

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd



**Vliv *Spirulina platensis* na endoteliální expresi
P-selektinu u myší.**

***Spirulina platensis* effects on endothelial expression of P-
selectin in mice.**

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce
Hradec Králové 2012

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.
Monika Králová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškeré myšlenky, data a jejich 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.

Ráda bych poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, cenné rady, přátelskou atmosféru při konzultacích a trpělivost při sestavování mé diplomové práce. Děkuji také svým přátelům za povzbuzení, svému psovi Jimmýkovi za rozptýlení a své rodině za jejich podporu během celého mého studia.

ABSTRAKT

Monika Králová

Vliv *Spiruliny platensis* na endoteliální expresi P-selektinu u myši.

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce: Sledovali jsme endoteliální expresi P-selektinu v aortě u apoE-deficientních myši po podávání *Spiruliny platensis*. Expresi P-selektinu byla kvantifikována pomocí stereologických metod.

Metody: V experimentu jsme použili myši samce kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E (apoE^{-/-}). Myši byly rozděleny do dvou skupin. Kontrolní skupině byla podávána aterogenní dieta s obsahem 1% cholesterolu po dobu 8 týdnů. Ve *Spirulina platensis* skupině byly myši krmeny stejnou aterogenní dietou s přídavkem 40 mg *Spiruliny* denně. Provedli jsme biochemickou analýzu krve. Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a v části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm. Pro detekci exprese P-selektinu v řezech jsme použili metodiku s avidin-biotinovým komplexem (ABC) a vizualizací pomocí diaminobenzidinu (DAB).

Výsledky: Biochemická analýza neprokázala výrazné změny v hladinách celkového cholesterolu u kontrolních myši ve srovnání se skupinou, které byla podávána *Spirulina*. Expresi P-selektinu byla pozorována u všech myši v experimentu. U obou skupin byla exprese velmi vyrovnaná a nebyly mezi nimi patrné významné změny z hlediska intenzity. Stereologická analýza potvrdila, že podávání *Spiruliny platensis* neovlivnilo endoteliální expresi P-selektinu ve srovnání s kontrolní skupinou.

Závěr: Negativní ovlivnění hladin cholesterolu a exprese P-selektinu po podání *Spiruliny platensis* může poukazovat na nízko zvolenou dávku nebo krátkou dobu podávání. Pro potvrzení *in vitro* endotel-protektivních účinků v *in vivo* podmínkách je nutná změna dávkovacího schématu.

ABSTRACT

Monika Králová

Spirulina platensis effects on endothelial expression of P-selectin in mice.

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background: We studied endothelial expression of P-selectin in aorta of apoE-deficient mice after administration of Spirulina platensis. Expression of P-selectin was quantified by using stereological methods.

Methods: We used C57BL/6J male mice with deficiency of apolipoprotein E (apoE^{-/-}) in the experiment. Mice were divided into two groups. The control group was fed by atherogenic diet with 1% of cholesterol for 8 weeks. Mice from the Spirulina platensis group were fed by the same atherogenic diet with the addition of 40 mg Spirulina platensis. We performed a biochemical analysis of blood. Immunohistochemical analysis was performed in a 1 cm aortic sinus and the aortic arch. A series of cross sections with a thickness of 7 µm were cut for the immunohistochemistry and stereology. Detection of expression of P-selectin was performed by avidin-biotin method (ABC) with visualization by diaminobenzidin (DAB).

Results: Biochemical analysis did not show significant changes in total cholesterol in mice treated with Spirulina in comparison with control mice. Expression of P-selectin was observed in all mice. There were no significant changes in intensity of expression between them. Stereological analysis confirmed that administration of Spirulina platensis did not affect the expression of endothelial P-selectin compared with the control group.

Conclusions: The negative effect on cholesterol levels and expression of P-selectin after Spirulina platensis administration can indicate a low dose or a short period of administration. To confirm *in vitro* endothelium-protective effects in *in vivo* conditions is required to change the dosing schedule.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV	9
2.1	Obecná stavba cév	9
2.2	Arterie	10
2.3	Cévní endotel	11
2.3.1	Funkce endotelu	12
2.3.2	Dysfunkce endotelu	14
3	ATEROSKLERÓZA	16
3.1	Rizikové faktory	16
3.2	Epidemiologie	17
3.3	Patogeneze	17
3.3.1	Iniciální fáze vzniku plátu – endoteliální dysfunkce	18
3.3.2	Zánět	19
3.3.3	Vznik pěnových buněk	21
3.3.4	Proliferace a migrace buněk hladké cévní svaloviny.....	22
3.3.5	Ruptura plátu a vznik trombu	24
4	MYŠÍ MODEL ATEROSKLERÓZY	27
4.1	ApoE-deficientní myši	28
5	P - SELEKTIN	31
5.1	Exprese na endotelu	31
5.2	Průřezové studie kardiovaskulárních onemocnění (rozpustný P-selektin)	33
5.3	Farmakologické intervence	34
6	SPIRULINA PLATENSIS	35
6.1	Složení	36
6.2	Příznivé účinky na kardiovaskulární onemocnění (KVO).....	36
6.3	Hypolipidemické účinky	36
6.3.1	Preklinické studie.....	37
6.3.2	Klinické studie	38
6.4	Antioxidační a protizánětlivé účinky	39
6.4.1	Preklinické a klinické studie	40
7	CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE	41
8	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
8.1	Zvířata a předepsaná dieta	42

8.2	Biochemická analýza	42
8.3	Imunohistochemie.....	42
8.3.1	Pracovní postup – ABC metodika	43
8.3.2	Kvantitativní analýza imunohistochemie – stereologická analýza	44
8.3.3	Statistická analýza.....	44
9	VÝSLEDKY	45
9.1	Biochemická analýza	45
9.2	Imunohistochemická analýza.....	45
9.2.1	Imunohistochemické barvení P-selektinu v oblasti aortálního sinu	45
9.3	Stereologická analýza exprese P-selektinu v aortě	48
10	DISKUZE	49
11	ZÁVĚR	51
12	SEZNAM ZKRATEK	52
13	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55

1 ÚVOD

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou nejčastější příčinou úmrtí v průmyslových zemích. Nelze opomenout, že nemoci oběhové soustavy se rovněž ve stále větší míře podílejí na rostoucích nákladech na zdravotní péči, a to zejména s ohledem na zvyšující se průměrnou délku života populace (1).

Ačkoli se kardiovaskulární mortalita v České republice od roku 1990 výrazně snížila, největší procento populace stále umírá na vaskulární komplikace. V roce 2009 se kardiovaskulární onemocnění podílela na celkové úmrtnosti z 45,3% u mužů a 51,4% u žen. Celkem se jedná o 54 100 úmrtí na KVO ze 107 421 úmrtí v roce 2009 (2).

Nejčastější příčinou KVO je ateroskleróza. Jedná se o onemocnění velkých a středních tepen. Vlivem rizikových faktorů dochází k poškození funkčnosti stěny tepny. Mění se její propustnost pro určité látky a do stěny vstupují cizí buňky, které se v ní ukládají a rozvíjí zde zánět. Podle současných názorů je tedy ateroskleróza považována za zánětlivé onemocnění. Na stěně cév je možno pouhým okem spatřit nažloutlé proužky, tzv. lipidní skvrny, které určitými mechanismy přecházejí v pokročilé léze a následně dochází ke vzniku ateromových plátů (3, 4).

