

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**

**Spirulina platensis a její vliv na aterogenezi  
u myšního modelu aterosklerózy**

**Spirulina platensis effects on atherogenesis  
in mouse model of atherosclerosis**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD

Hradec Králové 2011

Marie Žáková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

„Na začátku bych chtěla poděkovat Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotný přístup a poskytnuté praktické rady při tvorbě mé diplomové práce.“

## **Abstrakt**

Marie Žáková

Spirulina platensis a její vliv na aterogenezi u myšního modelu  
aterosklerózy

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Farmacie

**Cíl práce:** Sledovali jsme vybrané aterosklerotické a zánětlivé markery u apoE-deficientních myší krměných Spirulinou platensis k ověření jejich hypolipidemických a protizánětlivých účinků.

**Metody:** Použily jsme samce myši kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E (apoE<sup>-/-</sup>) ve věku 3 měsíců. Zvířata byla rozdělena do 2 skupin (kontrolní a zkoušené). Obě skupiny byly krměny po dobu 8 týdnů cholesterolovou dietou. Zkoušené skupině bylo přidáváno 20 mg/kg/den Spiruliny platensis. Provedená biochemická analýza sloužila k zjištění lipidového spektra v krvi. K vizualizaci velikosti aterosklerotické léze a detekci lipidů bylo provedeno histologické barvení olejovou červení. Imunohistochemická analýza sloužila k průkazu množství exprese VCAM-1.

**Výsledky:** Biochemická analýza neprokázala kromě snížení LDL cholesterolu významný pokles celkového cholesterolu. U obou skupin myší byla histologickým barvením olejovou červení ilustrována přítomnost aterosklerotických lézí s kumulací lipidů, výsledky se mezi skupinami nelišily. Imunohistochemickou analýzou byl ve skupině, které byla podávána Spirulina, prokázán oproti kontrolní skupině pokles exprese VCAM-1, a to zvláště v oblasti plátu.

**Závěr:** Hypolipidemické a protizánětlivé účinky Spiruliny platensis byly částečně demonstrovány, měly by však být ověřeny především vyššími dávkami této řasy.

## **Abstract**

Marie Žáková

*Spirulina platensis* effects on atherogenesis in mouse model of atherosclerosis

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové  
Pharmacy

**Background:** The aim of this diploma thesis was to evaluate possible antiatherogenic and antiinflammatory effects of *Spirulina platensis* in apoE-deficient mice.

**Methods:** We used C57BL/6J male mice with deficiency of apolipoprotein E (apoE<sup>-/-</sup>) at the age of 3 months. The animals were divided into 2 groups (control and examined mice). Both groups were fed with cholesterol diet for 8 weeks. In *Spirulina* group, *Spirulina platensis* was added at dose of 20 mg/kg/day. The biochemical analysis was performed in order to discover the lipid spectrum of blood. There was also performed the histological staining with oil red in order to visualise the size of atherosclerotic lesions and to detect the lipids. The aim of the immunohistochemical analysis was to approve the amount of VCAM-1 expression.

**Results:** Biochemical analysis did not demonstrate any significant decrease of total cholesterol expect from decreasing of LDL cholesterol. The presence of atherosclerotic lesions with lipids cumulation was illustrated by histological staining with oil red in both mice groups, the results of each group did not differ. In comparison with control group, immunohistochemical analysis performed on *Spirulina*-fed group approved decreased VCAM-1 expression, especially in plaque area.

**Conclusion:** Hypolipidemic and antiinflammatory effects of *Spirulina platensis* were partly demonstrated, however, they should be confirmed by higher dosage of the alga.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV.....</b>	<b>10</b>
2.1	FUNKCE A VLASTNOSTI OBĚHOVÉHO SYSTÉMU .....	10
2.2	OBEČNÁ STAVBA CÉV .....	10
2.3	KREVŇÍ CÉVY.....	11
2.3.1	Kapiláry .....	12
2.3.2	Artérie.....	13
2.3.3	Vény .....	15
<b>3</b>	<b>ATEROSKLERÓZA .....</b>	<b>16</b>
3.1	EPIDEMIOLOGIE.....	17
3.2	RIZIKOVÉ FAKTORY .....	17
3.3	ETIOPATOGENEZE ATEROSKLERÓZY .....	24
3.3.1	Vliv endoteliální dysfunkce na proces aterogeneze .....	24
3.3.2	Vliv lipoproteinů na proces aterogeneze .....	27
3.3.3	Vliv leukocytů a trombocytů na proces aterogeneze .....	30
3.3.4	Vliv buněk hladké svaloviny na proces aterogeneze .....	32
3.3.5	Stupně vývoje aterogeneze a komplikace.....	34
<b>4</b>	<b>MYŠÍ MODEL.....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>SPIRULINA PLATENSIS .....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>IMUNOGLOBULINOVÁ SKUPINA ADHEZNÍCH MOLEKUL.....</b>	<b>46</b>
6.1	STRUKTURA A FUNKCE VCAM-1 .....	46
6.2	EXPRESE VCAM-1.....	47
<b>7</b>	<b>CÍL PRÁCE (ZADÁNÍ).....</b>	<b>49</b>

<b>8</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>50</b>
8.1	ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA .....	50
8.2	BIOCHEMICKÁ ANALÝZA .....	50
8.3	HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ.....	51
8.4	IMUNOHISTOCHEMIE .....	51
8.5	STATISTICKÁ ANALÝZA .....	54
<b>9</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>55</b>
9.1	BIOCHEMICKÁ ANALÝZA .....	55
9.2	HISTOLOGICKÉ BARVENÍ OLEJOVOU ČERVENÍ.....	55
9.3	IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA .....	58
9.3.1	Imunohistochemické barvení VCAM-1 v oblasti aortálního sinu .....	58
<b>10</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>60</b>
<b>11</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>63</b>
<b>12</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>64</b>
<b>13</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>67</b>

# 1 ÚVOD

Ateroskleróza je onemocnění doprovázející lidstvo od nepaměti. Jako důkaz lze zmínit mumie egyptských faraónů, staré 3500 let, u nichž byly objeveny aterosklerotické změny. Již Leonardo da Vinci (1452-1519) přikládal význam nestrádané výživě na ztlustění stěn tepen (1).

Aterogeneze je podkladem vzniku řady kardiovaskulárních onemocnění (KVO). Ty jsou nejfrekventovanější příčinou morbidit a mortality u nás i v dalších rozvinutých zemích. Uvádí se, že kardiovaskulární choroby stojí přibližně za 50% příčin úmrtí. V posledních letech však dochází ke snížení kardiovaskulární mortality. Příčinou může být nejen nová účinnější léčba, ale i změna životního stylu či lepší detekce onemocnění.

Největší procento z úmrtí na KVO zaujímá ischemická choroba srdeční (ICHS). ICHS můžeme tedy řadit mezi jednu z nejčastějších chorob ve všech rozvinutých zemích.

ICHS je onemocnění způsobené patologickými procesy v koronárním řečišti, za nimiž nejčastěji stojí ateroskleróza věnčitých tepen (2, 3, 4). Mezi další příčiny vzniku tohoto onemocnění lze zařadit spazmy koronárních tepen či hypertrofickou kardiomyopatii. Tato choroba je definována jako akutní či chronické omezení, popřípadě až zastavení průtoku krve v určité části srdeční stěny, v důsledku čehož vzniká ischemie, až nekróza (3).

Ateroskleróza však nezpůsobuje pouze postižení koronárních tepen, postihuje většinu tepen. Mezi další komplikace patří cévní mozkové příhody (CMP), ischemická choroba dolních končetin (ICHDK), stenóza renálních tepen, aneuryzma aorty a další (5).

Existují důkazy, že změnou životního stylu, dietou, cvičením, užitím terapie, léčebných postupů a primární i sekundární prevencí, lze snížit úmrtnost na aterosklerózou vzniklé komplikace (6). Probíhá intenzivní výzkum nových alternativ ovlivnění prognózy nemocných. Mezi takové nové možnosti bychom mohli zařadit i *Spirulinu platensis*,



řasu, u které mnoho vědců prošetřuje její účinky a terapeutické využití. Mezi ně patří i objevování účinků na snižování cholesterolu (7).

## 2 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

### 2.1 Funkce a vlastnosti oběhového systému

Oběhový systém má funkci transportní a homeostatickou. Prostřednictvím tohoto systému dochází například k distribuci kyslíku, živin, odpadních látek, tělesných tekutin, tělesného tepla a součástí imunitního systému. Obecně můžeme oběhový systém rozdělit na kardiovaskulární a lymfatický. V této práci se budeme dále zabývat právě prvně jmenovaným.

Kardiovaskulární systém se skládá z artérií, které vedou krev ze srdce do tkání, vén, které vedou krev v opačném směru, a kapilár, které umožňují výměnu transportovaných elementů mezi krví a tkáněmi a které leží mezi artériemi a vénami. Tento uzavřený systém trubic je poháněn pomocí srdce, svalové pumpy (8).

### 2.2 Obecná stavba cév

Cévní stěna se skládá ze tří vrstev, tzv. tunik. Uprostřed těchto koncentrických vrstev se nachází kanál, neboli lumen.

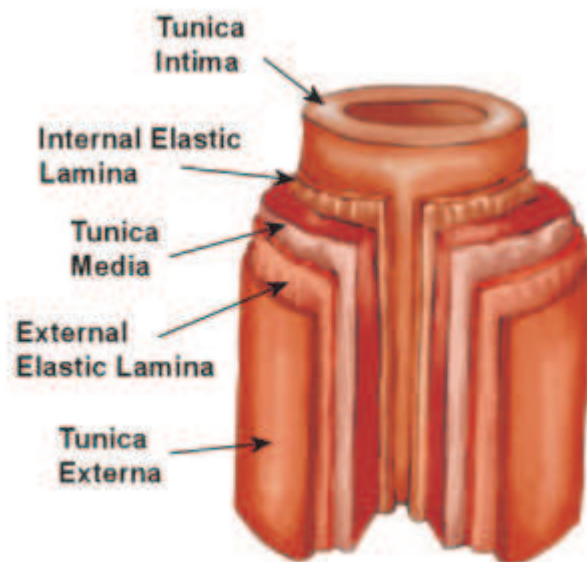
**Tunica intima** ohraničuje lumen, tvoří tedy vnitřní vrstvu. Skládá se z na bazální lamině ležícího jednovrstevného endotelu tvořeného dlaždicovým epitelem a ze subendotelové vazivové tkáně. Kapiláry jsou tvořené pouze endotelem. Mezi intimou a tunicou medií nalezneme u artérií fenestrovanou vrstvu elastinu – membrana elastica interna, která tyto dvě vrstvy odděluje (8). Označení membrana může být nahrazeno pojmem lamina. Fenestrace v lamině umožňují difuzi látek a výživu buněk v cévní stěně (9).

**Tunica media** skládající se z cirkulárně uspořádaných vláken hladké svaloviny, tvoří střední vrstvu cév. Tato vrstva je u artérií díky většímu množství svaloviny a elastických vláken silnější v porovnání s vénami či lymfatickými cévami. U velkých cév nalezneme mezi medií a tunicou adventitií membránu elasticu externu (8). Mezi vlákny hladké

svaloviny se mohou vyskytovat nejenom elastická vlákna, ale i kolagen typu III a proteoglykan, jež jsou svalovými buňkami produkovány (9).

**Tunica adventitia**, neboli periferní vrstva, se skládá z kolagenu typu I a elastických vláken. Ta upevňují cévu ve tkáních. V tomto případě představuje adventitie nejtlustší vrstvu pro vény, u velkých vén zde pak nalezneme longitudiálně uspořádanou hladkou svalovinu. Velkým cévám, jejichž periferní buňky nemohou být vyživovány difuzí, dodávají kyslík a živiny malé krevní cévy (vasa vasorum) (8). Tyto tzv. cévy cév se značně větví v adventitii a periferní části medie a to především ve vénách, kde je nízký obsah kyslíku (9).

**Obrázek 1: Stavba krevní stěny** (10)



<http://www.teachpe.com/anatomy/artery.jpg> (23. 4. 2011)

### 2.3 Krevní cévy

Krevní cévy můžeme dle typu a velikosti rozdělit na krevní kapiláry, artérie a vény (8). Mezi vyhraněnými stavebními znaky jednotlivých typů cév existují přechody (9).

### 2.3.1 Kapiláry

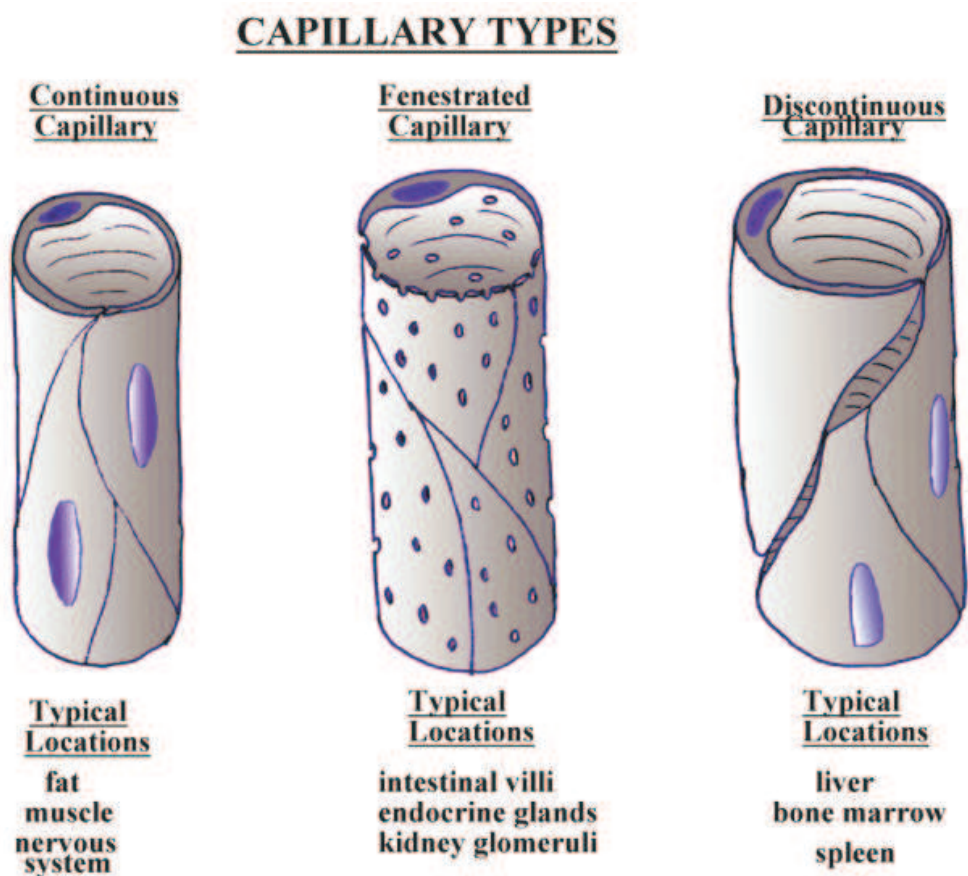
Krevní kapiláry se svým průměrem 7 až 9  $\mu\text{m}$  jsou nejmenší cévy a jako takové tvoří systém kapilárního řečiště. Jsou tvořené jednou vrstvou endotelu z jednovrstevného plochého epitelu. Na povrchu je obklopuje bazální lamina. U některých kapilár nalezneme v endotelu póry (fenestrace). Buňky epitelu jsou spojené komplexy, například zonulae occludentes a nexy (8). Zonulae occludentes řídí prostup makromolekul (9).

Podél kapilár jsou pak rozptýlené pericyty, tzv. adventiciální buňky. Tyto mezenchymové kmenové buňky se mohou diferencovat v celou řadu typů buněk a mohou kontrahovat (8). Obsahují totiž aktin, myosin a tropomyosin a tím zastupují činnost tunici medií. Adventitii zas připomínají kolagenní vlákna, obklopující slabě kapiláry i postkapilární venuly (9).

