-7, 2007.

45. Jawien J, Nastalek P and Korbut R: Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55: 503-17, 2004.

46. Schwertner HA and Vitek L: Gilbert syndrome, UGT1A1*28 allele, and cardiovascular disease risk: possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis* 198: 1-11, 2008.