Céva ztrácí pružnost a následkem vytvoření ateromové hmoty dochází k postupnému zužování průsvitu cévy. Často dochází k utržení části ateromového plátu (trombus) a ten pak putuje krevním řečištěm (embolus) až do vzdálenějších cév, kde může uvíznout a způsobit úplný uzávěr krevního průsvitu s následnou ischemií příslušné části lidského těla (4).

Ateroskleróza se vyvíjí několik let zcela bezpříznakově. První symptomy se objevují až s komplikacemi v pokročilých stádiích onemocnění. Ateroskleróza se klinicky manifestuje jako ischemická choroba srdeční (ICHS), cerebrovaskulární ischemická choroba nebo ischemická choroba dolních končetin (ICHDK). Mezi náhlé a potenciálně smrtící orgánové komplikace aterosklerózy patří např. infarkt myokardu (IM) nebo cévní mozková příhoda (CMP). Následné léčebné zásahy bývají zpravidla paliativní a málo efektivní, proto je nezbytné se v problematice KVO zaměřit zejména na prevenci a eliminaci rizikových faktorů (5).

Cílem této práce je pomocí imunohistochemických metod posoudit a zhodnotit vliv účinků *Spiruliny platensis* na jeden z markerů endoteliální dysfunkce, který hraje v patogenezi aterosklerózy důležitou roli. Přínosy *Spiruliny* v KVO vyplývají především z jejích hypolipidemických, antioxidačních a protizánětlivých účinků.

2 MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE CÉV

Cévní systém se podle funkce a rozměrů cévní struktury dělí na makrovaskulární (veny, arterie elastické, svalové i smíšené o průsvitu větším než 0,1 mm) a mikrovaskulární část (arterioly, metarterioly, kapiláry kontinuální, diskontinuální, fenestrované, pericytické a svalové venuly do průsvitu $\leq 0,1$ mm).

2.1 Obecná stavba cév

Cévy nad určitý průměr mají společné strukturální znaky, v určitých rysech se však mohou lišit. Přejechy mezi vyhraněnými typy jsou ale plynulé a minimální. Krevní cévy se obvykle skládají ze tří vrstev (viz Obr. 1).

Tunica intima

Tunica intima vystýlá vnitřní povrch cév a je tvořena z vrstvy endotelových buněk. Tato vrstva je podpořena subendotelovou vrstvou řídkého vaziva, příležitostně obsahuje hladké svalové buňky. Intima je od další vrstvy oddělena vnitřní vrstvou (membrana elastica interna), která se skládá z elastinu a fenestrovaných průchodů, jimiž se k buňkám hluboko do cévní stěny dostávají živiny. Jako následek absence krevního tlaku a cévních kontrakcí v okamžiku smrti má tunica intima (membrana elastica interna) zvlňný vzhled.

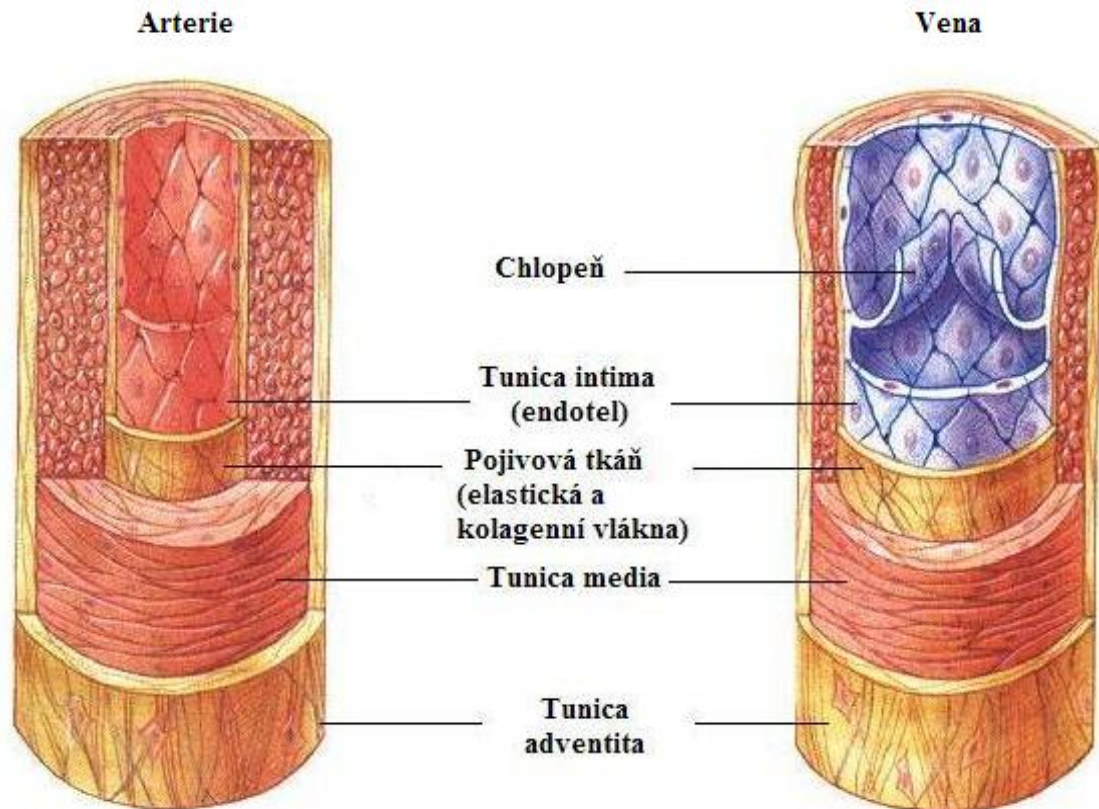
Tunica media

Střední vrstva je tvořena především koncentrickou vrstvou šroubovitě vinutých buněk hladkého svalstva. Hladké svalové buňky jsou hlavním zdrojem extracelulární hmoty. Mezi těmito buňkami je vloženo velké množství elastických vláken a lamel, retikulárních vláken (kolagen III. typu), proteoglykanů a glykoproteinů. Od tunica adventitia je u arterií média oddělena slabou vnější vrstvou (membrana elastica externa).

Tunica adventitia

Vnější vrstva je tvořena hlavně kolagenními a elastickými vlákny (vazivem). Na rozdíl od média se zde nachází kolagen I. typu. Tunica adventitia plynule přechází do tkáně orgánu, kterým céva prochází (6).

Obrázek 1: Stavba krevní cévy: Cévní stěna se skládá ze 3 hlavních vrstev, tunica adventitia, tunica intima a tunica media.



http://www.physioweb.org/circulation/blood_vessels.html (19. 3. 2012)

2.2 Arterie

Dle průměru se arterie člení na arterioly, arterie malého a středního kalibru a arterie velkého kalibru. Podle velikosti, stavby elastické a svalové tkáně a podle uspořádání membrana elastica interna et externa je můžeme rozdělit do dvou typů – svalové a elastické. Arterie malého a středního kalibru jsou většinou arteriemi svalového typu a arterie velkého kalibru jsou arteriemi elastického typu. Jejich anatomické a histologické rozlišení jednotlivých vrstev popisuje tabulka č. 1 (7).

Tabulka 1: Klasifikace a struktura arterií (7).