Podle struktury stěny klasifikujeme kapiláry na:

- a. **Kapiláry se souvislou výstelkou.** Ve svém hladkém endotelu neobsahují póry, buňky jsou těsně navázané pomocí spojovacích komplexů. Nacházejí se ve svalech a v nervovém systému.
- b. **Fenestrované kapiláry.** Vlastní v endotelové vrstvě póry, tzv. fenestrace. Ty mohou být jak otevřené, tak přehrazené tenkou diafragmou. Diafragma slouží k redukci velikosti průchodu pro makromolekuly. Tyto kapiláry se vyskytují zvláště v ledvinách, endokrinních žlázách či ve střevu, tedy ve tkáních a orgánech, kde je potřebná rychlá výměna látek mezi tkáněmi a krví.
- c. **Sinusoidní kapiláry.** Mají klikatý průběh s nezvykle širokým lumen (30-40  $\mu\text{m}$ ). Obsahují mnohé fenestrace. Spáry mezi endotelovými buňkami umožňují průchod celých buněk. Bazální lamina je diskontinuální (8). Nacházejí se například v hematopoetických orgánech a v játrech (9).

**Obrázek 2: Typy kapilár dle struktury (11)**



<http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/vascularmodelingpage/circsystempage/capillaries/largegifs/capillarytypeslarge.gif> (23.4. 2011)

### **2.3.2 Artérie**

Jak již bylo uvedeno výše, artérie přivádějí krev ze srdce do tkání. Oproti vénám mají silnější tunicu mediu. Typicky silnou vrstvu mají středně velké svalové artérie, u velkých artérií nalezneme v porovnání s ostatními cévami v medii i adventitii nejvíce elastinu. Artérie vlastní membrana elastica interna a externa, což jsou světlolomné eozinofilní vrstvy. Dle typu a funkce klasifikujeme artérie na velké elastické artérie, střední svalové artérie, arterioly a metarterioly (prekapiláry) (8).

**Tab. 1 Velké elastické artérie (aorta aj.) (8)**

Tunica intima	Silnější než u svalových, mezi intimou a medií může být membrána elastica interna.
Tunica media	Značné množství elastinu ve fenestrovaných blankách. Mezi nimi jsou hladké svalové buňky.
Tunica adventitia	Tenká, obsahuje kolagenní a elastická vlákna.

**Tab. 2 Střední svalové artérie (artérie končetin a břišní dutiny) (8)**

Tunica intima	Klasický endotel a subendotel. Mezi intimou a medií je membrána elastica interna jako světlolomná linie.
Tunica media	Silná, až ze 40 vrstev hladké svaloviny. Podíl elastinu k proteoglykanu se zvyšuje se zvětšující se artérií.
Tunica adventitia	Tenká, hlavně kolagenní vlákna.

**Tab. 3 Arterioly (malé cévy s průměrem 0,5 mm a méně) (8)**

Tunica intima	Klasický endotel. Mnohdy chybí subendotelová vazivová vrstva a membrana elastica interna.
Tunica media	Až z pěti vrstev hladké svaloviny.
Tunica adventitia	Velice slabá, z kolagenních vláken.

**Tab. 4 Metarterioly (tzv. prekapiláry; malé větve arterioly kontrolující průtok krve kapilárami. Prekapilárními sfinktery mohou tok úplně zastavit) (8)**

Tunica intima	Typický endotel. Subendotelová vazivová vrstva i membrana elastica interna chybí.
Tunica media	Z jedné nesouvislé vrstvy hladké svaloviny.
Tunica adventitia	Nelze rozlišit.

### 2.3.3 Vény

Stěna vén je oproti artériím tenčí, nemají pravidelný okrouhlý tvar. Avšak adventitie je oproti artériím silnější, může být tvořena longitudinálně uspořádanou hladkou svalovinou, jejíž přítomnost je typická u tlustších vén. Ve vénách se vyskytují chlopně, což jsou výběžky intimy do cévního kanálu. Chlopně udržují jednosměrný tok krve zpět k srdci a slouží k předcházení městnání krve. Jsou tvořené z fibroelastické vazivové tkáně pokryté endotelem. Podle typu a funkce klasifikujeme vény na velké vény, malé a střední vény a venuly (8).

**Tab. 5 Velké vény** (*vena cava superior, vena cava inferior aj.*) (8)

Tunica intima	Dobře vyvinutá. Silná vrstva subendotelové vazivové tkáně. Obsahuje chlopně.
Tunica media	Několik vrstev hladkosvalových buněk. Mnohá retikulární a kolagenní vlákna. Elastinu méně.
Tunica adventitia	Vyvinutá. Mnoho kolagenu a longitudinální hladké svaloviny s ochranou a zesilující funkcí.

**Tab. 6 Malé a střední vény** (*vena portae aj.*) (8)

Tunica intima	Klasický endotel. Málo subendotelové tkáně a chlopní. Nemá membranu elasticu internu.
Tunica media	Tenká. Nízký počet elastických vláken.
Tunica adventitia	Relativně silná. Hlavně kolagen.

**Tab. 7 Venuly** (*menší vény*), **Postkapilární venuly** (*sběr krve*) (8)

Tunica intima	Klasický endotel bez chlopní.
Tunica media	Velmi slabá.
Tunica adventitia	Velmi slabá, hlavně kolagen.

### 3 ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je chronické zánětlivé onemocnění cév, u kterého dochází k metabolickým a proliferativním změnám v tepenné stěně. Výsledkem tohoto procesu je tvorba plátů, které mohou zužovat lumen tepen a jejichž vývoj může dále progredovat. Celý proces se odehrává v intimě a k prvním změnám může docházet již v dětství (12).

Je třeba odlišit pojem arterioskleróza, který zahrnuje aterosklerózu i arteriolosklerózu, což je postižení menších artérií i arteriol, a Mönckebergovu mediokalcinózu.

Pojem ateroskleróza vychází z řečtiny, kdy *atharé* znamená kaše, *skléros* tvrdý. Postihuje především velké elastické a střední svalové tepny. Konkrétněji zvláště věnčité tepny, mozkové či ledvinové, tento typ lokalizace nazýváme periferní. Centrální typ zahrnuje aortu, hlavně v břišní oblasti a artérie dolních končetin (13).

Fibrózní pláty a ateromy se vyvíjejí z tukových proužků, zvláště v místech větvení artérií. Na tomto jevu se podílejí hlavně tlakové a hemodynamické fyzikální faktory, turbulentní proudění krve či pokles shear stressu v místech větvení. Ten v jiných částech tepen podporuje syntézu oxidu dusnatého (NO), o jehož protektivním významu bude pojednáváno (3).

V důsledku stenózy, případně až uzávěru tepny vzniklým prasknutím plátu a vytvořením trombu, může docházet k ischemii až nekróze tkáně. S tímto jevem se setkáváme zvláště u tenkých artérií. Ve velkých tepnách obvykle nedochází k zamezení průtoku ani vlivem trombu, ten ale může embolizovat periferii. Následkem nižší odolnosti vůči tlaku krve může dojít ke vzniku aneuryzma, což je výduť. Ta často vzniká v aortě a praskne-li její vnitřní část, vzniká disekující aneurysma. Také dochází ke kalcifikaci plátu (5).

Na vzniku aterosklerózy se podílí řada faktorů, z nichž velká část je modifikovatelná. Proto je třeba k léčbě přistupovat komplexně, neboť více faktorů představuje větší riziko (14).



### **3.1 Epidemiologie**

Výskyt aterosklerózy v populaci zaznamenává značné rozdíly jak v čase, tak geograficky. Ateroskleróza je příčinou přibližně 50% úmrtí, a to zvláště ve vyspělých zemích, kde se stala epidemií 20. století. Počátkem 70. let začala v důsledku osvěty její incidence v nejpostiženějších státech (USA, VB) klesat, zatímco v České republice v této době výskyt komplikací stoupal, stejně jako v zemích východně od nás. Po roce 1985 byl i u nás zaznamenán pokles.

Je třeba poznamenat, že v rozvojových zemích jako Afrika, střední a jižní Amerika či Asie, se toto onemocnění vyskytuje vzácně, v některých oblastech Afriky téměř vůbec. Další výjimkou je Japonsko, v této vyspělé zemi je výskyt aterosklerózy také nízký. Tento fakt poukazuje na vliv způsobu života na proces aterogeneze. Zajímavé totiž je, že přestěhuje-li se Japonec do USA, riziko KVO se zvýší. Geografické rozdíly jsou tedy spíše než dědičností dané především životním stylem (15).

### **3.2 Rizikové faktory**

Rizikový faktor zahrnuje jakýkoliv charakter prostředí, chování nebo zděděnou vlastnost, která se podílí na pravděpodobnosti výskytu či vzniku choroby, případně události, vztahující se ke zdravotnímu stavu (16).

Mezinárodními průzkumy se zjistilo, že je známo více jak 90% příčin vedoucích k rozvoji aterosklerózy. Patří mezi ně zvláště klasické rizikové faktory, které se dají povětšinou modifikovat (4).

Za nejvýznamnější modifikovatelné rizikové faktory se považují hypercholesterolémie, kouření a hypertenze. Toto tvrzení vzniklo na podkladě rozsáhlých epidemiologických studií (1). Poprvé byl pojem rizikový faktor ve vztahu k ateroskleróze a ICHS zaveden a užit ve Framinghamské studii (17).

Rizikové faktory dělíme na ovlivnitelné a neovlivnitelné (1).

**Tab. 8 Základní rizikové faktory** (3, 18, 19)

Neovlivnitelné rizikové faktory:
věk
pohlaví
rodinná anamnéza
Ovlivnitelné rizikové faktory:
hyperlipoproteinémie, dyslipidémie
kouření
hypertenze
diabetes mellitus, porušená glukózová tolerance, inzulinová rezistence
fyzická inaktivita
obezita

#### *Věk*

S rostoucím věkem manifestace aterosklerózy stoupá. Za hranici rizika se u mužů pokládá 45 let a více, u žen 55 let a více. Pokud žena prodělala ooferektomii a neužívá substitučně estrogény, riziková věková hranice se sníží.

#### *Mužské pohlaví*

Ženy jsou do menopauzy chráněny estrogény, ty například způsobují vyšší hladiny HDL (high density lipoproteins) a příznivě ovlivňují endotel. Pokud žena po menopauze není estrogény substitučně léčena, riziko aterosklerózy se s muži časem vyrovnává (1).

#### *Rodinná anamnéza*

Pozitivní rodinná anamnéza zahrnuje onemocnění ICHS u prvostupňových příbuzných do 65 let věku u žen, do 55 let věku u mužů. Jako prvostupňové příbuzné uvažujeme rodiče a sourozence (3).

## *ICHS*

Často se také uvádí jako nejrizikovější faktor, pokud nemocný již má diagnostikovanou ICHS, zvláště pokud prodělal akutní komplikaci (1). Ateroskleróza totiž postihuje, jak jsem již uvedla, většinu tepen (5).

## *Hyperlipidémie*

Hyperlipidémii, případně hyperlipoproteinémií, můžeme definovat jako metabolické onemocnění se zvýšenou hladinou lipidů a lipoproteinů v plazmě. Dále se můžeme setkat s pojmem dyslipidemie, který zohledňuje nevhodný aterogenní poměr lipidů.

Základní typy hyperlipidémie a dyslipidémie jsou hypertriacylglycerolémie, kombinovaná hyperlipidémie a hypercholesterolémie (18).

Právě hypercholesterolémie a s ní zvýšená hladina LDL (low density lipoproteins) jsou nejvýznamnější nositelé aterogenního účinku. Zvýšením LDL cholesterolu o 1% dochází ke vzrůstu rizika komplikací o 2%. Naopak HDL cholesterol, který provádí zpětný transport cholesterolu z periferie, rozvoj aterosklerózy snižuje. K posouzení rizika slouží aterogenní index, který udává poměr mezi celkovým a HDL cholesterolem. Tento poměr, dosahuje-li hodnot vyšších jak 4,5, znamená vysoké riziko.

Také hypertriacylglycerolémie se může podílet na aterogenezi, i když ne tak významně. Jelikož se ale často kombinuje se sníženou hladinou HDL cholesterolu, je třeba ji zmínit. Obecně je spojována spíše s akutní pankreatitidou (14).

Většina těchto metabolických poruch je způsobena primární hyperlipoproteinémií. Tato je způsobena geneticky, faktory zevního prostředí se ale mohou významně podílet. Sekundární hyperlipoproteinémie jsou způsobené jinou nemocí. Tyto nemoci se tedy také mohou podílet na rozvoji aterosklerózy. Některá onemocnění se kryjí s našimi rizikovými faktory, zmíním proto pouze například hypotyreózu, ledvinová onemocnění, mentální anorexii, alkohol, ale také léky, zvláště kortikoidní hormony, diuretika či beta-blokátory (20).

Hodnoty celkového cholesterolu pod 5 mmol/l, LDL cholesterolu pod 3 mmol/l, triacylglycerolů pod 2 mmol/l a HDL-cholesterolu nad 1 mmol/l se považují za hraniční žádoucí hodnoty (14).

### *Kouření*

Je jeden z nejvýznamnějších rizikových faktorů. Vyvolává endoteliální dysfunkci, hemodynamický stres, zvyšuje koagulaci a způsobuje dyslipidemie, arytmie, prohlubuje hypoxii, dále zvyšuje viskozitu krve s vážnými důsledky. Tyto změny jsou vratné, pokud pacient úplně přestane kouřit, vyrovná se nekuřákovi během roku až dvou. Kouří-li pacient jednu krabičku denně, je jeho riziko náhlé smrti o 70% vyšší než u nekuřáků.

### *Hypertenze*

Jako alarmující rizikové hodnoty tlaku krve můžeme považovat tlak krve nad 160/95 mm Hg u mužů středního věku. U takovýchto osob je riziko komplikací zvýšeno 5x oproti normě. Nebezpečným je především zvýšený systolický tlak krve.

Cílové hodnoty se liší dle rizika. Neměly by dosahovat 140/90 mm Hg (3). Pod 130/85 mm Hg se pak snažíme snížit tlak u osob s prokázaným KVO, diabetem a poruchou ledvin (4).

### *Diabetes mellitus (DM) a porucha glukózové tolerance (PGT)*

U diabetiků je riziko ICHS 2-4x vyšší, riziko CMP 3x vyšší než u touto nemocí nepostížených populace. Mají nejen vyšší riziko, ale i horší prognózu oproti nediabetikům. Uvádí se, že na komplikace ATS umírá okolo 80% pacientů s DM. U nemocných s DM by se mělo postupovat stejně jako u nemocných v sekundární prevenci, protože mají stejné riziko aterosklerotických komplikací. Vše je způsobeno hyperglykemií a s ní související glykací lipoproteinů a souběžným výskytem dalších rizikových faktorů, které jsou často přítomny (3).

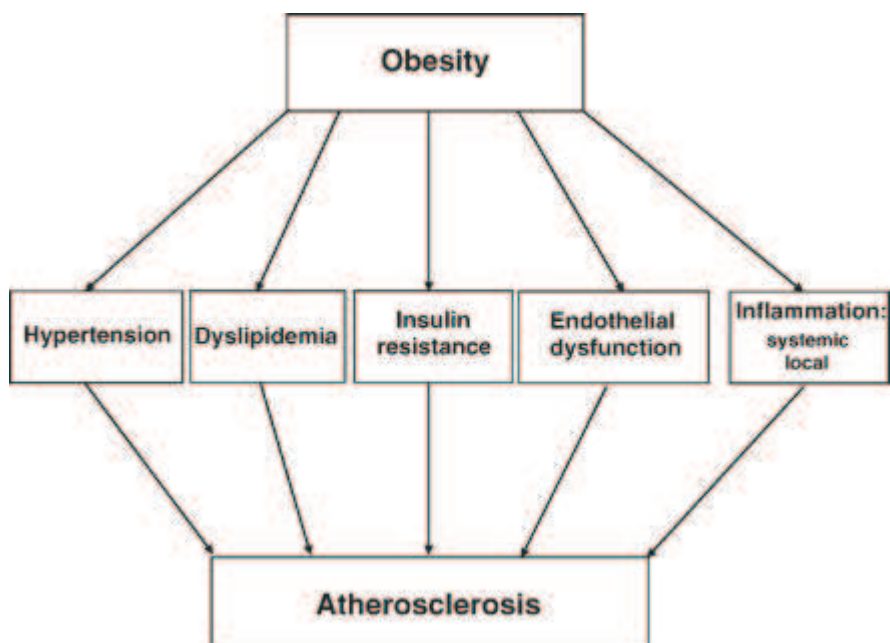
### *Fyzikální inaktivita*

Nedostatek pohybu a sedavý způsob života patří mezi další rizikové faktory (1). Existují doporučení, jak vhodně postupovat pro snížení KVO a neublížit (4).