Typ arterie	Tunica intima	Tunica media	Tunica adventitia
<i>Arterioly (úzké lumen vzhledem k tloušťce stěny)</i>	Endotelové buňky tvořeny jednovrstevným dlaždicovitým epitelem, subendotelová vrstva tenká, membrana elastica interna většinou chybí.	1-5 vrstev hladkých svalových buněk, lamina elastica externa není vyvinuta.	Velmi tenká.
<i>Arterie svalového typu (např. arteria mesenterica superior)</i>	Někdy se nachází hladké svalové buňky, membrana elastica interna dobře vyvinuta, subendotelová vrstva tlustší.	Až 40 vrstev hladkých svalových buněk, elastická a retikulární vlákna, u větších lamina elastica externa.	Podélně uspořádaná kolagenní a elastická vlákna, fibroblasty, adipocyty, vasa vasorum, nervová vlákna.
<i>Arterie elastického typu (v poměru k lumen stěna poměrně tenká, např. aorta)</i>	Endotel má typický charakter, membrana elastica interna splývá s elastickými blankami v medii.	Hladké svalové buňky upínající se do elastických membrán, retikulární vlákna, proteoglykany.	Tenká, zejména elastická a kolagenní vlákna, vasa vasorum, inervace.
<i>Metarterioly (malé větve arterioly)</i>	Chybí subendotel i membrana elastica interna.	Jedna vrstva hladké svaloviny.	Řídké vazivo, nelze odlišit od medie.

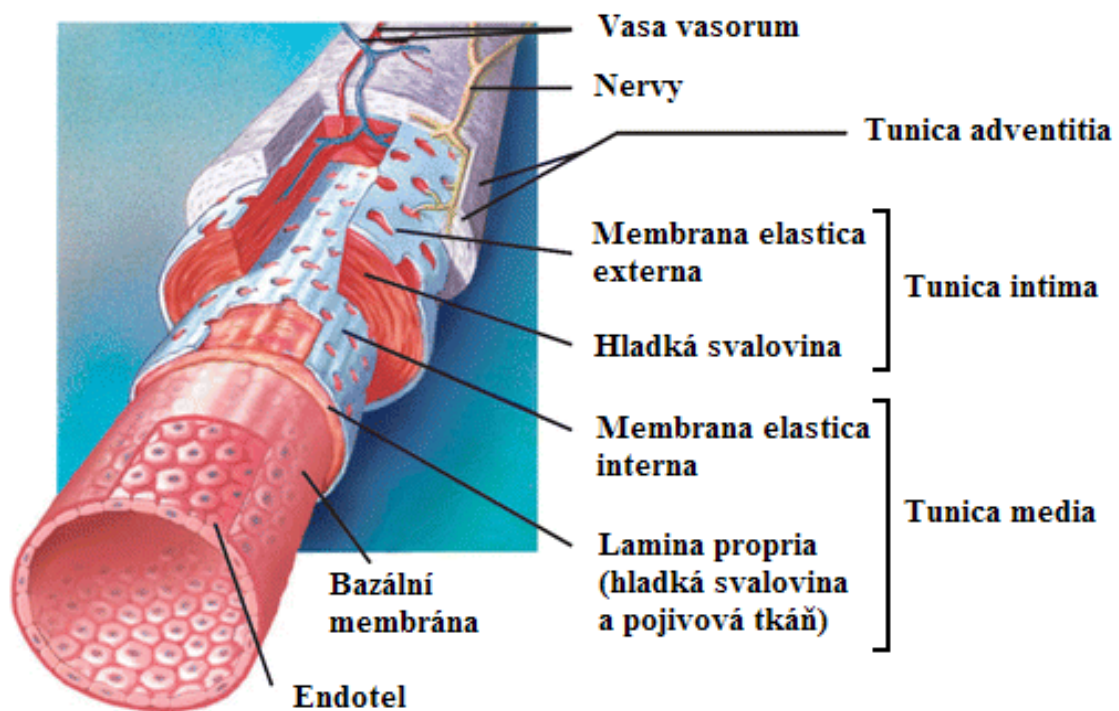
2.3 Cévní endotel

Endotel se nachází v nejvnitřnější vrstvě tunica intima a přímo vystýlá lumen krevních a lymfatických cév (viz Obr. 2). Jelikož endotel vzniká z mezenchymu, nemůžeme jej plně považovat za pravý epitel. Endotelové buňky mají polygonální tvar s oploštělým jádrem uprostřed. Mezibuněčná spojení typu zonula occludens zajišťují mechanickou odolnost buněčné výstelky. Jednotlivé buňky jsou s ostatními propojeny

komplexními spoji. Jejich zastoupení je nejčtenější v arteriích. Typickou strukturou pro endotelie jsou tyčinkovité inkluze, tzv. Weibel-Paladeho tělíska. Tato tělíska tvoří von Willebrandův faktor, glykoprotein vyvolávající shlukování krevních destiček při poranění cévní stěny (8).

Významným rysem plasmalemy jsou jakési pinocytické váčky, které se mohou spojovat v kanálky a v endotelových buňkách tak vytvářet otvůrky, fenestrae. Na takových místech dochází k transendotelovému transportu látek. Přestup molekul se uskutečňuje buď malými póry (mezibuněčná spojení) nebo velkými póry (plasmalemní váčky a fenestrae). Stejně jako ostatní buňky, obsahují i endotelie typické organely jako jsou ribosomy, mitochondrie, endoplasmatické retikulum, ventrikuly, lyzosomy, Golgiho komplex, multivezikulární tělíska a glykogen (9).

Obrázek 2: Tkáňové komponenty cévní stěny: Endotel je nevnitřnější vrstva cévy, přímo vystýlá lumen cévy (10).



2.3.1 Funkce endotelu

Endotel je vysoce diferencovaný druh epitelu (jednovrstevný dlaždicovitý), který slouží jako polopropustná membrána mezi dvěma kompartmenty vnitřního prostředí, krevní plasmou a intersticiální kapalinou. Endotel **udržuje permeabilitu bariér**,

zprostředkovává a kontroluje rozsáhlou oboustrannou výměnu malých molekul a omezuje transport některých makromolekul (6).

Dalo by se říci, že endotel **reguluje průsvit tepny**. Je-li třeba, relativně labilní spoje se mohou v závislosti na aktuálních metabolických nárocích tkání rozšířit. Jedná se například o zvýšený přísun kyslíku do tepen zásobujících svaly končetin při jejich fyzickém namáhání. Zvýšení přítoku krve je zde mnohonásobné a tepny musí reagovat svým přechodným rozšířením. Rovněž se musí endotel přizpůsobit při rozšiřování tepny v důsledku rostoucího aterosklerotického plátu, v tomto případě hovoříme o remodelaci. K reaktivitě cév dochází působením hemodynamických faktorů (krevní tlak) a vazoaktivních látek (histamin při zánětu). Nejsilnějším vazodilatačním působkem je NO (oxid dusnatý) a naopak mezi nejvýznamnější vazokonstrikční faktory se řadí endotelin a angiotenzin II (8, 11).

Endotelové buňky sehrávají jednu z nejdůležitějších rolí v **regulaci zánětlivých a imunitních procesů**, např. při rozvoji aterosklerózy. Exprimují adhezní molekuly (integriny, proteiny podobné imunoglobulinum, katheriny, selektiny), které z krve vychytávají různé druhy leukocytů. Endotelie umožňují leukocytům díky svým mezibuněčným spojům snadný průchod do intersticia (11, 12).

Endotel vykazuje i četnou **antitrombogenní aktivitu**, čímž zabraňuje srážení krve. Například, když je endotel poškozen aterosklerotickými lézemi, začne pojivová tkáň indukovat agregaci krevních destiček. Toto shlukování zahajuje kaskádu událostí, které vedou k přeměně fibrinu z fibrinogenu. Vytváří se trombus, který může dorůst do takové velikosti, až kompletně uzavře krevní průsvit v daném místě cévy. Pakliže se trombus z místa léze utrhne a putuje krevním řečištěm (hovoříme o embolu), může uvíznout ve vzdálenějších cévách a způsobit tam obstrukci (6).

Endotelové buňky skýtají na svém povrchu řadu receptorů a na základě přijatých signálů dokážou secernovat řadu antikoagulačních, trombolytických ale i **protrombogenních působků**, např. již zmíněný von Willebrandův faktor.

Mezi další funkce endotelu patří **metabolizace hormonů** a modifikace lipoproteinů v cévní stěně (**oxidace LDL**, tj. lipoproteinu s nízkou hustotou). Endotel **reguluje proliferaci buněk** cévní hladké svaloviny, podílí se na **tvorbě kolagenu a proteoglykanů**. Vlastnosti a funkce endotelu jsou shrnuty v tabulce č. 2 (8).

Tabulka 2: Vlastnosti a funkce endotelu (8).

<i>Modifikace lipoproteinů</i>	<i>Regulace průsvitu tepny</i>
<ul style="list-style-type: none">• Oxidace LDL	<ul style="list-style-type: none">• Vazokonstriktery: endotelin, angiotensin konvertující enzym• Vazodilatátory: NO, prostacyklin
<i>Regulace zánětlivých a imunitních procesů</i>	<i>Antikoagulační a antitrombogenní aktivita</i>
<ul style="list-style-type: none">• IL-1, IL-6, IL-8• Adhezní molekuly (selektiny)• Histokompatibilní antigeny	<ul style="list-style-type: none">• Prostacyklin• Aktivátor plasminogenu• Molekuly podobné heparinu
<i>Protrombogenní aktivita</i>	<i>Regulace proliferace a růstu buněk</i>
<ul style="list-style-type: none">• Von Willebrandův faktor• Tkáňový faktor• Inhibitor aktivátoru plasminogenu	<ul style="list-style-type: none">• Stimulátory růstu: PDGF, CSF, FGF• Inhibitory růstu: heparin, TGF-β
<i>Udržování permeability kapilár</i>	<i>Metabolizace hormonů</i>

2.3.2 Dysfunkce endotelu

Porucha výše zmíněných endoteliálních funkcí bývá známkou vaskulárního onemocnění. Endotelová dysfunkce je často považována za klíčovou událost směřující k rozvoji aterosklerózy, na jejímž podkladě se později rozvíjí nežádoucí kardiovaskulární příhody (13).

Endotelové buňky vystylají povrch krevních a lymfatických cév. Když bychom všechny endotelie sečetli a zvažili, dostali bychom se k číslu 1,5kg. Jedná se o nejtěžší endokrinní orgán lidského těla. Není tedy divu, že jeho porucha je zodpovědná za nejrozšířenější příčinu úmrtí v civilizovaných zemích (11, 2).

U predisponovaných jedinců dochází k poškození funkcí endotelu při převaze rizikových faktorů nad ochrannými. Dysfunkce vede k porušení relaxace cév, dochází ke zvýšené propustnosti cévní stěny. Zvyšuje se například proliferace cévní hladké

svaloviny a adheze leukocytů k povrchu endotelových buněk. Dochází ke zvýšené expresi povrchových adhezních molekul, které zadržují cirkulující krevní elementy. Důsledkem poškození endotelu (působením rizikových faktorů) je rovněž uvolnění patologického množství von Willebrandova faktoru, který podporuje agregaci krevních destiček a jejich adhezi k subendoteliím.

Jeden z hlavních mechanismů příčin endoteliální dysfunkce je snížení produkce vazodilatačního oxidu dusnatého (NO) v tkáních. NO je známý ateroprotektivní faktor. Mnoha aspekty se podílí na udržování kardiovaskulární homeostázy. Podílí se na regulaci krevního tlaku, kontrakci hladkých svalů, zánětu a na aktivaci krevních destiček.

Molekulární mechanismus zodpovědný za snížení NO není dosud zcela objasněn, současné studie však předpokládají, že určitý vliv na aktivaci a regulaci endoteliální NO syntázy má její kofaktor, tetrahydrobiopterin.

Produkcí a aktivitu NO narušují zejména reaktivní formy kyslíku, a to hned několika různými mechanismy (13).

3 ATEROSKLERÓZA

Ateroskleróza je definována jako místní zánětlivá fibro-proliferativní odpověď na různé formy endoteliálního poškození. K dysfunkci endotelu dochází vlivem několika nejčastějších rizikových faktorů (14).

3.1 Rizikové faktory

Termínem rizikové faktory se označují určité charakteristiky, které vedou u jednotlivých osob k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění (KVO). Rizikové faktory byly popsány a definovány na základě observačních epidemiologických studií, pitevních záznamů, metabolických a genetických studií. Z globálního hlediska rizikové faktory zahrnují řadu osobních, fyziologických a biochemických znaků, včetně životního stylu jedince. Některé jsou ovlivnitelné, zatímco jiné nikoli. Přehled kardiovaskulárních rizikových faktorů je uveden v tabulce č. 3 (15).

Tabulka 3: Rizikové faktory pro vznik KVO (15).

Životní styl (Ovlivnitelné)	<ul style="list-style-type: none">• Kouření• Strava s vysokým obsahem nasycených tuků a cukru, málo ovoce a zeleniny• Fyzická neaktivita, obezita• Abúzus alkoholu, stres
Biochemické a fyzikální rizikové faktory (Ovlivnitelné)	<ul style="list-style-type: none">• Vysoká hladina cholesterolu (zároveň nízká hladina HDL cholesterolu)• Vysoký krevní tlak• Vysoká hladina triglyceridů• Diabetes mellitus• Trombogenní faktory
Osobní rizikové faktory (Neovlivnitelné)	<ul style="list-style-type: none">• Věk• Pohlaví• Osobní a rodinná anamnéza

3.2 Epidemiologie

Existují široké geografické rozdíly v úmrtnosti na KVO. Nejvyšší úmrtnost je ve Východní a Střední Evropě, nejmenší v Itálii, Francii a Japonsku. Kardiovaskulární úmrtnost se zvyšuje s věkem a je obecně vyšší u mužů než u žen. Kromě pohlaví a geografických rozdílů je mortalita ovlivněna také etnickým původem a sociálním postavením. Například v rámci Spojeného Království mají vyšší riziko lidé z jižní Asie než lidé s afro-karibským původem. KV úmrtnost je vyšší v sociálně chudších skupinách (16).