### *Obezita*

Zvyšující se body mass index (BMI) nezpůsobuje pouze kardiovaskulární mortalitu, ale roste i celková úmrtnost na nádory i jiná onemocnění (3). Obezita sama patří mezi rizikové faktory ICHS, zároveň potencuje další rizikové faktory, jako hyperlipidémii, hypertenzi či non inzulin dependentní diabetes mellitus (NIDDM). Nebezpečný je zvláště androidní typ obezity. Ideální BMI by neměl překročit hodnotu 25 (1).

**Obrázek 3: Obezita a její vliv na rozvoj aterosklerózy (21)**



<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/75/4/690/F1.medium.gif> (26. 4. 2011)

### *Metabolický syndrom:*

Toto metabolické onemocnění vzniká kombinací několika rizikových faktorů najednou. Zahrnuje abdominální obezitu a alespoň dvě z následujících poruch: hypertenzi, zvýšenou glykémii nalačno či DM, hypertriglyceridémii a snížený HDL cholesterol (5).

Dalším zajímavým znakem je zvýšený výskyt malých denzních LDL (22).

**Tab. 9 Další rizikové faktory** (1, 3, 5)

Koagulační rizikové faktory:
zvýšený Lp(a), fibrinogen, koagulační faktory VII, VIII, PAI-1
Ostatní rizikové faktory:
hyperhomocysteinémie (zatím nepotvrzeno)
zánět (zvýšený CRP, infekce bakteriální, virové)
typ chování
stupeň vzdělání (VS vzdělání mají nižší riziko)

### *Trombogenní a koagulační faktory*

Fibrinogen a jeho zvýšené hladiny v séru jsou považovány za nezávislý rizikový faktor aterosklerózy. Podporuje koagulaci a je stejně jako C-reaktivní protein (CRP) ukazatelem zánětlivé reakce (1, 3).

Velice nebezpečným se zdá být lipoprotein (a) (Lp(a)), jehož apo(a) specifický glykoprotein je nalézán v aterosklerózou postižených lézích. Apo(a) je podobný plasminogenu. Lp(a) je velice bohatý na cholesterol, výše jeho plazmatických hladin je dědičná a velice variantní. Pouze nikotinová kyselina dokáže snížit jeho hladinu. Na většinu léků snižujících cholesterol nereaguje. Způsobuje zvýšení proliferace hladkých svalových buněk, do poškozených cév vnáší cholesterol a zabraňuje vzniku plazminu (23). Poslední vlastnost je dána kompeticí apo(a) s plasminogenem o receptor, čímž zabraňuje fibrinolýze.

Dalšími sledovanými parametry jsou zvýšený inhibitor aktivátoru plasminogenu (PAI-1) či faktory VII a VIII (3).

### *C-reaktivní protein (CRP)*

CRP je nezávislý rizikový faktor produkovaný při akutní fázi zánětu. Jeho syntézu v játrech vyvolává interleukin-6 (IL-6) produkovaný monocyty. Slouží jako ukazatel zánětlivého procesu, kdo však způsobuje zvýšení jeho hladin v souvislosti s aterosklerózou, není jasné. Může to být zánět v cévní stěně, ale i v organismu, vzniklý působením jiného zánětlivého procesu. Dokonce se uvažuje o aterogenezi vzniklé působením samotného CRP.

Každopádně byla prokázána souvislost mezi výskytem ICHS a vyššími hladinami CRP (3).

### *Hyperhomocysteinémie*

Homocystein je neesenciální aminokyselina vznikající jako meziproduct metabolismu methioninu. Je pokládán za významný rizikový faktor předčasné aterosklerózy, protože způsobuje tvorbu reaktivních radikálů, poškozují endotelie, krevní buňky i lipoproteiny a snižuje koncentraci NO. Navíc podporuje tvorbu koagulačních faktorů a inhibuje trombolýzu.

V USA proto přidávají do potravin kyselinu listovou, bohužel však i při snížení koncentrace homocysteinu pokles kardiovaskulárních komplikací zaznamenán nebyl (3, 22).

### *Typ chování*

Souvislost typu chování A (manažerský typ) s progresí aterogeneze nebyla stále potvrzena (22).

Bylo ale zjištěno, že lidé s chováním typu D, mají 4x vyšší celkovou i kardiovaskulární mortalitu. Pro vzorec chování typu D je typické potlačování emocí a prožívání především těch negativních. Například ve studii NHANES bylo riziko IM zvýšené o 50% u pacientů s depresemi v anamnéze ve srovnání s nedeprisivní populací (17).

### **3.3 Etiopatogeneze aterosklerózy**

Vznik aterosklerózy v minulosti podepíraly především dvě teorie: teorie endoteliálního poškození a teorie lipidová. Tyto dvě teorie byly sjednoceny. O slovo se také hlásí infekční teorie, která předpokládá vliv bakteriálních a virových infekcí jak na vznik endotelové dysfunkce, tak zánětlivé reakce. Vznik endotelové dysfunkce se vysvětluje tvorbou imunitních komplexů, které vnitřní stěnu cévy poškozují. S touto teorií koresponduje zvýšená koncentrace zánětlivého CRP, zmíněného výše, který řadíme mezi rizikové faktory a který slouží jako indikátor infekcí. Hovoří se zvláště o infekcích způsobených Chlamydiemi, *Helicobacterem pylori* a herpes viry včetně Cytomegaloviry.

Na progresi aterogeneze se kromě lipidů podílejí buňky hladké svaloviny, makrofágy vznikající z monocytů, trombocyty a T-lymfocyty (3).

#### **3.3.1 Vliv endoteliální dysfunkce na proces aterogeneze**

Endotel nefunguje pouze jako semipermeabilní bariéra mezi krví a intersticiem. Bylo potvrzeno, že se podílí i na udržení homeostázy (24). Řídí a kontroluje napětí cévní stěny a její růst, adhezi a interakce trombocytů a leukocytů, koagulaci a fibrinolýzu. Porušení funkce endotelu vede k rozvoji aterosklerózy. Endotel je schopen reagovat na signály vyvolané navázáním na membránové receptory i na změny hemodynamické (25).

Mezi takové signály můžeme zařadit virovou infekci, stres, či jiné aktivační faktory, například katecholaminy, cytokiny, hyperhomocysteinémii, oxidovaný LDL či glykosylační faktory vzniklé následkem hyperglykémie. Z hemodynamických faktorů pak můžeme představit turbulentní proud. Zprvu dochází k aktivaci endotelu, avšak tento jev je oproti endoteliální dysfunkci krátkodobý (26). Poznotek o aktivaci endotelu je důležitý, dříve se totiž předpokládalo, že rozvoj aterogeneze způsobuje ztráta endotelu (27).



Při dlouhodobém působení cigaretového kouře, hypertenzi, hyperlipidémií či při chronickém onemocnění DM, dochází ke zvýšení propustnosti cévní stěny s nerovnováhou mezi vazoaktivními i hemokoagulačními působky. Vzniká endotelová dysfunkce.

Mezi základní fyziologické funkce endotelu patří:

**Cévní permeabilita.** Endotel zajišťuje a kontroluje průchod nízkomolekulárních látek, makromolekul i buněk mezi krví a tkáněmi. Dojde-li k poškození endotelu či jeho aktivaci, může docházet k akumulaci látek v subendotelu. V souvislosti s aterosklerózou si představme zvláště akumulaci lipoproteinů a leukocytů.

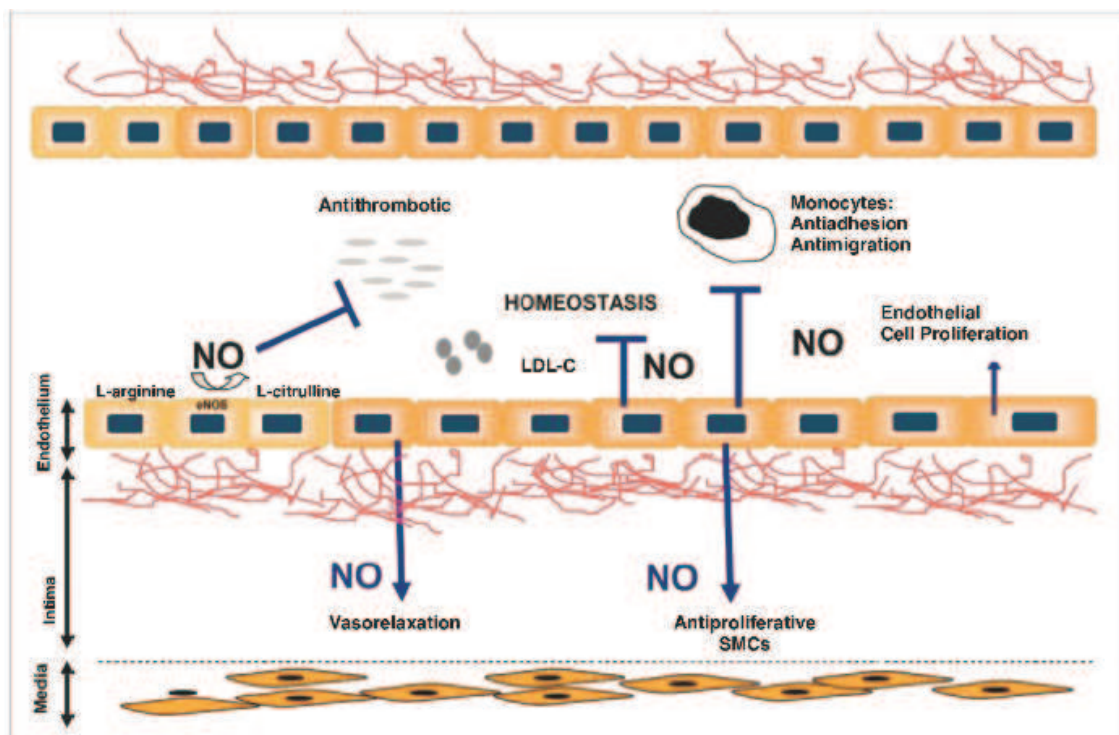
**Napětí cévní stěny.** Ovlivňování cévní stěny souvisí s kontrolou průtoku krve, který se endotel snaží udržet optimální. Ten je schopen aktivovat a degradovat vazoaktivní látky, například přeměnou angiotenzinu I či inaktivací bradykininu. Dále syntetizuje vazodilatační prostaglandiny (PGI<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub>) či oxid dusnatý (NO), neboli endoteliální relaxační faktor (EDRF), ale i vasokonstrikční endotelin 1 (ET<sub>1</sub>).

NO je velice důležitá molekula s řadou funkcí. Je syntetizována z L-argininu pomocí NO syntázy (NOS), která existuje ve dvou izoformách. Fyziologicky účinný konstitutivní eNOS se vyskytuje v endoteliích, zatímco indukibilní iNOS v makrofázích se podílí na rozvoji patologických procesů. Jeho uvolňování je stimulováno cytokiny (26).

**Tab. 10 Funkce NO/EDRF a důsledky snížené tvorby (3)**

Funkce	Důsledky nedostatku v procesu aterogeneze
vasodilatace	vasokonstrikce
inhibice adheze a agregace trombocytů	zvýšená adheze a agregace trombocytů prokoagulační pochody
inhibice proliferace hladkosvalových buněk	proliferace a migrace hladkých svalových buněk
antioxidant – ochrana LDL před oxidací	oxidace LDL, jejich kumulace, tvorba pěnových buněk
inhibice chemotaktických faktorů	tvorba chemotaktických, prozánětlivých a adhezních molekul, kumulace leukocytů

**Obrázek 4: Homeostatické funkce molekuly NO (28)**



<http://www.revespcardiol.org/sites/default/files/elsevier/images/255/255v62n10/grande/255v62n10-13142654fig4.jpg> (26.4. 2011)

Činnost NO je blokována superoxidovým anionem, produkovaným makrofágy (29). NO je totiž spotřebováván při reakci s ním, stejně jako při reakci s peroxidovým lipidovým radikálem (3). Syntézu, a tím pádem i aktivitu NO, potlačuje také oxidovaný LDL, který inhibuje NO-syntázu a degraduje mRNA NO syntázy. Snížením produkce tohoto vasodilatátoru převáží vazokonstrikce (30).

Výše zmíněný shear-stress, stejně jako některé neurotransmitery, hormony a další působky, včetně hypoxie, produkci NO stimulují.

**Nesmáčivý povrch.** V důsledku syntézy vhodných vasodilatátorů a enzymů endotel brání adhezi a agregaci destiček, aktivaci koagulační kaskády a kontroluje fibrinolýzu (26).

K zajištění inhibice agregace trombocytů a adheze leukocytů opět slouží molekula NO. Proto pokles koncentrace NO v důsledku aterogeneze vede k protrombotické aktivitě. Aktivátor plazminogenu (t-Pa) a inhibitor aktivátoru plasminogenu (PAI-1) mají také porušenou

rovnováhu ve prospěch pro-koagulačních působků. Oba jsou produkováni endotelem (30).

**Reparační pochody a angiogeneze.** NO molekula působí antiproliferačně, nedostatečná produkce je spoluodpovědná za hypertofii cévní stěny. Takto působí i glykosaminoglykan a heparan sulfát (26).

Mitogeny, které produkuje endotel a které vedou k proliferaci vazivové tkáně, jsou PDGF (platelet derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor) a TGF (transforming growth factor). IL-1 (interleukin-1), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) a MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) zánětlivou reakci zesilují a způsobují chemotaxi monocytů. Mitogenně působí také M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) a GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor), tito mají také podíl na aktivaci makrofágů (30).

Mitogeny a chemoatraktanty (cytokiny) jsou produkovány nejenom endotelem, ale i makrofágy, trombocyty či hladkosvalovými buňkami. Jako signální molekula pro angiogenezi slouží VEGF (vascular endothelial growth factor) (26).

Na povrchu aktivovaných endoteliálních buněk můžeme nalézt ICAM-1 (intercellular cell adhesion molekule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molekule-1), selektiny E a P, což jsou adhezní molekuly podílející se na zánětlivé reakci díky umožnění přilnutí leukocytů (31). O významu VCAM-1 bude pojednáváno dále.

### **3.3.2 Vliv lipoproteinů na proces aterogeneze**

Lipidy plní v organismu důležité strukturální a regulační funkce. Dále představují zásobu energie. Zdrojem je potrava a endogenní syntéza. Klíčovou roli v metabolismu hrají játra (14).

Mezi lipidy vyskytující se v plazmě člověka řadíme cholesterol, triglyceridy, fosfolipidy a mastné kyseliny (1). Cholesterol a triglyceridy jsou nerozpustné ve vodě. Proto jsou v těle, které představuje vodné prostředí, transportovány ve formě lipoproteinů. Povrch těchto částic tvoří hydrofilní část fosfolipidů, volný cholesterol a bílkovinná část.

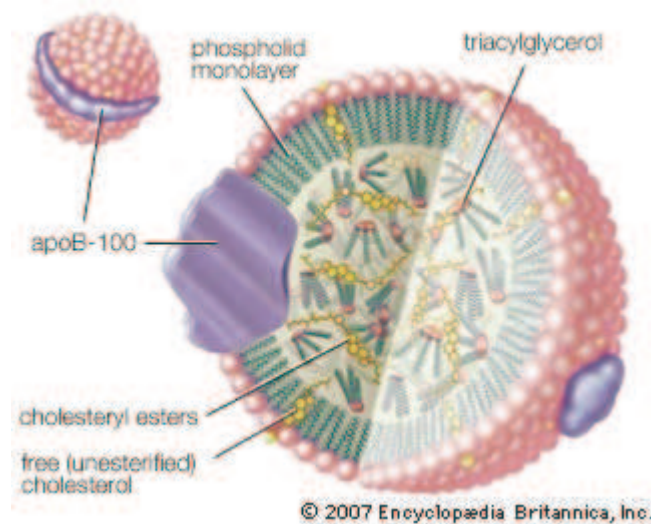
Bílkovinná část se nazývá apolipoprotein. Esterifikovaný cholesterol a triglyceridy pak tvoří hydrofobní vnitřek (32).

Apolipoproteiny neslouží pouze jako strukturální bílkoviny lipoproteinových částic, ale účastní se přenosu lipidových molekul mezi lipoproteiny, zprostředkovávají vazbu na receptory a slouží jako kofaktory enzymů (1).

Dle ultracentrifugace rozlišujeme tyto lipoproteiny (1, 32).