3.3 Patogeneze

Jak již bylo popsáno, za vstup lipidů a zánětlivých buněk do stěny tepny je zodpovědná endoteliální dysfunkce. Monocyty diferencují v makrofágy, které požíou lipidy a přemění se v pěnové buňky. To má za následek vznik „tukových proužků“, považovaných za počátek aterosklerózy. Tukové proužky jsou malé, lehce vyvýšené léze v místě poškození, způsobené nahromaděním makrofágových tukových buněk v intimě. Mohou být prekurzory větších aterosklerotických plátů, ale mohou být i reverzibilní. K přeměně tukových proužků v rozsáhlejší pláty dochází v důsledku zániku jádra a vzniku vazivové čepičky.

Pěnové buňky začnou umírat a uvolňovat svůj lipidový obsah, dochází ke vzniku nekrotického jádra. Uvolnění cytoplasmatického obsahu vede k hromadění extracelulárních lipidů a růstového faktoru, což vyvolává zánět. Následkem prostupu hladkých cévních svalových buněk do intimy a jejich následné proliferace vzniká vazivová čepička. Přítomnost zvětšujícího se množství buněčné hmoty způsobuje růst plátu (17).

Podle velikosti a stavby rozlišujeme dva typy plátů. Plát s mohutným nekrotickým jádrem, vysokým obsahem zánětlivých buněk a tenkou vazivovou čepičkou se nazývá „nestabilní plát“. Má větší předpoklad, že dojde k jeho ruptuře, než plát s malým nekrotickým jádrem, nižším obsahem zánětlivých buněk a silnější vazivovou čepičkou. Takový plát je označován jako „stabilní plát“. Ruptura plátu vede ke vzniku trombu, který může uzavřít lumen a způsobit IM nebo CMP. Ne vždy k tomu však musí dojít. Ateromový plát můžeme včasnými zásahy stabilizovat a předejít tak výskytu těchto závažných událostí (18).

3.3.1 Iniciální fáze vzniku plátu – endoteliální dysfunkce

Rizikové faktory poškozují endotel několika způsoby. Obvykle se mohou i vzájemně doplňovat. Mezi nejčastější iniciátory endoteliální dysfunkce patří:

- Vysoká hladina **oxidovaného LDL** (low-density lipoprotein)
- Volné radikály, např. **reaktivní sloučeniny kyslíku (ROS)**
- Genetická zátěž
- Zvýšená plasmatická koncentrace homocysteinu
- Infekční mikroorganismy (Herpes virus, Chlamydia pneumoniae)
- Smykové napětí v oblastech turbulentního proudění krve
- Endogenní zánětlivé působky, např. cytokiny (19)

Následkem působení ROS dochází v této fázi ke zvýšené propustnosti endotelu a zvyšuje se průnik LDL lipoproteinů z krve do arteriální stěny.

Lipoproteiny jsou komplexy lipidů (cholesterolu a triglyceridů) a speciálního hydrofilního proteinu. Jelikož cholesterol a triglyceridy jsou hydrofobní a krev se z větší části skládá z vody, jedná se o hydrofilní přenašeče těchto lipidů. Lipoproteiny dělíme podle hustoty proteinu v komplexu. Např. pokud je hustota tuků vysoká a hustota proteinů naopak nízká, jedná se o lipoprotein s nízkou hustotou (low-density lipoprotein, LDL).

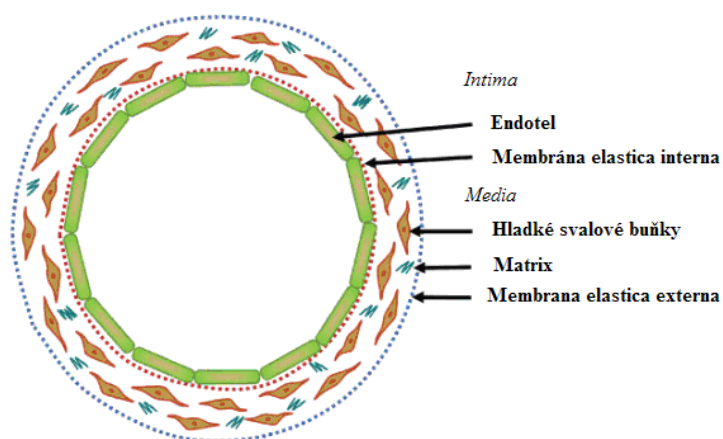
Funkcí LDL je dodávat cholesterol periferním tkáním (triglyceridy jsou předem hydrolyzovány jaterní lipázou). Do buňky se částice LDL dostávají pomocí LDL receptorů jejichž ligandem je apoB-100. Uvnitř buňky je cholesterol uvolněn a dále zpracováván k fyziologickým účelům (syntéza buněčné membrány, steroidních hormonů apod.). LDL receptory buňka syntetizuje při nedostatku cholesterolu, pokud ho však naopak krví v podobě lipoproteinů koluje hodně a receptory ho nestačí vychytávat, dochází k jejich chemické modifikaci, glykaci nebo oxidaci. Takové částice vstupují přes “scavengerové“ LDL receptory do makrofágů a urychlují rozvoj aterosklerózy (19).

Následkem působení ROS dochází k expresi adhezních molekul (VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, P-selektin), které se adherují na povrch endotelu a pomocí kterých leukocyty migrují do arteriální stěny (viz Obr. 3), (21).

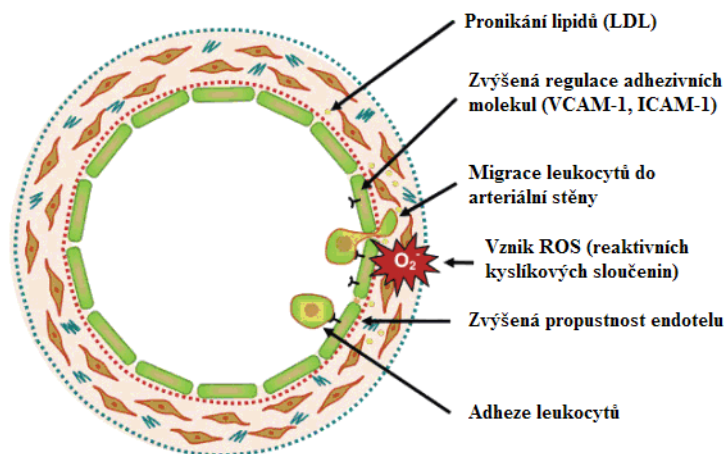
Obrázek 3: Počátek vzniku aterosklerotického plátu (21).

- A. Zdravá arteriální stěna je složena z intimy (vrstvy endotelových buněk umístěných na membrana elastica interna a z medie, kterou vyplňuje extracelulární matrix a v ní zabudované hladké svalové buňky. Media je obklopena tenkou vrstvou membrana elastica externa
- B. Působením rizikových faktorů se cévní stěna vystavuje přítomnosti ROS, dochází k upregulaci adhezivních molekul a ke zvýšení propustnosti endotelu. V důsledku toho leukocyty adherují k endotelu a následně pronikají hlouběji do cévní stěny. Rovněž LDL prostupují do cévní stěny.

A. Normální artérie



B. Endoteliální dysfunkce



3.3.2 Zánět

Důsledkem poškození endotelu (působením rizikových faktorů) dochází k uvolnění patologického množství von Willebrandova faktoru, který podporuje agregaci krevních destiček a jejich adhezi k subendoteliím (viz Obr. 4). Destičky se k endotelu zpravidla

adherují v místech náchylných na poškození. Takové místo je například rozdvojení karotid (22).