- Chylomikrony - CL
- Zbytky chylomikrů - CL remnants
- Lipoproteiny o velmi nízké hustotě - VLDL
- Lipoproteiny o nízké hustotě – LDL
- Lipoproteiny o střední hustotě - IDL
- Lipoproteiny o vysoké hustotě – HDL

**Obrázek 5: Struktura lipoproteinové částice (33)**



[http://data.gate2biotech.com/editor\\_images/Image/Eva/LDL.jpg](http://data.gate2biotech.com/editor_images/Image/Eva/LDL.jpg)  
(23. 4. 2011)

Z VLDL částic se v krvi působením lipoproteinové lipázy uvolňují triacylglyceroly a vznikají IDL, které mají vyšší poměr cholesterolu. IDL jsou dále štěpeny za vzniku LDL.

LDL částice jsou hlavním aterogenním lipoproteinem. Fyziologickou funkcí tohoto lipoproteinu je dodat cholesterol z jater do periferie, avšak buňky jsou schopny cholesterol syntetizovat. Jako apolipoprotein nesou apo B<sub>100</sub>, pomocí něhož se váží na LDL receptor. Zvláště nebezpečné pro aterogenezi jsou malé denzní LDL<sub>3</sub>, které snadno pronikají endotelem, podléhají modifikacím a nejsou vychytávány LDL receptory (32). Jejich průnik do cévní stěny je dán její propustností a koncentrací LDL v krevní plazmě (34). Také IDL jsou silně aterogenní, mají ale na rozdíl od LDL částic velmi krátký poločas (32).

K modifikacím LDL částic patří jejich oxidace a acetylace v krvi (12). Další možností je neenzymatická glykace apolipoproteinu, ke které dochází u diabetiků při dlouhodobé hyperglykémii (19). Modifikované lipoproteiny vedou k endotelové dysfunkci a vyvolávají expresi prozánětlivých cytokinů a adhezivních molekul ze všech buněčných elementů účastnících se aterogeneze.

Po průniku LDL do intimy peroxidace MK pomocí lipooxygenáz a reaktivních forem kyslíku (ROS) působením buněk aterogeneze pokračuje. Nejsnadněji jsou oxidované nasycené a polynenasycené MK. Tímto působením se mění kovalentní vazba s apo B (12). Proto zabráněním oxidace LDL částic by mohlo být dosaženo snížení progresu aterogeneze. Tento princip terapie by mohl fungovat aditivně ke snižování hladin LDL (35).

Modifikované LDL částice jsou přednostně vychytávány pomocí scavengerových receptorů bez zpětné regulace (12). Tyto receptory se nacházejí zvláště na makrofázích, ale i jiných buňkách. Druhou možností vychytávání LDL částic je pomocí LDL receptoru, zmíněném výše. Ten je vystaven na povrchu buněk pouze při nedostatku cholesterolu a vychytává pouze nemodifikované LDL (32).

Bylo zjištěno, že proti oxidovanému LDL vznikají autoimunitní protilátky, jejichž titry se dají stanovit. Oxidovaný LDL pak funguje jako

antigen. Stanovené výše titrů protilátek a antigenů by mohlo korelovat s vyšší kardiovaskulárního rizika (36).

Pozitivní roli v boji proti aterogenezi hraje HDL částice. Ta odnímá volný cholesterol lipoproteinům, periferním buňkám i cévní stěně a přenáší ho zpět do jater, případně v podobě esterifikovaného cholesterolu poskytuje ostatním lipoproteinům (32). Tímto mechanismem snižuje riziko ruptur, stabilizuje pláty a snižuje expanzi plátů. Spolu s antioxidantními enzymy snižuje syntézu adhezivních molekul a chrání LDL před modifikacemi. HDL cholesterol tedy zpomaluje progresi kardiovaskulárních chorob (37).

### **3.3.3 Vliv leukocytů a trombocytů na proces aterogeneze**

Aterosklerózy, jakožto zánětlivého onemocnění, se zúčastní makrofágy a T-lymfocyty. Nejprve dochází k adhezi monocytů k aktivovaným endoteliálním buňkám a jejich přeměně na makrofágy. Ty jsou zdrojem zánětlivých mediátorů, z nichž významné jsou zvláště IL-1 a TNF- $\alpha$ . Expresí těchto látek zesilují zánětlivou reakci a aktivují další buňky, ať už z vlastních řad či jiných (38). TNF- $\alpha$  a IL-1 totiž působí jako chemoatraktanty a přivolávají další makrofágy a buňky hladké svaloviny (26).

Makrofágy produkují látky, které jsou schopny okolní buňky zabít a látky degradující extracelulární matrix. K smrtícím látkám patří Fas-L, velice podobnou látku produkují i cytotoxické T-lymfocyty. Dále produkují ROS a pomocí iNOS syntetizují molekulu NO, která narušuje povrch VSMC (vascular smooth muscle cell). Mezi látky degradující extracelulární matrix patří metaloproteinázy a serinové proteázy, které způsobují destabilizaci plátu, čímž hrozí jeho ruptura (39). Matrixové metaloproteinázy (MMPs) jsou proteinové enzymy a zahrnují kolagenázy, elastázy a gelatinázy (38).

Makrofágy spolu s destičkami a pravděpodobně i endotelem produkují PDGF a TGF- $\beta$ , které působí proliferativně na fibroblasty a hladké svalové buňky (3, 23).



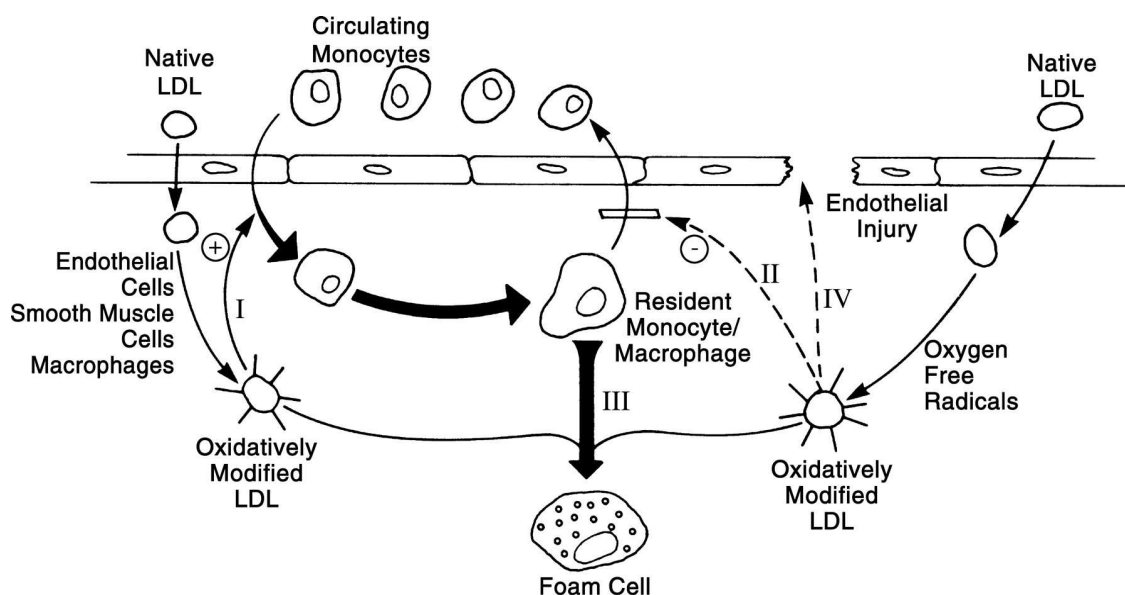
Destičkám nedokáže dysfunkční endotel zabránit v adhezi a agregaci. Ty kromě PDGF produkují také vasokonstrikční substance, například tromboxan TXA<sub>2</sub> a serotonin (6, 23).

Aterogeneze se zúčastní i T-lymfocyty, konkrétně CD4+ pomáhající T buňky typu Th1, produkující TNF- $\alpha$  a interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), a CD8+ cytotoxické T buňky. Cytotoxické T-lymfocyty sekretují Fas-ligand, který působí toxicky na okolní buňky a vyvolává jejich apoptózu (40). IFN- $\gamma$  způsobuje destabilizaci plátu, protože inhibuje tvorbu extracelulární matrix v hladkých svalových buňkách. Zároveň však T-lymfocyty, které jsou v subendotelu aktivovány makrofágy, stimulují proliferaci a migraci hladkých svalových buněk a působí aktivačně i na ostatní buňky (26).

Th1 typ lymfocytů převládá zvláště v počátečních fázích nemoci. V pozdějších nastupují hlavně Th2 lymfocyty, produkující Il-4, Il-5 a Il-6. B-lymfocyty se vyskytují vzácně (41).

Na expresi adhezivních molekul a prozánětlivých cytokinů z makrofágů, T-lymfocytů i destiček mají také vliv modifikované LDL částice, které ovlivňují i endotel. Aktivované makrofágy mají na svém povrchu dva receptory, scavengerový a LDL-receptor. LDL-receptory působením zpětné vazby velmi pomalu vychytávají pouze nemodifikovaný LDL. Modifikovaný LDL se vychytává právě prvně jmenovaným receptorem a to velmi rychle. Toto vychytávání není regulováno zpětnou vazbou a vznikají pěnové buňky (12). Takto modifikovaná částice již není schopná vycestovat ze subendotelu a časem dochází k apoptóze fagocytujících buněk působením toxických částic. To vede k další fagocytóze či ke vzniku nekrotických zbytků, podporujících nestabilitu plátu (26).

**Obrázek 6: Interakce endotelu, LDL částic a makrofágů v procesu aterogeneze (42)**



<http://www.jlr.org/content/46/10/2037/F4.large.jpg> (23. 4. 2011)

### 3.3.4 Vliv buněk hladké svaloviny na proces aterogeneze

Hladké svalové buňky reagují na cytokiny produkované okolními buňkami. Vyskytují se ve dvou fenotypech, a to kontraktilním a syntetickým. K proliferaci a sekreci je syntetický fenotyp stimulován například prostřednictvím cytokinů TGF- $\beta$  a PDGF. Il-1 a zmíněný TGF- $\beta$  jsou schopni stimulovat autosekreci PDGF hladkosvalovou buňkou (23, 26, 43).

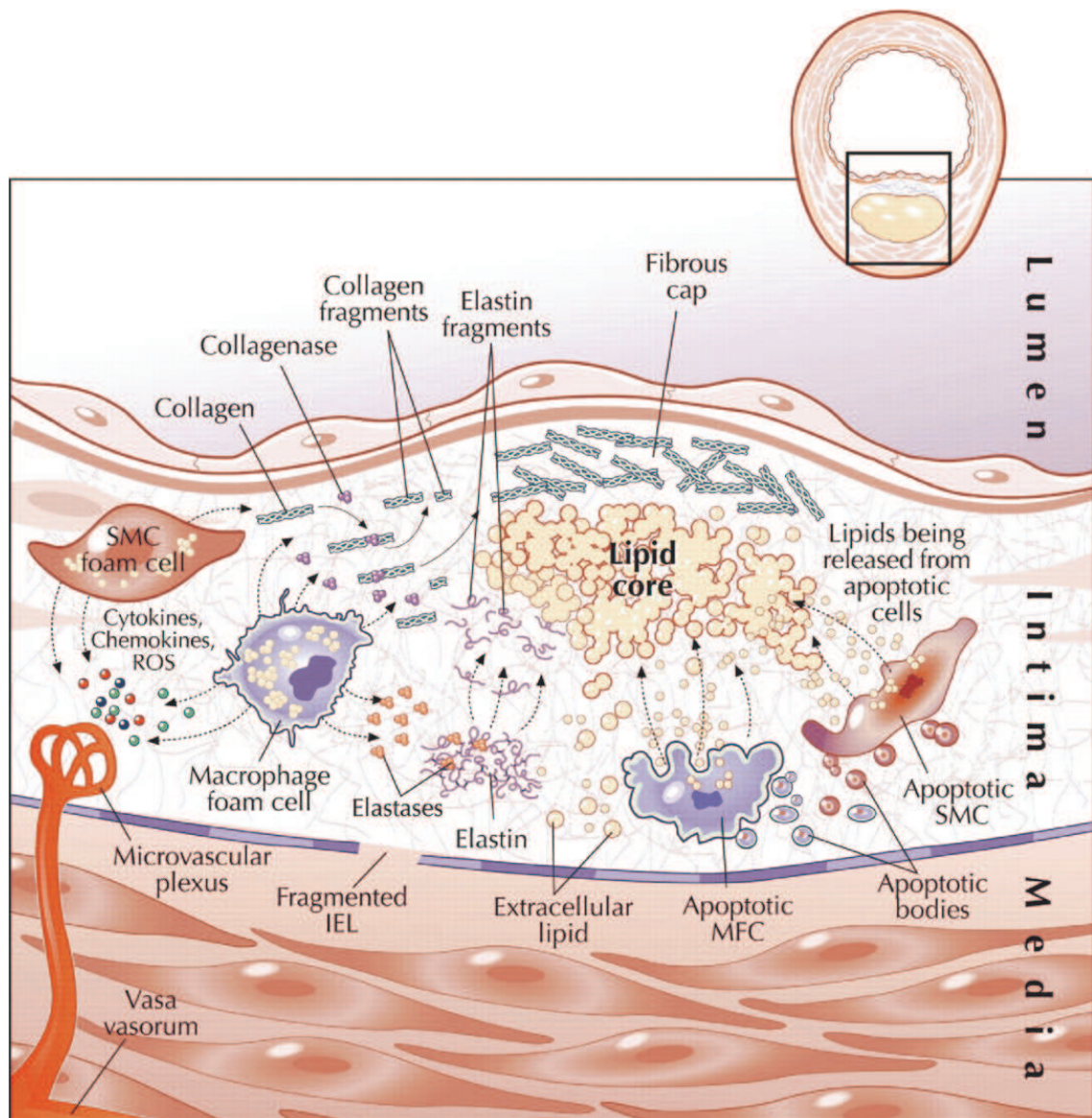
Výše uvedené cytokiny jsou sekretovány aktivovanými endoteliemi, leukocyty i agregujícími trombocyty. Dokonce mají schopnost přeměnit kontrakční fenotyp v sekreční. Vlivem chemotaktických působků dochází k migraci myocytů z medie do subendoteliálních prostor. Zde syntetizují extracelulární matrix, tedy kolagenní a elastická vlákna a samy proliferují. Důsledkem je zúžení lumen cévní stěny, v pozdním stádiu aterogeneze však nabývá na významu, že stabilizují plát. Tvoří totiž fibromuskulární složku (26).



Proliferaci extracelulární matrix naopak inhibuje NO, PGI<sub>2</sub>, INF-γ a heparan sulfát (44).

Buňky hladké svaloviny mají na svém povrchu LDL-receptory, díky nimž si vychytávají cholesterol, kolik potřebují. Během aterogeneze se však mohou samy měnit v pěnové buňky, protože dochází k akumulaci lipidů uvnitř buněk následkem vystupňované funkce (3).

**Obrázek 7: Proces aterogeneze (45)**



[http://content.onlinejacc.org/content/vol48/9\\_Suppl\\_A/images/large/06019966.gr3.jpeg](http://content.onlinejacc.org/content/vol48/9_Suppl_A/images/large/06019966.gr3.jpeg) (25. 4. 2011)

### **3.3.5 Stupně vývoje aterogeneze a komplikace**

#### **➤ Tukové proužky**

Počáteční fáze aterogeneze začíná velmi nenápadně, v intimě cévy lze nalézt pouze izolované pěnové buňky, což jsou skupiny makrofágů s lipidy v cytoplazmě. Již u malých dětí dochází k tomuto jevu.

Následně se vytvářejí tukové proužky, ty mohou být tvořeny i buňkami hladké svaloviny, které vcestovaly do intimy a které také obsahují kapénky lipidů. Lipidy jsou převážně uspořádány intracelulárně, ale extracelulární výskyt je též možný. Estery cholesterolu jsou nejčastější formou. Přítomny jsou i T-lymfocyty (CD4 i CD8).

Tukové proužky mohou, ale také nemusí, progredovat. Progredující typ obsahuje více pěnových buněk, hladkých svalových buněk a extracelulární matrix.

V ascendentní aortě jsou tukové proužky přítomny u 99% dětí ve věku 2-15 let. Po 30. roce věku narůstá výskyt i v abdominální aortě (3). Tento stupeň vývoje je dlouhou dobu reverzibilní. Pokud nejsou přítomny přetrvávající rizikové faktory, většinou se resorbují (12).

#### **➤ Aterosklerotický plát**

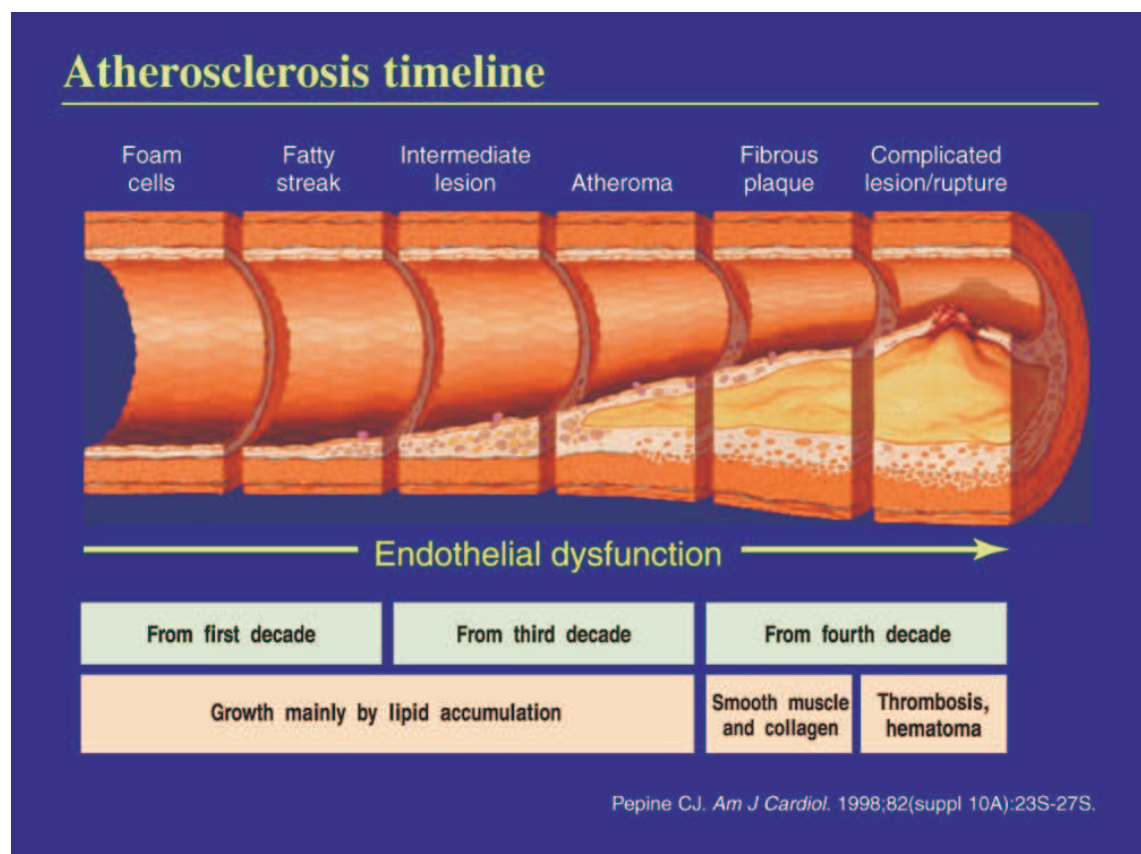
Určitým mezistupněm mezi tvorbou pěnových buněk a ateromem je separace extracelulárně uložených lipidů od makrofágů a hladkých svalových buněk. Lipidy jsou kromě esterů cholesterolu více tvořeny volným cholesterolem, mastnými kyselinami a triacylglyceroly. Této fázi se říká intermediární (3).

Kromě makrofágů, T-lymfocytů a hladkých svalových buněk obsahuje aterosklerotický plát rozrůstající se extracelulární matrix, skládající se z kolagenu, elastických vláken a proteoglykanů. Lipidy jsou přítomny intracelulárně i extracelulárně. Složení a poměr vyjmenovaných složek může být různý. Na povrchu léze se nachází fibrózní čepička z hladkých svalových buněk a kolagenu, zatímco vedle čepičky i vespod nalezneme makrofágy a T-lymfocyty. Hlouběji se

vyskytuje nekrotické jádro obsahující krystaly cholesterolu i jeho estery, pěnové buňky tvořené makrofágy a hladkými svalovými buňkami a zbytky mrtvých buněk. Navíc je přítomen i fibrin, podporující trombózu. Může docházet ke kalcifikaci a neovaskularizaci. Některé pláty nemusí téměř obsahovat lipidové jádro (46).

Zpočátku malé pláty rostou především do média, teprve s nárůstem zasahují do lumen a omezují průtok krve. Dochází ke vzniku stenóz, které jsou ze 70-80% v koronárních artériích excentrické a u kterých hrozí ve zdravé části spasmy. Druhým, méně častým typem, jsou stenózy koncentrické (12).

**Obrázek 8: Fáze aterosklerózy (47)**



<http://www.unimedico.co.uk/images/upload/Atherosclerosis%20timeline.jpg> (23. 4. 2011)

**Stabilita aterosklerotických plátů.** Stabilita plátu je dána složením plátu a rozsahem zánětlivých procesů. Velikost a konzistence jádra a síla fibrózního krytu jsou faktory zastupující složení plátu. Dále je důležitý poměr zánětlivých a reparativních procesů. Čím vyšší je syntéza kolagenu, tím vyšší je stabilita. Naopak čím vyšší je syntéza proteolytických enzymů MMPs a syntéza cytokinů typu TNF makrofágy, tím nižší je stabilita. K nestabilitě také přispívají produkty T-lymfocytů, konkrétněji IFN- $\gamma$  a IL-2, dále povrchový CD40, kterým T-lymfocyty aktivují MMPs makrofágů.

Rozlišujeme dva základní typy aterosklerotických plátů:

#### ***A. Stabilní aterosklerotický plát***

Je typický malým lipidovým jádrem a hlavně vysokým obsahem kolagenu, elastinu a hladkých svalových buněk ve fibrózní čepičce. Množství zánětlivých buněk je nízké. Jsou obvykle starší, stálé, ale hemodynamicky významné.

#### ***B. Nestabilní aterosklerotický plát***

Nestabilní plát je náchylný k ruptuře a představuje riziko akutních koronárních komplikací, jejich množství je ale nízké. Synonymem pro nestabilní je vulnerabilní. Bývá mladý.

Skládá se z velkého lipidového jádra polotekuté konzistence. Jádro je tvořené estery cholesterolu a velkým množstvím zánětlivých buněk a je přikryto tenkou fibrózní vrstvou (3).

Faktory podporující vznik ruptury zahrnují mimo jiné náhlou aktivaci sympatiku a fyzickou námahu, rychlé meteorologické změny, emoční stres či cirkadiánní rytmy (12).

**Tab. 11 Obsah složek ve stabilního a nestabilního plátu (44)**

Obsah složek [%]	Stabilní plát	Nestabilní plát
Lipidy	10	40
Pěnové buňky	10	30
Hladké svalové buňky	10-15	3-5

➤ **Komplikovaná léze**

V důsledku ruptury a eroze plátu je do krve vyplaveno mnoho trombogenních faktorů a vzniká trombus. Sraženina může uzavřít cévu a způsobit ischemii orgánu, případně se trombus může rozpustit vlivem fibrinolytické aktivity nebo se inkorporuje do rostoucího plátu. Části trombu nebo zbytky z léze mohou také embolizovat po proudu. Dalším jevem způsobeným prasknutím, je krvácení do plátu, kdy vzniklý hematom iniciuje prasknutí plátu či jeho zvětšení. Zeslabení cévní stěny, způsobené ztrátou elastických vláken, vede ke vzniku aneuryzma (46).

Některé ruptury probíhají klinicky nezaznamenaně, pouze při převážení protrombotických mechanismů vzniká okluze s klinickými projevy (27).

**Tab. 12 Klinická manifestace aterosklerózy a příklady některých postižení (3, 23)**

Komplikace	Místo postižení	Důsledek postižení
Stenóza	koronární artérie artérie dolních kočetin renální artérie mezenterické artérie	stabilní angina pectoris klaudikační potíže atrofie, sekundární hypertenze ischemické příhody břišní
Okluze	koronární artérie cerebrální artérie mezenterické artérie	akutní infarkt myokardu cévní mozková příhoda gangréna střev
Embolizace tromby	abdominální aorta -> popliteální artérie	gangréna končetiny
Aneurysma	abdominální aorta	ruptura, vaskulární kolaps



## 4 MYŠÍ MODELY

Při volbě zvířecího modelu pro výzkum aterosklerózy je třeba volit zvíře, které vykazuje lézi podobnou lidské a které má podobný metabolismus a profil lipoproteinů. Dále je třeba zvážit dobu, za kterou se léze vyvine, cenu chovu, možnosti manipulace, zobrazení a zasahování do genomu zvířete (48).

Pro studium patogeneze a možností léčby aterosklerózy bylo využito mnoho druhů zvířat. Již v roce 1908 zaznamenáváme první experiment s aterosklerózou, kdy Ignatowski (49) udává u králíků krmených stravou bohatou na proteiny rozšíření intimy v aortě. Kromě králíků byla jako nejefektivnější zvířata využívána prasata a primáti. Avšak králičí léze jsou příliš odlišné od lidských, chov prasat a primátů je cenově náročný. Myší modely se při studiu mechanismu aterosklerózy začaly v posledních letech prudce využívat.

S myšími modely je spojena řada výhod i nevýhod. Mezi klady patří relativně jednoduché a levné udržování chovu, krátký čas vývoje od početí po sexuální dospělost a možnost genetické modifikace.

Myši ale mají mnoho odlišností oproti člověku. Zatímco střední délka života člověka průměrně představuje 75 let, myši 2 roky. Váží pouze 30 gramů, jejich velikost tedy hlavně dříve způsobovala technické problémy, například při chirurgickém zasahování. Tyto potíže jsou však s vývojem technologie překonány. Většinu cholesterolu myši tvoří HDL, zatímco u člověka 75% cholesterolu je zastoupeno LDL. To vysvětluje odolnost myši proti ateroskleróze (48).

Používáme několik typů modelů myši. Základními modely jsou dietou indukované myší modely a geneticky upravené modely, které také mohou zároveň být modifikované dietou.

**Dietou indukované modely.** Tento typ modelů se používal jako první. Kromě kmene C57BL/6 jsou myši velice rezistentní k ateroskleróze. Myši kmene C57BL/6 krmené vysoce cholesterolovou stravou obsahující cholesterolem vyvolávají vaskulární léze. Oproti lidským jsou však odlišné histologicky i umístěním, navíc mohou přejít

v chronický zánětlivý proces. Již v 60. letech byly myši krmeny ve Wisslerově laboratoři speciální dietou. Ta zahrnovala 30% tuků, 5% cholesterolu a 2% cholové kyseliny. Dieta však byla příliš toxická, myši trpěly respiračními infekcemi a ztrácely na váze. Proto Paigen a kol. rozdělil jednu část na tři s 10% obsahem tuku a tím dietu upravil na 15% tuku, 1,25% cholesterolu a 0,5% cholové kyseliny (50).

Bohužel léze byly malé, vyvíjely se pouze v kořenu aorty do fáze tukových proužků s malým obsahem hladkých svalových buněk. Navíc zvířata měla problém s přežitím vzhledem k dietě bohaté na tuky. Léze nevykazovaly podobnost lidským po otázce patologické a jejich vytváření nebylo zopakovatelné. Některé problémy se vyřešily křížením a užíváním speciálních kmenů myší.

**ApoE-deficientní myši.** Průlomem v používání myších modelů byl rok 1992, kdy se podařilo vyřadit gen pro apolipoprotein E (apo E) (48). Gen kódující Apo E je zapojený do metabolismu lipidů. Tento apolipoprotein se řadí mezi glykoproteiny. Syntetizován je u lidí i myší a to zvláště v játrech, mozku, ale i jiných tkáních. Kromě LDL částic je strukturální součástí všech lipoproteinů. Má vysokou afinitu k receptoru chylomikronových remnant a k LDL receptoru. Umožňuje vychytávání částic obsahujících apo E v játrech. Jeho chybění způsobuje prodlouženou cirkulaci a akumulaci cholesterolem bohatých částic v plazmě, což vede k rozvoji aterosklerózy (51).

Velikou výhodou tohoto modelu je, že aterosklerotické léze se vyvíjejí již při běžné stravě. Proces se dá ale urychlit pomocí tzv. Western-type stravy, která se podobá průměrné americké stravě a je tedy fyziologičtější. Tuto stravu tvoří 21% tuků a 0,15% cholesterolu (48, 52).

ApoE-deficientní myši neztrácejí váhu na rozdíl od výše uvedených případů, od zdravých myší se ale odlišují hladinou lipidů i lipoproteinů. Mají 5x vyšší hladiny cholesterolu oproti normálu, naopak hladina HDL klesá na 45% původní hodnoty. Také hladiny triglyceridů se zvyšují o 68%. Fenotyp těchto myší odpovídá fenotypu apoE-deficientních pacientů.



Stejně jako u lidí se i u těchto myši vyvíjejí pěnové buňky, které dále progredují do fibroproliferativního stádia s nekrotickým lipidovým jádrem, krytým fibrózní čepičkou. Na rozdíl od lidského plátu však myši nevykazují rupturu. Důvodem je nejspíše průměr aorty, který je u myši tak malý, že se nedokáže vyvinout napětí, které by vyvolalo rupturu.

**LDL-receptor deficientní myši (LDLR-KO).** V důsledku chybění LDL receptoru mají tyto myši zvýšené hladiny LDL. Aby se vyvinulo fibro-proliferativní stádium vyžadují LDLR-KO krmení pomocí stravy zvané „Western-type“, zmíněné výše.

**Další typy myších modelů.** Kromě výše uvedených dvou typů geneticky upravených myších modelů se můžeme setkat s jejich kombinací: apoE/LDL-receptor dvojitě deficientními modely, apoE/eNOS dvojitě deficientními modely a dalšími (48).

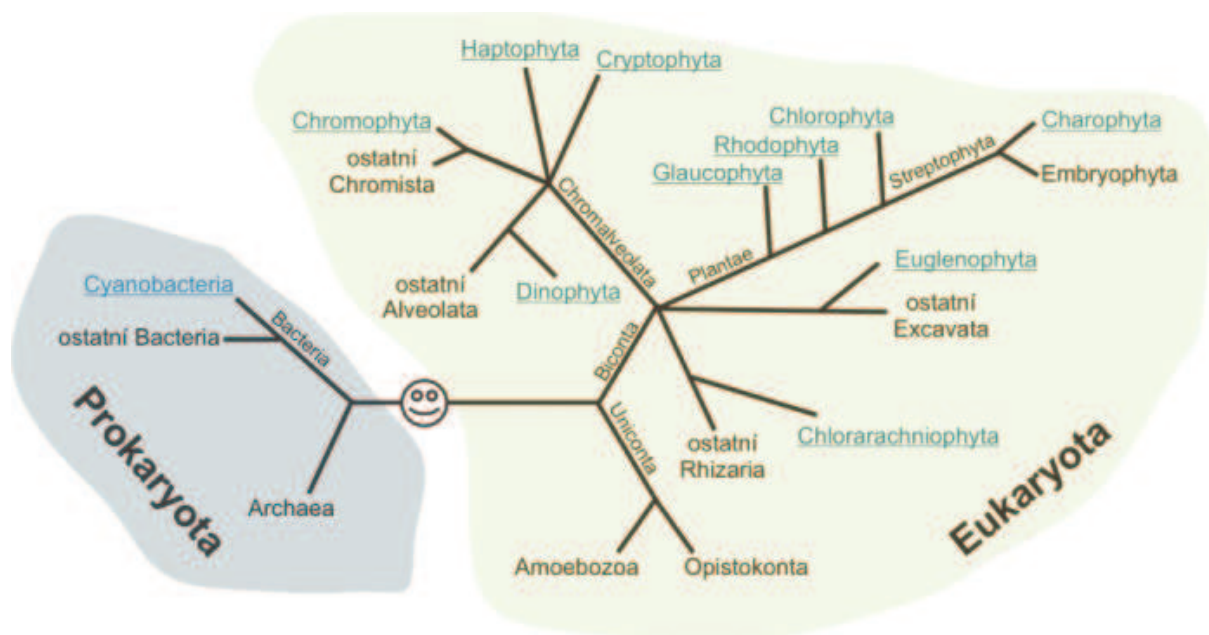
## 5 SPIRULINA PLATENSIS

*Spirulina platensis* je mikroskopická vláknitá řasa, využívaná lidmi jako potravinový doplněk. Obsahuje mnoho makro- a mikroelementů, například proteiny, které tvoří 60-70% její váhy. Dále vitamíny, hlavně skupiny B a karotenoidy, minerály, zvláště železo a esenciální aminokyseliny a mastné kyseliny jako kyselinu  $\gamma$ -linolenovou. O Spirulině se uvažuje jako o doplňkovém léčebném prostředku k prevenci i léčbě různých nemocí (7, 53). Je doloženo, že již staří Aztékové po tisíciletí používali tuto řasu. Také domorodci z oblasti Čadského jezera řasu znali. (54). Spirulině *platensis* prospívají zvláště alkalické tropické a subtropické teplé oblasti, kde je mnoha zeměmi komerčně pěstována (55).