Adherence a následná agregace krevních destiček je stimulována integriny, P-selektinem, fibrinem, tromboxanem A₂ a tkáňovým faktorem. Jakmile se přichycené destičky stanou aktivní, ze svého buněčného povrchu uvolní řadu zánětlivých působků, proteáz a vazokonstrikčních látek, které dále podporují zánět a prohlubují poškození endotelu. To vede ke shlukování, adhezi a následné invazi leukocytů (neutrofilů a monocytů) do místa poškození (19).

Krevní destičky v místě léze uvolňují destičkový faktor 4 (PF4) a ten podněcuje přeměnu monocytů v makrofágy a jejich následné vychytávání oxidovaných LDL.

Dysfunkce endoteliálních buněk a tím podmíněná adherence destiček má za následek již zmíněnou invazi leukocytů, která vede k vytvoření tukových proužků. Nejprve se leukocyty pohybují po endoteliálním povrchu cévní stěny, což je zprostředkováno expresí selektinů, především P-selektinu. Potom leukocyty těsně přilnou k endotelu a z cévního řečiště prostoupí do okolní tkáně (media intima). Tento proces extravazace je uskutečňován pomocí integrinů a imunoglobulinů, zejména ale pomocí adhezních molekul VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) a ICAM-1 (intercellular adhesion molekule 1), (23).

Reakcí buněk intimy na extravazaci leukocytů je vypuštění různých chemokinů. Ty pomocí svých receptorů pevně váží monocyty a T-lymfocyty a umožňují jim migrovat. V intimě monocyty a T-lymfocyty dozrávají a uvolňují chemoatraktivní cytokiny, např. chemokin ligand 2 (CCL-2, známý také jako MCP-1). MCP-1 zesiluje zánětlivou odpověď (24).

Přímý důkaz o účasti CCL-2 a jeho receptoru CCR-2 v aterogenezi pochází z výzkumu u ApoE^{-/-} myši, u kterých dochází ke snížené expresi CCL-2 nebo CCR-2. U těchto myši pozorujeme výrazně nižší podíl makrofágů i celkově menší nárůst aterosklerotického plátu.

Zánět je přítomen po celou dobu rozvoje aterosklerotického plátu a účastní se ho nesčetné množství pro-zánětlivých cytokinů, např. interferon- γ (IFN- γ), tumor nekrotizující faktor α (TNF α), interleukin-1 (IL-1), IL-2 a IL-18 (25).

Význam imunity u aterosklerózy se omezuje nejen na adaptivní imunitní systém, ale i vrozená imunita je důležitá. TLRs (toll-like receptory) jsou receptory, jejichž molekulová struktura jim umožňuje spojovat se s patogeny. Když poškozené tkáně

uvolní “nebezpečné působky“ či modifikované LDL lipoproteiny, tyto receptory nato zareagují stejně jako na invazi mikroorganismů, tedy iniciováním zánětlivé odezvy (26).

C-reaktivní protein (CRP), krátký pentraxin, který je používán jako prediktivní marker pro ischemickou chorobu srdeční, je součástí vrozeného imunitního systému. Mechanismy vysvětlující účast CRP v srdečních onemocněních jsou dosud neobjasněny, jelikož veškeré experimenty ztěžuje genetická odlišnost mezi myším a lidským CRP. Současné studie však ukázaly, že dlouhý pentraxin (PTX3) zajišťuje u myši kardioprotektivní účinek. Hladiny PTX3 jsou zvýšené při ischemii myokardu jak u myši tak u lidí, proto by mohl mít potenciál jako prognostický marker.

PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors), které jsou exprimovány endoteliálními buňkami v cévní stěně, jsou důležitou skupinou jaderných receptorů, které regulují přísun monocytů, jejich adhezi i přestup do tkání, stejně jako jejich protizánětlivé vlastnosti a schopnost redukovat oxidační stres. PPARs jsou rovněž exprimovány monocyty, makrofágy a T-buňkami a jsou spojovány s ateroprotektivními procesy, které zahrnují inhibici zánětlivých molekul (27).

3.3.3 Vznik pěnových buněk

Jakmile LDL lipoproteiny migrují do intimy, dochází tam k jejich modifikaci a jsou snadněji vychytávány buňkami. V intimně se uvolňují růstové faktory (monocyte colony-stimulating factor, M-CSF) a cytokiny (TNF- α a IFN- γ) a iniciují přeměnu monocytů v makrofágy, které následně vyžívají do aktivních makrofágů. Tento vyžívající proces u makrofágů zvyšuje expresi jejich “scavengerových“ receptorů (receptory A, B1 a CD36), které přijímají a váží modifikované LDL (28).

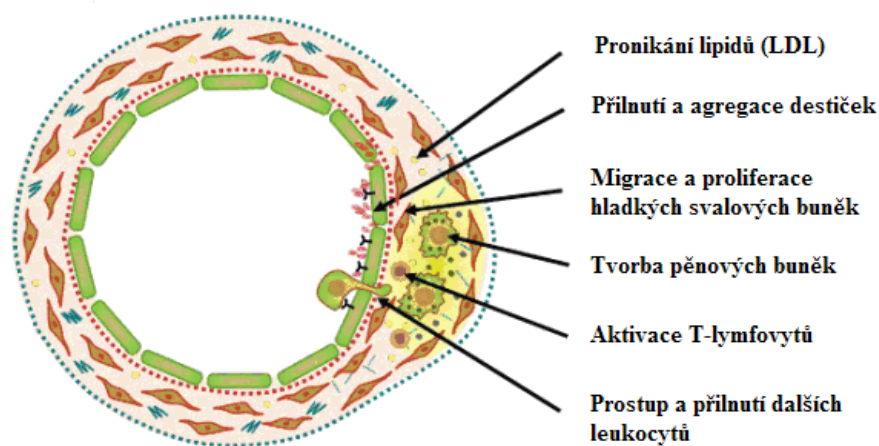
V současné době existuje domněnka, že zatímco receptor A je proaterogenní (má svůj podíl při vychytávání oxidovaných LDL do cévní stěny), receptor B1 je ateroprotektivní (podílí se na přesunu esterifikovaného cholesterolu pomocí HDL do jater), (29).

Požření lipidů makrofágy ústí ve shromažďování tukových kapek uvnitř makrofágů, ty získávají pod mikroskopem pěnový vzhled a vznikají tak pěnové buňky. Pěnové buňky uvolňují růstové faktory a cytokiny, které přispívají k progresi aterosklerotických lézí. Uvolňují proteázy (MMPs), které stimulují rozpad buněčné matrix. Pěnové buňky spolu s T-lymfocyty rozvíjí vznik tukových proužků (viz Obr. 4), (30).

Cholesterol může být kromě vychytávání lipidy transportován pomocí přenašečů ABCA-1 a ABCG-1 do mimobuněčného prostoru, kde se naváže na HDL akceptor – apolipoprotein E. Tento proces se nazývá zpětný transport cholesterolu. Cholesterol může být pomocí plasmatické lecitin-cholesterol acyltransferázy esterifikován a transportován z tkání do jater. Toto odvádění cholesterolu je považované za ateroprotektivní, jelikož odstraňuje nakupený cholesterol, a tím snižuje riziko vzniku pěnových buněk. Podpora zpětného transportu cholesterolu je jednou z možností jak předcházet a odvracet aterosklerotické cévní onemocnění (31).

Obrázek 4: Vznik tukových proužků (21).