Tato modrozelená řasa, řadící se k fotosyntetizujícím cyanobaktériím, ovlivňuje v těle biologické i imunitní funkce. Zvyšuje odolnost vůči infekcím, například vůči chřipce, herpes virům, Cytomegaloviru, jsou prokázány i účinky proti HIV. Zvyšuje aktivitu leukocytů a produkci protilátek a cytokinů. Její extrakt působí protektivně vůči rakovině, díky antioxidantnímu působení chrání orgány před toxicitou. Má pozitivní vliv na střevní mikroflóru. Upravuje metabolismus cukrů a tuků (56, 57). Její schopnost snižovat hladinu cholesterolu je zkoumána mnohými preklinickými i klinickými studiemi (7).

Cyanobacteria je synonymum pro sinice. Jedná se o oddělení spadající pod prokaryota. Označení pochází z řeckého slova *cyanos*, neboli modrý, proto sinice, jelikož v českém jazyce *sinný* znamená modrý. *Spirulina platensis* představuje pro přírodovědce chybné označení, upřednostňují *Arthrospira platensis*. Patří pod řád Oscillatoriales, jejichž hlavním znakem je jednoduchá vláknitá struktura nevětveného typu (58).

**Obrázek 9: Taxonomické dělení sinic, bakterií a řas (59)**



<http://www.sinicearasy.cz/sites/default/files/pseudostrom3a.jpg> (24. 4. 2011)

*Spirulina platensis* obsahuje proteiny, tzv. fykokyanobiliny, známé jsou především phycocyanin či allophycocyanin. Bylo prokázáno, že proteinový extrakt potlačuje mikrozomální peroxidaci lipidů a funguje jako scavenger volných radikálů, hlavně hydroxylového a peroxidového. Bylo zjištěno, že největší antioxidační aktivitu vykazuje phycocyanin (PC), protože se zvyšujícím obsahem PC aktivita stoupá (60).

K dalším účinkům PC patří jeho protirakovinné a protizánětlivé působení, které je dáno jeho schopností selektivně inhibovat indukovatelnou cyklooxygenázu-2, jejíž aktivita je zvýšena právě při zánětu, ale i při rakovinovém bujení (61).

PC je pigment modré barvy produkovaný kromě cyanobakterií odděleními rhodophyta (ruduchy) a cryptofyta (skrytěnky). Právě *Spirulina platensis* slouží v současné době jako hlavní zdroj PC. Vykazuje antioxidační fluorescenční vlastnosti a nachází uplatnění zvláště v biotechnologii, potravinářském průmyslu, při diagnostice a v medicíně (58, 62).

Během kultivace se může biomasa Spiruliny obohacovat o některé stopové prvky, kupříkladu o železo, jód, zinek, selen a další (53). Selen patří mezi antioxidanty, který se s ostatními antioxidantně působícími látkami a antioxidantními enzymy podílí na ochraně organismu před volnými radikály, jako je superoxidový anion či jiné reaktivní látky. Hraje důležitou roli v prevenci aterosklerózy i jiných onemocnění (63). Mezi antioxidantní enzymy patří například glutathion peroxidáza (GSH-Px), jehož je selen součástí. Bylo zjištěno, že pacienti postižení akutním infarktem myokardu vykazují oproti kontrolní zdravé skupině populace nižší hladinu selenu v plazmě, moči i v erytrocytech, zatímco GSH-PX aktivita erytrocytů byla zvýšena, nejspíše v důsledku obrany proti dlouhodobému oxidačnímu stresu. Při porovnávání plazmatické GSH-Px aktivity s kontrolní skupinou rozdíl nebyl významný (64).

Efekt Spiruliny a PC a jejich selenem obohacené formy v prevenci aterosklerózy byl vyzkoušen například na křečcích. Studie zabývající se redukcí NADPH oxidázy a oxidačního stresu byla podepřena o znalost, že ateroskleróza je onemocnění, jejíž vznik vychází z kombinace tří teorií. Tyto teorie předpokládají oxidační, zánětlivý a hypercholesterolemický vliv na proces aterogeneze. Proto vědci předpokládali, že PC může díky svým antioxidantním, protizánětlivým a hypocholesterolemickým vlastnostem zasáhnout spolu s antioxidantně působícím selenem do vývoje onemocnění.

Selenem obohacenou Spirulinu pracovníci získali tak, že přidali  $\text{SeO}_2$  do média a nechali řasu růst ve fotobioreaktorech v prostředí o vysokém pH, PC byl poté izolován. Křečci pak byli rozděleni do pěti skupin po osmi, tedy celkově bylo použito čtyřicet křečků. Všichni dostávali po 12 týdnů speciální aterosklerózu způsobující dietu. Navíc jednotlivým skupinám byl žaludeční sondou přidáván o určitém množství phycocyanin (PC), selenem obohacený phycocyanin (SePC), Spirulina (SP) a selenem obohacená Spirulina (SeSP). Poslední skupina, dostávající pouze vodu, sloužila jako kontrola, se kterou se porovnávaly výsledky. Zjistilo se, že ve skupině SePC se snížila plazmatická hladina cholesterolu a non-HDL cholesterolu. Dále vzrostla antioxidantní aktivita

o 42%, z toho superoxid dismutaza o 56%, glutathion peroxidaza o 87%. Spolu s PC skupinou byly redukovány tukové proužky v aortě o více než 80%. Kromě kontrolní skupiny se ve všech skupinách snížila srdeční produkce superoxidového anionu o 46-76%, zvláště však ve skupině SePC, jíž odpovídá nejvyšší uvedená hodnota poklesu. V této skupině také klesla exprese NADPH oxidázy o 34%.

Zjistilo se, že konzumace SePC představuje silně účinnou prevenci rozvoje onemocnění, zvláště pokud trvá dlouhodobě. SePC nejenže zlepšuje sérový profil lipidů, ale hlavně inhibuje oxidační faktory (65).

## **6 IMUNOGLOBULINOVÁ SKUPINA ADHEZNÍCH MOLEKUL**

Imunoglobulinová (Ig) skupina adhezních molekul je velká rodina povrchových buněčných molekul, která představuje 50% všech povrchových molekul leukocytů. Jsou to molekuly glykoproteinového charakteru, tvořené opakujícími se Ig doménami z beta řetězců (66).

Zprostředkovávají jak homofilní (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na stejnou molekulu ve druhé), tak heterofilní interakce (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na neidentickou molekulu ve druhé buňce) (67).

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

Někteří členové této rodiny adhezních molekul jsou významní ve vztahu k ateroskleróze. Mezi nejvýznamnější zástupce patří vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (68).

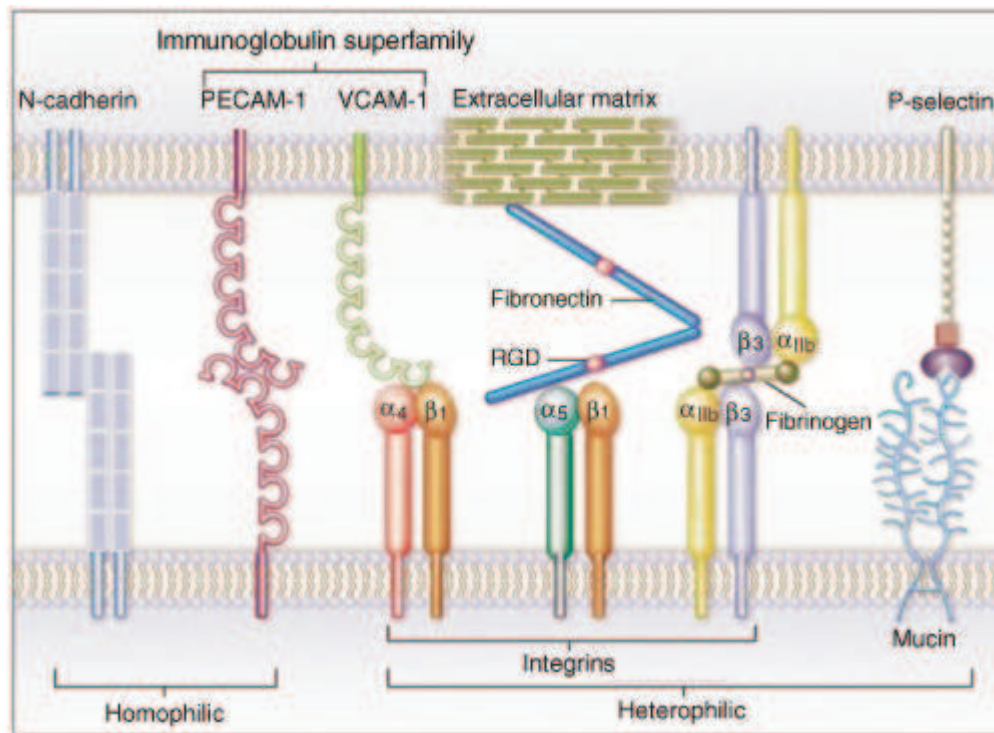
### **6.1 Struktura a funkce VCAM-1**

VCAM-1 je adhezivní molekula. Tento transmembránový glykoprotein obsahuje N-konec, sérii Ig domén, transmembránovou oblast a cytoplazmatický konec. VCAM-1 má 7 extracelulárních domén.

VCAM-1 interaguje s integriny  $\alpha_4 \beta_1$  a někdy také s  $\alpha_4 \beta_7$ . VCAM-1 účinky, které se projevují zanedbatelně na nestimulovaných endoteliálních buňkách, mohou být výrazně regulované po cytokinové aktivaci. Tato CAM podporuje adhezi lymfocytů a monocytů k cévnímu endotelu v místě zánětu (69).

VCAM-1 může také stabilizovat vazbu leukocytů k endotelu a podílí se na jejich diapedezi. VCAM-1 zřejmě navíc selektivně vychytává mononukleární leukocyty, protože ty na rozdíl od neutrofilů exprimují  $\alpha_4$  integriny (70).

**Obrázek 10: Struktury základních adhezních molekul (71)**



[http://labs.idi.harvard.edu/wagner/multimedia/cache/Images/image1\\_595.jpg](http://labs.idi.harvard.edu/wagner/multimedia/cache/Images/image1_595.jpg) (5. 5. 2011)

## 6.2 Exprese VCAM-1

VCAM-1 je exprimován endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkými svalovými buňkami (72). Při studiích na králících a myších bylo zjištěno, že VCAM-1 je exprimován na endoteliálních buňkách ještě před akumulací makrofágů a T lymfocytů v oblastech, které jsou předurčeny ke vzniku lézí. Přičemž lokalizace těchto míst je často ovlivněna hemodynamickými vlastnostmi, především tzv. shear stresem. U malých aterosklerotických lézí je VCAM-1 exprimován především na endoteliálních buňkách a zároveň je exprimován i hladkosvalovými buňkami, které přiléhají k aterosklerotické lézi. U pokročilejších aterosklerotických lézí je VCAM-1 exprimován většinou buněk v intimě cév.

Expresi VCAM-1 je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují i v patogenezi aterosklerózy. Kupříkladu hypercholesterolémie, oxidované LDL a diabetes zvyšují expresi VCAM-1 (73). Také kouření, hyperhomocysteinémie, hemodynamický stres (nízký shear stress) expresi VCAM-1 zvyšují (74).



## **7 CÍL PRÁCE (ZADÁNÍ)**

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

## **8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **8.1 Zvířata a předepsaná dieta**

Samci myši kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E (apoE<sup>-/-</sup>) vážící 15-20 gramů, byly získány z Jackson Laboratories (USA). Všechny myši ve věku 3 měsíce byly poté náhodně rozděleny do 2 skupin.

Následně jim začala být podávána aterogenní dieta s obsahem 1% cholesterolu po dobu 8 týdnů (kontrolní skupina). Ve Spirulina platensis skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou, ke které bylo přidáváno 20 mg Spiruliny 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 vyláčněna 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.

### **8.2 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).

### 8.3 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 (králik) |
| 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.

### 8.4 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  $\mu\text{m}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$ . 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 nesespecifická 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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.

*Použitá primární protilátka:*

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

*Použitá sekundární protilátka:*

sekundární protilátka goat anti-rat IgG (Vector Laboratories)

*Pracovní postup:*

1. oschnutí řezů (60min)
2. fixace v acetonu (-20°C; 15min)
3. sušení řezů (15min)
4. promytí v PBS (2x5min)
5. aplikace 10% zvířecího séra v PBS (30min)
6. inkubace s avidinem D (15 min)
7. promytí v PBS (5min)
8. inkubace s biotinem (15min)
9. promytí v PBS (oplach)
10. aplikace primární protilátky ředěné s BSA (inkubace 60min)
11. promytí v PBS (2x5min)
12. aplikace 10% zvířecího séra v PBS (15min)
13. aplikace sekundární protilátky (+ mouse sérum v PBS) (inkubace 30min)
14. promytí v PBS (5min)
15. promytí v 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 min)
16. promytí v PBS (2x5min)
17. ABC komplex elite (30min)
18. oplach v PBS (5min)
19. inkubace s DAB (doba inkubace dle návodu)
20. oplach v destilované vodě
21. odvodnění řezů (aceton) (oplach)
22. odvodnění řezů (aceton-xylen 10:1) (3 min)
23. odvodnění řezů (aceton-xylen 1:10) (3 min)
24. odvodnění řezů (xylen) (3x2 min)
25. montování řezů do Eukittu

## **8.5 Statistická analýza**

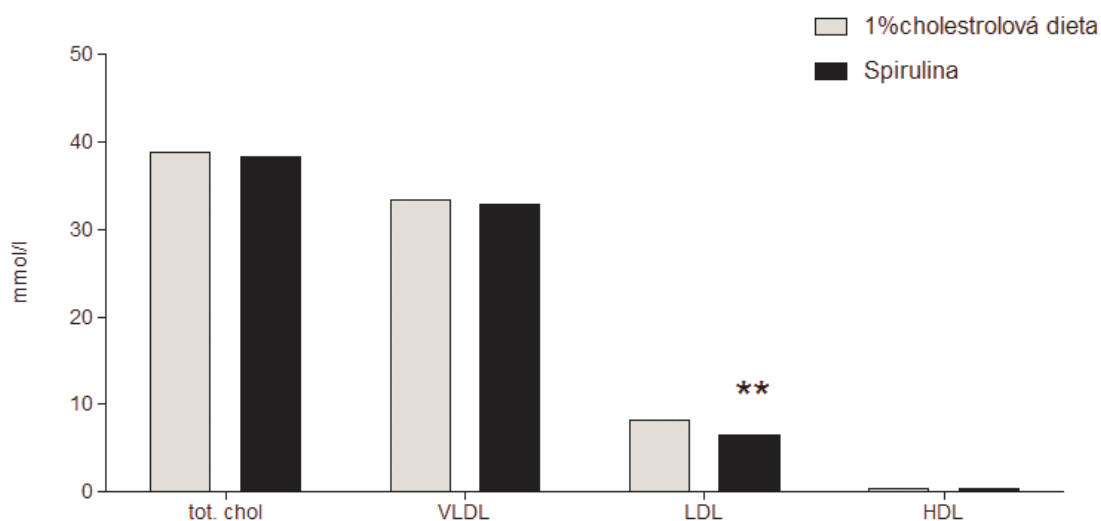
Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u Spirulinové a kontrolní skupiny byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že  $p \leq \alpha$ , kde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

## 9 VÝSLEDKY

### 9.1 Biochemická analýza

Výsledky biochemické analýzy prokázaly jenom slabý vliv podávané Spiruliny na hladiny cholesterolu. Pouze hladina LDL cholesterolu byla signifikantně snížena.

**Graf 1: Lipidový profil u myši kontrolních a myši krmených Spirulinou platensis**



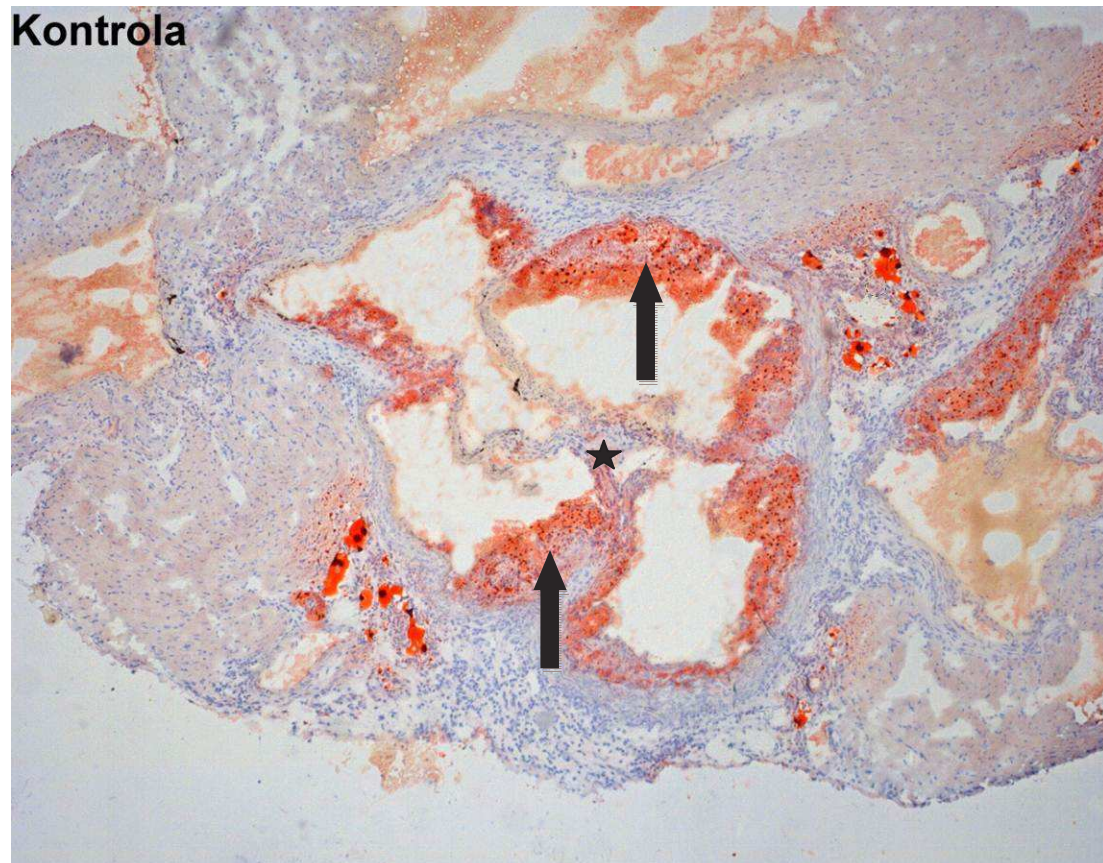
**Osmítýdenní podávání Spiruliny nevedlo ke statisticky významnému poklesu hladin celkového cholesterolu. (\* $P < 0,01$ )**

### 9.2 Histologické barvení olejovou červení

U všech řezů v kontrolní i Spirulinou léčené skupině byla pozorována přítomnost aterosklerotických lézí (obr. 11). 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 nevedlo k patrnému snížení plochy barvení olejovou červení a tedy k poklesu velikosti plátů (obr. 12).



**Obrázek 11: Reprezentativní obrázek barvení olejovou červení u kontrolní skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů cholesterolová dieta**



**Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní (hvězdička). Zvětšení preparátu 40x.**

**Obrázek 12: Reprezentativní obrázek barvení olejovou červení u skupiny zvířat, kterým byla podávána 8 týdnů cholesterolová dieta společně se *Spirulinou platensis***



**Šipky ukazují na akumulaci lipidů v aterosklerotických lézích. Intenzita a plocha barvení olejovou červení není změněna ve srovnání s kontrolní skupinou. Zvětšení preparátu 40x.**

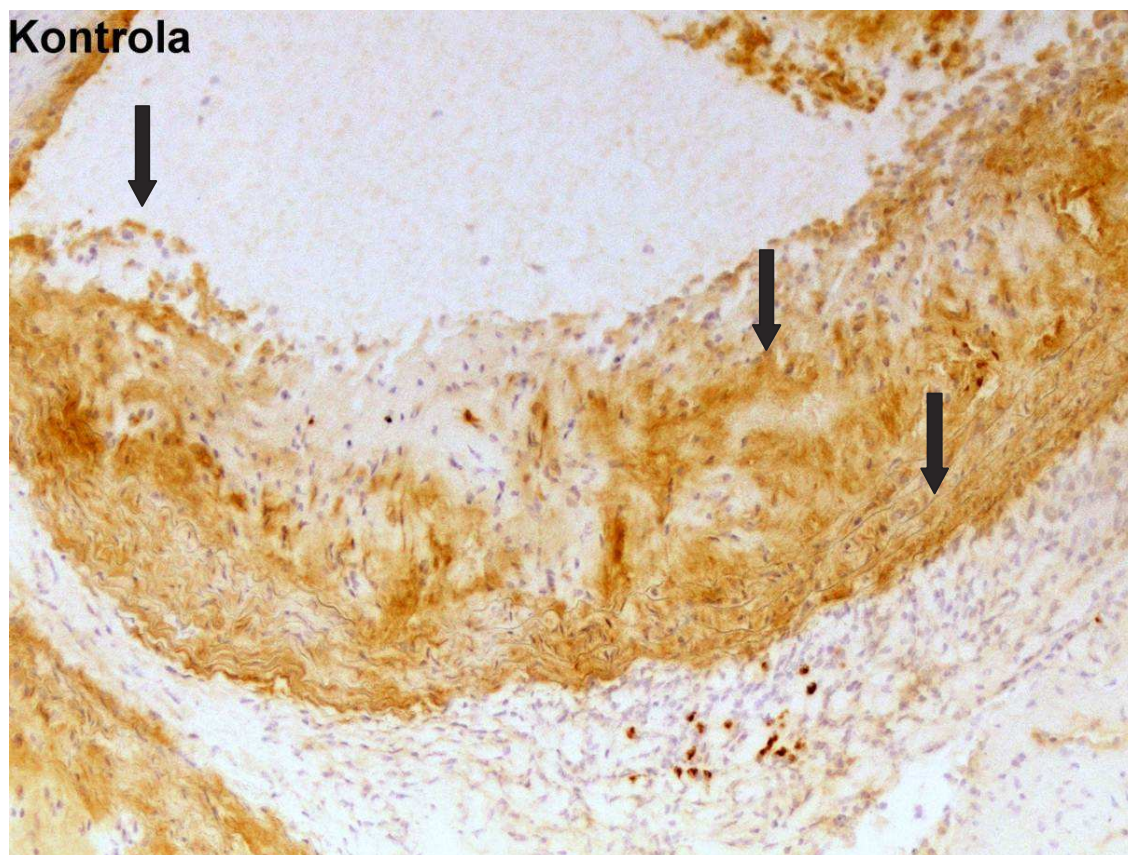


## 9.3 Imunohistochemická analýza

### 9.3.1 Imunohistochemické barvení VCAM-1 v oblasti aortálního sinu

Exprese VCAM-1 byla pozorována u všech myší v experimentu. Barvení bylo viditelné v medii cév pod aterosklerotickými pláty. Dále byla pozorována exprese v aterosklerotických plátech. Silná exprese byla zjevná také na cévním endotelu v oblasti plátu i mimo něj (obr. 13). Po prohlédnutí 40 řezů z každé skupiny můžeme konstatovat nižší expresi VCAM-1 ve skupině myší, kterým byla podávána Spirulina. Ta byla slabší zejména v oblasti plátu (obr. 14).

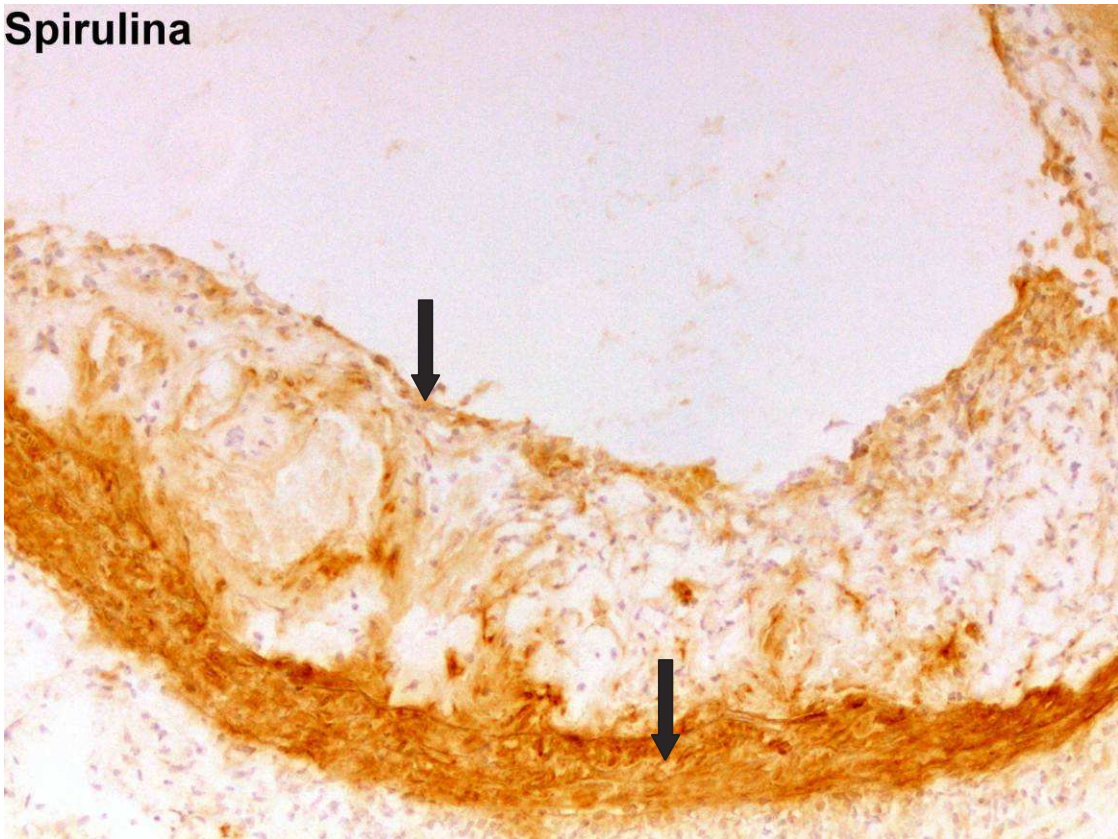
**Obrázek 13: Representativní obrázek imunohistochemického barvení VCAM-1 u kontrolní skupiny zvířat**



**Silná exprese je pozorována v medii cévy pod aterosklerotickým plátem, v plátu a na cévním endotelu (šipky). Zvětšení 100x.**

**Obrázek 14: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení VCAM-1 u skupiny zvířat, kterým byla podávána Spirulina**

**Spirulina**



**Pokles exprese VCAM-1 je pozorován zejména v oblasti plátu. Zvětšení 100x.**

## 10 DISKUZE

Ateroskleróza je difúzní proces, který začíná v časném dětství, postupně asymptomaticky progreduje a v dospělosti se klinicky manifestuje jako ICHS, ischemické poškození centrálního nervového systému a periferní cirkulace (75).

Ateroskleróza, jakožto onemocnění velkých tepen, je charakterizována akumulací lipidů, přítomností zánětlivých elementů, buněk hladkého svalstva a extracelulární matrix v subendoteliálních vrstvách stěny tepny. Přes řadu pokroků v poznacích o tomto onemocnění zůstávají ateroskleróza a její komplikace vedoucími příčinami morbidity a mortality ve vyspělých zemích (76).

V současné době se k ovlivnění aterosklerózy používá řada substancí včetně těch, které jsou získávány přímo v přírodě. Proto se tato diplomová práce také zaměřila na studium potenciálních účinků *Spiruliny platensis*, na aterogenezi u apoE-deficientního kmene myši.

Použití geneticky modifikovaných myši je z hlediska aterogeneze nutností, protože „normální“ myš není schopna rozvoje aterosklerózy (48). 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 (77).

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 (53). Řasa obsahuje přibližně 65%



bílkovin, včetně všech osmi esenciálních aminokyselin, a proto je ideálním doplňkem stravy pro sportovce, vegany, starší a oslabené lidi (78).

Zdá se však, že za pozitivní efekty Spiruliny mohou jiné obsahové látky. Některé studie prokázaly, že phycocyanin obsažený v tomto extraktu má působit jako silný antioxidant metabolických produktů volných radikálů (65) ROS (reactive oxygen species), ale byly prokázány také jeho hypolipidemické efekty (79). Dalšími obsahovými látkami jsou tzv. fykokyanobiliny, které mají podobnou strukturu jako bilirubin. Phycocyanin je navázan na fykokyanobilin. Právě u bilirubinu byly prokázány zajímavé antiaterogenní, protizánětlivé účinky v souvislosti s kardiovaskulárními nemocemi (80, 81). Z těchto důvodů jsme chtěli sledovat, jestli podávání Spiruliny platensis povede k antiaterogenním účinkům. Jako experimentální model byly použity apoE-deficientní myši kterým byla navíc podávána cholesterolová dieta kvůli potenciaci aterosklerózy. Podávání Spiruliny vedlo k velmi mírnému snížení hladin celkového cholesterolu. Signifikantní pokles se projevil pouze v LDL frakci. Tyto výsledky tak částečně potvrzují již publikované hypolipidemické účinky (82). Dále jsme se zaměřili na sledování velikosti plátů. Zde, zdá se, nedošlo k ovlivnění velikosti plátů podávanou Spirulinou, což zřejmě souvisí s tím, že celkový cholesterol a hlavní lipoproteinová frakce VLDL nebyly ovlivněny podáváním Spiruliny.

Dále jsme sledovali případné protizánětlivé účinky. Jako marker zánětu jsme zvolili adhezní molekulu VCAM-1. VCAM-1, patřící mezi buněčné adhezní molekuly, se účastní každé fáze vývoje aterosklerotických lézí (69).

Imunohistochemická analýza VCAM-1 exprese prokázala snížení exprese VCAM-1 zejména v aterosklerotickém plátu po podávání Spiruliny. Tento účinek je do jisté míry překvapivý a naznačuje možný vliv jednotlivých komponent Spiruliny platensis na proces aterogeneze, částečně nezávisle na hladinách cholesterolu. Významným kandidátem těchto účinků jsou právě fykokyanobiliny. Nicméně tato teorie musí být

dále potvrzena. Také se předpokládá zvýšení dávky Spiruliny za účelem průkazu jejích hypolipidemických a antiaterogenních účinků.

## 11 ZÁVĚR

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

Výsledky biochemické analýzy potvrdily hypolipidemický efekt *Spiruliny platensis* pouze na hladiny LDL cholesterolu.

Výsledky histochemické analýzy neprokázaly snížení velikosti aterosklerotických plátů

Výsledky imunohistochemické analýzy prokázaly snížení exprese VCAM-1 u myší, kterým byla podávána *Spirulina platensis*.

Výsledky této diplomové práce tedy prokázaly částečné hypolipidemické a protizánětlivé účinky, které však musí být ověřeny v dalších studiích zejména při vyšších dávkách *Spiruliny platensis*.