Destičky adherují k poškozené endoteliální vrstvě a tam degranulují. LDL částice jsou v arteriální stěně modifikovány, to usnadňuje jejich vychytávání makrofágy a mění se v pěnové buňky. Uvolnění chemokinů a růstového faktoru vede k expresi dalších zánětlivých buněk, aktivaci T-lymfocytů a migraci a proliferaci hladkých svalových buněk.



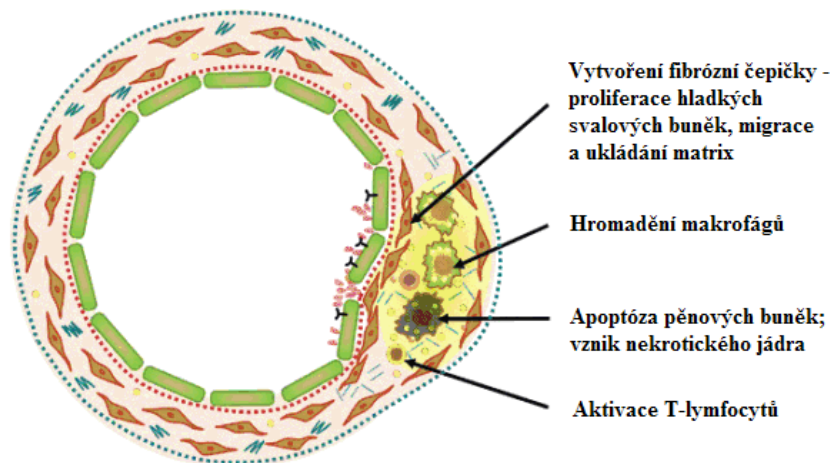
3.3.4 Proliferace a migrace buněk hladké cévní svaloviny

Tukové proužky se postupně zvětšují a rozvíjí se aterosklerotické pláty. Vytváří se na nich fibrózní čepička z hladkosvalových buněk (vascular smooth muscle cells, VSCMs), (viz Obr. 5). Čepička tvoří ochrannou vrstvu mezi lézí a endotelem cévy. Při rozvoji pokročilého plátu z tukových proužků migrují VSCMs z medie do intimy, kde dochází k jejich proliferaci. Během tohoto procesu dochází u VSCMs k fenotypové obměně z kontraktlních hladkých buněk na syntetické. Vznik fibrózní čepičky je stimulován růstovými faktory, cytokiny. Na migraci a proliferaci se rovněž podílí

destičkový růstový faktor (PDGF), fibroblastový růstový faktor (FGF) a transformující růstový faktor β (TGF- β). Tyto faktory se uvolňují z bezjaderných destiček, endoteliálních buněk, makrofágů, pěnových buněk a VSMCs. Rovněž rozpad mezibuněčné hmoty usnadňuje přechod VSMCs z medie do intimy. Jak se léze postupně zvětšuje a mohutní, zánětlivé cytokiny (IFN- γ) podporují apoptózu makrofágů. To vede ke vzniku nekrotického jádra, které je charakteristické pro pokročilé stádium rozvoje plátu (32).

Obrázek 5: Stabilní aterosklerotický plát (21).

Migrace a proliferace hladkých svalových buněk vede k tvorbě fibrózní čepičky. Apoptózou pěnových buněk vzniká nekrotické jádro. Dochází k dalšímu nahromadění makrofágů a T-lymfocytů.

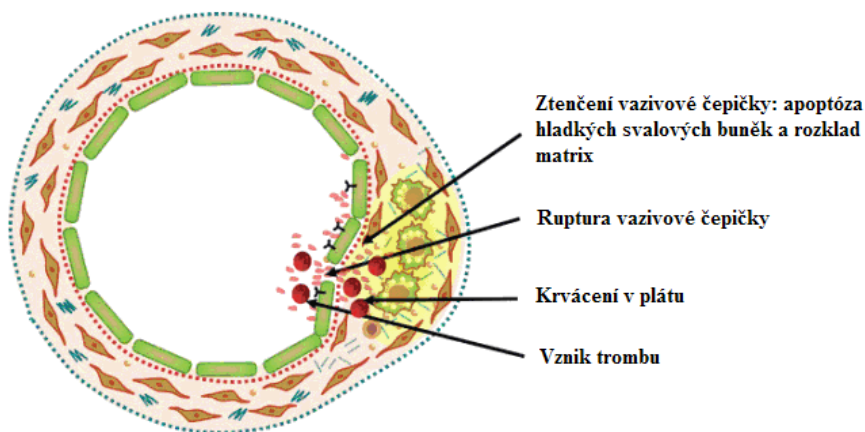


3.3.5 Ruptura plátu a vznik trombu

Předpokládá se, že po vytvoření časné léze, dochází k jejímu dalšímu růstu nárazově. K těmto “nárazům“ může docházet v důsledku ruptury plátu a jeho následné opravy. Složení plátu určuje rizika jeho utržení. Pláty se silnou fibrózní čepičkou se považují za klinicky stabilní (viz Obr. 5), zatímco pláty s vysokým lipidovým obsahem a malou nebo žádnou vazivovou čepičkou jsou označovány za nestabilní a jsou náchylné k ruptuře (viz Obr. 6), (30, 33).

Obrázek 6: Nestabilní aterosklerotický plát (21).

Následkem apoptózy hladkých svalových buněk a degradace buněčné matrix dochází ke ztenčování fibrózní čepičky a ke krvácení uvnitř plátu. Plát se stává více nestabilní a náchylný k ruptuře.



Utržení plátu urychlují 3 hlavní faktory:

a) ztenčování fibrózní čepičky

Ke ztenčení fibrózní čepičky může dojít v důsledku apoptózy hladkosvalových buněk, čímž se zároveň omezuje syntézu matrix a pružnost a roztažnost čepičky. Rovněž apoptóza makrofágů zvyšuje velikost nekrotického jádra, což vyvíjí tlak na vazivo a dochází opět k apoptóze vazivových buněk. Ke ztenčování přispívá i zánět v plátu, neboť při něm může docházet k aktivaci proteáz, což vede k rozpadu mimobuněčných proteinů (33).

b) rozpad mezibuněčné hmoty

Rozpad matrix snižuje množství kolagenu v plátu a to omezuje pružnost vaziva. Makrofágy vylučují několik extracelulárních proteáz, katepsinů a MMPs. Nejdůležitější proteáza je plasmin, který rozkládá fibrin, čímž ovlivňuje stabilitu plátu. Katepsiny jsou univerzální rodinou extracelulárních enzymů, které ovlivňují stabilitu plátu stejně jako spousta jiných procesů aterosklerózy. Buněčné metaloproteiny (MMPs) nacházíme v místech rozpadu extracelulární matrix v aterosklerotických plátech a je dokázáno, že vyřazením jejích genů u myši dochází k pozitivnímu vlivu na rozvoj i stabilitu plátu. MMPs jsou aktivovány i proteázami žírných buněk, chymázami, tryptázami a katepsinem G (34, 35).

c) vznik mikrocévy a její trombózy uvnitř plátu

Ke vzniku arterioly nebo kapiláry uvnitř plátu (neoangiogeneze) dochází především u nestabilních plátů. Předpokládá se, že při neoangiogenezi se uplatňují žírné buňky, nachází se vedle nově vytvořené cévy a obsahují potenciální proangiogenní faktor, fibroblastový růstový faktor, který přispívá k bujení dalších větvíček novocév. Žírné buňky však obsahují i další proangiogenní faktory, jako je histamin, heparin, chymáza, tryptáza, cévní endoteliální růstový faktor a nervový růstový faktor (36).