## 12 SEZNAM ZKRATEK

apo(a)	apolipoprotein (a)
Apo B	apolipoprotein B
Apo E	apolipoprotein E
BCR	receptor B-lymfocytů (B cell receptor)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
CAM	buněčné adhezivní molekuly (cell adhesion molecules)
CL	chylomikrony
CMP	cévní mozková příhoda
CRP	C-reaktivní protein
DAB	diaminobenzidin
DM	diabete mellitus
EDRF	endoteliální relaxační faktor
eNOS	endoteliální NO syntáza
ET <sub>1</sub>	endotelin 1
FGF	fibroblast growth factor
GM-CSF	granulocyte macrophage-colony stimulating factor
GSH-Px	glutathion peroxidáza
H <sub>2</sub> O	voda
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoproteins)
ICAM-1	mezibuněčná adhezní molekula-1 (intercellular cell adhesion molekule-1)
IDL	lipoproteiny o střední hustotě (intermediate density lipoproteins)
IFN-γ	interferon γ
Ig	imunoglobulin
ICHDK	ischemická choroba srdeční
ICHS	ischemická choroba srdeční

IL-1, 2, 5, 6, 8	interleukin-1, 2, 5, 6, 8
iNOS	inducibilní NO syntáza
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins)
LDLR-KO	LDL-receptor deficitní myši
Lp(a)	lipoprotein(a)
MCP-1	monocytární chemotaktický protein-1
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor
MK	mastná kyselina
MMPs	matrixové metaloproteinázy
mRNA	mediátorová/informační ribonukleotidová kyselina (messenger RNA)
NHANES	National Health and Nutrition Examination Study
NIDDM	non inzulin dependentní diabetes mellitus
NO	oxid dusnatý (nitric oxide)
NOS	NO syntáza
OCT	tissue freezing medium, zmrazovací směs
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu
PBS	fosfátový pufr
PC	phycocyanin
PDGF	destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor)
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E
PGI <sub>2</sub>	prostacyklin
PGT	porucha glukózové tolerance
ROS	reactive oxygen species
SEM	střední chyba průměru
SeO <sub>2</sub>	oxid seleničitý
SePC	selenem obohacený phycocyanin
SeSP	selenem obohacená Spirulina platensis
SP	Spirulina platensis
TCR	receptor T-lymfocytů (T cell receptor)

TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$ (transforming growth factor $\beta$ )
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$ (tumor necrosis factor $\alpha$ )
t-PA	tkáňový aktivátor plazminogenu
TXA <sub>2</sub>	tromboxan A <sub>2</sub>
VCAM-1	cévní adhezní molekula-1 (vascular cell adhesion molekule-1)
VEGF	cévní endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low density lipoproteins)
VSMC	cévní hladké svalové buňky (vascular smooth muscle cell)

## 13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) ČEŠKA, R. *Cholesterol a ateroskleróza. Léčba hyperlipidemií*. 2. vyd. Praha: Maxdorf, 1999. 226 s. ISBN 80-85800-95-0.
- (2) HRADEC, J.; BÝMA, S. *Ischemická choroba srdeční - novelizace 2009. Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře*. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2009. [s. 2]. ISBN 978-80-86998-36-7.
- (3) ŠPINAR, J.; VÍTOVEC, J. a kol. *Ischemická choroba srdeční*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2003. [s. 19-46]. ISBN 80-247-0500-1.
- (4) BÝMA, S.; HRADEC, J. *Prevence kardiovaskulárních onemocnění - novelizace 2009. Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře*. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2009. [s. 1, 8]. ISBN 978-80-86998-32-9.
- (5) VLČEK, J.; FIALOVÁ, D. a kol. *Klinická farmacie I*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2010. [s. 109-111]. ISBN 978-80-247-3169-8.
- (6) KLENER, P. et al. (ed.). *Kardiologie, angiologie. Vnitřní lékařství. Svazek 2*. 1. vyd. Praha: Galén, 2001. [s. 309, 311]. ISBN 80-7262-106-8.
- (7) BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *J App Phycol*. 1993, vol. 5, no. 2, s. 235-241.
- (8) DOUGLAS, F. Paulsen. *Histologie a buněčná biologie*. 1. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská, 2004. [s. 157-162]. ISBN 80-7319-024-9.
- (9) JUNGUEIRA, L. Carlos; CARNEIRO, José; KELLEY, Robert O. *Základy histologie*. 1. vyd. Jinočany: H & H, 1997. [s. 204-206]. ISBN 80-85787-37-7.
- (10) <http://www.teachpe.com/anatomy/artery.jpg> (23. 4. 2011).
- (11) <http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/vascularmodelingpage/circsystempage/capillaries/largegifs/capillarytypeslarge.gif> (23.4.2011).

- (12) ŠTEJFA, M. a kol. *Kardiologie*. 3 vyd. Praha: Grada Publishing, 2007. [s. 471-474]. ISBN 978-80-247-1385-4.
- (13) MAČÁK, J.; MAČÁKOVÁ, J. *Patologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. [s. 171]. ISBN 80-247-0785-3.
- (14) NAVRÁTIL, L. a kol. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2008. [s. 312-313]. ISBN 978-80-247-2319-8.
- (15) POVÝŠIL, C.; ŠTEINER, I. et al. *Speciální patologie*. 2. vyd. Praha: Galén, 2007. [s. 1-2]. ISBN 978-80-7262-494-2.
- (16) VOKURKA, M.; HUGO, J. a kol. *Velký lékařský slovník*. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2002. [s. 732]. ISBN 80-85912-43-0.
- (17) VOJÁČEK, J.; KETTNER, J. (ed.). *Klinická kardiologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK, 2009. [s. 47, 49]. ISBN 978-80-87009-58-1.
- (18) MARTÍNKOVÁ, J. et al. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2007. [s. 213, 215]. ISBN 978-80-247-1356-4.
- (19) BRAUNWALD, E.; FAUCI, AS.; KASPER, DL. et al. (ed.). *Harrison's principles of internal medicine*. 15th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. [s. 1379, 1384]. ISBN 0-07-007272-8.
- (20) MAREK, J. a kol. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 1998. [s. 470-471]. ISBN 80-7169-499-1.
- (21) <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/75/4/690/F1.medium.gif> (26. 4. 2011).
- (22) SVAČINA, Š. et al. *Poruchy metabolismu a výživy*. 1. vyd. Praha: Galén, 2010. [s. 297]. ISBN 978-80-7262-676-2.
- (23) RUBIN, R.; STRAYER, DS. et al. (ed.). *Rubin's Pathology : clinicopathologic foundations of medicine*. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. [s. 402, 403, 408]. ISBN 978-07817-9516-6.
- (24) PETTY, RG.; PEARSON, JD. Endothelium—the axis of vascular health and disease. *J R Coll Physicians Lond*. 1989, vol. 23, no. 2, s. 92–102.

- (25) CELERMAJER, DS. Endothelial dysfunction: Does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997, vol. 30, no. 2, s. 325–333.
- (26) BULTAS, J.; CÍFKOVÁ, R.; ČEŠKA, R. et al. *Od endoteliální dysfunkce k ischemické chorobě srdeční.* 1. vyd. Praha: Galén, 1999. 127 s. ISBN 80-7262-026-6.
- (27) VOJÁČEK, J.; MALÝ, M. a kol. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi.* 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. [s. 37-43]. ISBN 80-247-0501-X.
- (28) <http://www.revespcardiol.org/sites/default/files/elsevier/images/255/255v62n10/grande/255v62n10-13142654fig4.jpg> (26. 4. 2011).
- (29) SILBERNAGL, S.; LANG, F. et al. *Atlas patofyziologie člověka.* 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2001. [s. 236]. ISBN 80-7169-968-3.
- (30) KÁDÁR, A.; GLASZ, T. Development of atherosclerosis and plaque biology. *Cardiovasc Surg.* 2001, vol. 9, no. 2, s. 109-121.
- (31) PLUTZKY, J. Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes. *Am J Cardiol.* 2001, vol. 88, no. 8A, s. 10K-15K.
- (32) SOŠKA, V. *Poruchy metabolismu lipidů. Diagnostika a léčba.* 1.vyd. Praha: Grada Publishing, 2001. [s. 13-30]. ISBN 80-247-0234-7.
- (33) [http://data.gate2biotech.com/editor\\_images/Image/Eva/LDL.jpg](http://data.gate2biotech.com/editor_images/Image/Eva/LDL.jpg) (23. 4. 2011).
- (34) NIELSEN, LB. Transfer of low density lipoprotein into the arterial wall and risk of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1996, vol. 123, no. 1-2, s.1-15.
- (35) PARTHASARATHY, S.; STEINBERG, D.; WITZTUM, JL. The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu Rev Med.* 1992, vol. 43, s. 219-25.
- (36) HOLVOET, P.; COLLEN, D. Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1998, vol. 137, s. S33-S38.
- (37) LIBBY, P. Managing the risk of atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein. *Am J Cardiol.* 2001, vol. 88, no. 12A, s. 3N-8N.

- (38) HEGYI, L.; HARDWICK, S.J.; SIOW, R.C.; SKEPPER, J.N. Macrophage death and the role of apoptosis in human atherosclerosis. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001, vol. 10, no. 1, s. 27-42.
- (39) BOYLE, J.J. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. *Curr Vasc Pharmacol.* 2005, vol. 3, no.1, s. 63-68.
- (40) HANSSON, G.K.; LIBBY, P.; SCHÖNBECK, U.; YAN, ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res.* 2002, vol. 91, no. 4, s. 281-291.
- (41) OŠŤADAL, P. Ateroskleróza a zánět. *Cor vasa.* 1999, roč. 41, s. 299-301.
- (42) <http://www.jlr.org/content/46/10/2037/F4.large.jpg> (23. 4. 2011).
- (43) NILSSON, J. Cytokines and smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 1993, vol. 27, no. 7, s. 1184-90.
- (44) KALOUSOVÁ, M. a kol. *Patobiochemie ve schématech.* 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2006. [s. 121, 124]. ISBN 80-247-1522-8.
- (45) [http://content.onlinejacc.org/content/vol48/9\\_Suppl\\_A/images/large/06019966.gr3.jpeg](http://content.onlinejacc.org/content/vol48/9_Suppl_A/images/large/06019966.gr3.jpeg) (25. 4. 2011).
- (46) KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease.* 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2010. [s. 502-504]. ISBN 978-1-4160-3121-5.
- (47) <http://www.unimed.ac.uk/images/upload/Atherosclerosis%20time.mline.jpg> (23. 4. 2011).
- (48) JAWIEŃ, J.; NASTAŁEK, P.; KORBUT, R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiolol Pharmacol.* 2004, vol. 55, no. 3, s. 503-517.
- (49) IGNATOWSKI, A.C. Influence of animal food on the organism of rabbits. *S Peterb Izviest Imp Voyenno-Med. Akad.* 1908, vol. 16, s. 154-173.

- (50) PAIGEN, B.; MORROW, A.; BRANDON, C.; MITCHELL, D.; HOLMES, P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. 1985, vol. 57, no. 1, s. 65-73.
- (51) ZHANG, SH.; REDDICK, RL.; PIEDRAHITA, JA.; MAEDA, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992, vol. 258, no. 5081, s. 468-471.
- (52) PLUMP, AS.; SMITH, JD.; HAYEK, T.; AALTO-SETÄLÄ, K.; WALSH, A.; VERSTUYFL, JG.; RUBIN, EM.; BRESLOW, JL. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992, vol. 71, no. 2, s. 343-353.
- (53) MAZO, VK.; GMOSHINSKIĀ, IV.; ZILOVA, IS. [Microalgae Spirulina in human nutrition]. *Vopr Pitan*. 2004, vol. 73, no. 1, s. 45-53.
- (54) CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of Spirulina. *Annu Rev Microb*. 1985, vol. 39, s. 503– 526.
- (55) CIFERRI, O. Spirulina, the edible micro-organism. *Microbiol Rev*. 1983, vol. 47, no. 4, s. 551-578.
- (56) BLINKOVA, LP.; GOROBERTS, OB.; BATURO, AP. [Biological activity of Spirulina]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2001, no. 2, s. 114-118.
- (57) KHAN, Z.; BHADOURIA, P.; BISEN, PS. Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. *Curr Pharm Biotechnol*. 2005, vol. 6, no. 5, s.373-379.
- (58) KAŠTANOVSKÝ, J.; HAUER, T.; LUKAVSKÝ, J. *Oddělení Cyanobacteria – sinice* [online]. České Budějovice : Přírodovědecká fakulta JU, c2003, poslední revize 29.3.2011 [cit. 2011-04-24]. Dostupné z: <<http://www.sinicearasy.cz/pokr/sinice>>.
- (59) <http://www.sinicearasy.cz/sites/default/files/pseudostrom3a.jpg> (24. 4. 2011).
- (60) PIÑERO ESTRADA, JE.; BERMEJO BESCÓS, P.; VILLAR del FRESNO, AM. Antioxidant activity of different fractions of Spirulina



- platensis protean extract. *Il Farmaco*. 2001, vol. 56, no. 5-7, s.497–500.
- (61) REDDY, MC.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, SV.; BHAT, VB.; SRINIVAS REDDY, P.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, KM.; REDDANNA, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003, vol. 304, no. 2, s. 385-392.
- (62) ERIKSEN, NT. Production of phycocyanin--a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008, vol. 80, no. 1, s.1-14.
- (63) FANG, YZ.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002, vol. 18, no. 10, s. 872-879.
- (64) BOR, MV.; CEVIK, C.; USLU, I.; GÜNERAL, F.; DÜZGÜN, E. Selenium levels and glutathione peroxidase activities in patients with acute myocardial infarction. *Acta Cardiol*. 1999, vol. 54, no. 5, s. 271-276.
- (65) RISS, J.; DÉCORDÉ, K.; SUTRA, T.; DELAGE, M.; BACCOU, JC.; JOUY, N.; BRUNE, JP.; ORÉAL, H.; CRISTOL, JP.; ROUANET, JM. 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, vol. 55, no. 19, s. 7962-7967.
- (66) KRIEGLSTEIN, CF.; GRANGER, DN. Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am J Hypertens*. 2001, vol. 14, no. 6 Pt 2, s. 44S-54S.
- (67) MARECKOVÁ, Z.; HELLER, S.; HORKÝ, K. [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes]. *Vnitř Lek*. 1999, vol. 45, no. 1, s. 46-50.
- (68) JOSEPH-SILVERSTEIN, J.; SILVERSTEIN, RL. Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest*. 1998. vol. 16, no. 3, s. 176-182.

- (69) CYBULSKY, MI.; LICHTMAN, AH.; HAJRA, L.; IYAMA, K. Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis. *Clin Chim Acta*. 1999, vol. 286, no.1-2, s. 207-218.
- (70) BLANN, AD.; McCOLLUM, CN. Circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 1994, vol. 72, no. 1, s. 151-154.
- (71) [http://labs.idi.harvard.edu/wagner/multimedia/cache/Images/image1\\_595.jpg](http://labs.idi.harvard.edu/wagner/multimedia/cache/Images/image1_595.jpg) (5. 5. 2011).
- (72) HENNINGER, DD.; PANÉS, J.; EPPHIMER, M.; RUSSELL, J.; GERRITSEN, M.; ANDERSON, DC.; GRANGER, DN. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol*. 1997, vol. 158, no. 4, s. 1825-1832.
- (73) RICHARDSON, M.; HADCOCK, SJ.; DERESKE, M.; CYBULSKY, MI. Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-selectin by the aortic endothelium of normolipemic and hyperlipemic diabetic rabbits. *Arterioscler and Thromb*. 1994, vol. 14, no. 5, s. 760-769.
- (74) WALPOLA, PL.; GOTLIEB, AI.; CYBULSKY, MI.; LANGILLE, BL. Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995, vol. 15, no. 1, s. 2-10.
- (75) KEANEY, JF. Jr. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med*. 2000, vol. 21, no. 4-5, s. 99-166.
- (76) ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999, vol. 340, no. 2, s. 115-126.
- (77) BRESLOW, JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science*. 1996, vol. 272, no. 5262, s. 685-688.
- (78) REDDY, CM.; BHAT, VB.; KIRANMAI, G.; REDDY, MN.; REDDANNA, P.; MADYASTHA, KM. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000, vol. 277, no. 3, s. 599-603.

- (79) NAGAOKA, S.; SHIMIZU, K.; KANEKO, H.; SHIBAYAMA, F.; MORIKAWA, K.; KANAMARU, Y.; OTSUKA, A.; HIRAHASHI, T.; KATO, T. A novel protein C-phycoerythrin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J Nutr*. 2005, vol. 135, no. 10, s. 2425-2430.
- (80) MUCHOVA, L.; WONG RJ.; HSU, M.; MORIOKA, I.; VITEK, L.; ZELENKA, J.; SCHRÖDER, H.; STEVENSON, DK. Statin treatment increases formation of carbon monoxide and bilirubin in mice: a novel mechanism of in vivo antioxidant protection. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007, vol. 85, no. 8, s. 800-810.
- (81) SCHWERTNER, HA.; VÍTEK, L. Gilbert syndrome, UGT1A1\*28 allele, and cardiovascular disease risk: possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis*. 2008, vol. 198, no. 1, s. 1-11.
- (82) CHEONG, SH.; KIM, MY.; SOK, DE.; HWANG, SY.; KIM, JH.; KIM, HR.; LEE, JH.; KIM, YB.; KIM, MR. *Spirulina* prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2010, vol. 56, no. 1, s. 34-40.