Rovněž angiogenní faktory odvozené od T-lymfocytů a makrofágů přispívají k neovaskularizaci, a to především třemi následujícími procesy. Větvením vasa vasorum kolem nekrotického jádra, vytvořením nezralých cév a ztrátou bazální membrány kolem funkčních kapilár. Tyto procesy vyvolávají únik červených krvinek do plátu, čímž spouští zánětlivou odezvu a následnou novotvorbu cév (37).

V místech zanícené tkáně produkují makrofágy a žírné buňky proteolytické enzymy, které mohou svou aktivitou poškodit endotel nově vytvořených cév.

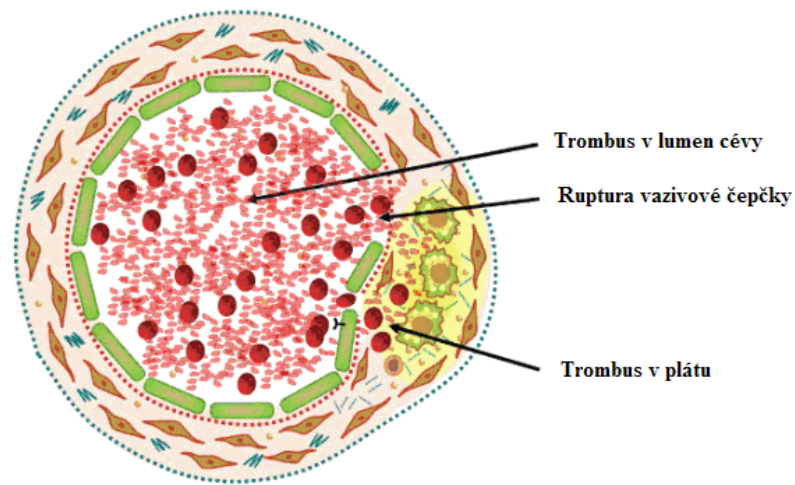
Při ruptuře plátu dochází k vylití vysoce trombogenních prvků plátu do krevního řečiště, což vede ke shlukování krevních destiček a následné tvorbě sraženiny (trombu). (viz Obr. 7) Trombus může kompletně uzavřít průsvit cévy, což se klinicky projeví např. jako infarkt nebo mrtvice. Proto je nesmírně nezbytná znalost mechanismů regulace krevních destiček a vzniku trombu. Zdá se, že důležitou roli v těchto procesech hraje proteinkinasa C, její isoformy se různě uplatňují při aktivaci destiček (38).

Ruptura plátu se však může i zahojit. Buď se může regenerovat, nebo na jejím místě vznikne jizva. Oba procesy vedou k rozšíření velikosti plátu (33).

Během opravného procesu se uvolňuje TGF- β , který stimuluje VSCMs, díky nimž se může vytvořit nezbytná tkáň a extracelulární matrix pro tvorbu kostry vazivové čepičky. Během tvorby trombu se uvolňuje trombin, který podněcuje růst VSCMs a je rovněž důležitý pro tvorbu vazivové čepičky (30).

Obrázek 7: Ruptura plátu (21).

Rupturou fibrózní čepičky nebo erozí luminálního povrchu dochází ke vzniku trombu, který může ucpat celý průsvit cévy.



4 MYŠÍ MODELY ATEROSKLERÓZY

Ke studiu patogeneze a léčby aterosklerotických lézí bylo v minulosti použito mnoho druhů zvířat. První zmínka o pokusech vztahujících se k ateroskleróze se datuje do roku 1908. V té době doktor Ignatowski zpozoroval ztlustění intimy v aortách u králíků, kteří byli krmeni stravou bohatou na proteiny (39).

Do roku 1992 se většina výzkumu soustředila především na králíky, v menší míře na prasata a opice. Ačkoli se u králíků ateroskleróza samovolně nerozvíjí, po vnějším zásahu reagují zvýšenou hladinou cholesterolu a rozvojem léze v relativně krátké době. Aterosklerotické modely prasat a primátů jsou sice lidským modelům podobné nejvíce, bohužel jsou ale velmi drahé a navíc se vyžadují speciální opatření při zacházení s těmito zvířaty. V minulosti nám však tyto modely poskytly neocenitelné poznatky. Například prasečí model odhalil, že jedním z prvních procesů v rozvoji léze je infiltrace monocytů. Studie na králících a opicích byly stěžejní při definování buněčných procesů vedoucích k vytvoření a rozvoji léze. V uplynulých letech probíhalo nesčetné množství výzkumů a bylo zapotřebí najít model, který by umožňoval terapeutické studie na tak velkém počtu zvířat. Takovým modelem se od roku 1992 stal myší model (40).

Myši jsou vůči ateroskleróze vysoce odolné. Výjimkou je pouze kmen C57BL/6. U něj lze proces aterosklerózy navodit speciální dietou bohatou na cholesterol. Právě tento model použila v 60. letech Wisslerova laboratoř. Poměr surovin (30% tuku, 5% cholesterolu a 2% kyseliny cholové) sice vedl u C57BL/6 k rozvoji aterosklerózy, ale zároveň byl pro myši toxický. Myši ztrácely na váze a trpěly vážnými infekcemi respiračního traktu. Paigen a kol. dietu pozměnili, redukovali obsah lipidů. "Paigenova dieta" obsahuje 15% tuku, 1,25% cholesterolu a 0,5% cholové kyseliny. Ačkoli byl tento model široce užívaný, měl i své nevýhody, léze byly velmi malé, omezené pouze na aortální kmen, a navíc byla dieta vzhledem k abnormálně vysokému obsahu cholesterolu nefyziologická. Také s ohledem na patologii lézí není tento model vhodný pro lidskou aterosklerózu. Tohle všechno vedlo vědce k bagatelizaci role myši jako vhodného modelu. Díky genovému inženýrství však nabývají od roku 1992 myší modely úplně jiných rozměrů (41, 42).

Tabulka 4 popisuje hlavní výhody a nevýhody použití myši jako modelů aterosklerózy.

Tabulka 4: Výhody a nevýhody myších modelů (43).

Výhody myších modelů	Nevýhody myších modelů
<ul style="list-style-type: none">• Schopnost validně kontrolovat životní prostředí a dietu• Krátká generační doba (3 týdny březost a pohlavní dospělost do 6 týdnů po narození)• Jednoduché a hospodárné požadavky na zabezpečování myší (shánění, chov)• Rodí se velké množství potomků (imbredních kmenů)• Navození aterosklerózy v krátkém časovém úseku• Možnost změny genetického profilu, vložení nových genů nebo vyřazení původních• Rozmach techniky pomohl překonat omezení velikosti myších preparátů	<ul style="list-style-type: none">• Odlišná průměrná délka života (2 roky) a hmotnost (30g)• Velmi odlišný lipidový profil (75% cholesterolu v lidské plazmě je LDL, zatímco u myší převažuje HDL)• Normální stravou nelze dosáhnout aterosklerózy, u lidí běžný proces

4.1 ApoE-deficientní myši

Několik let se vědci po celém světě snažili vytvořit lepší model pro lipoproteinové poruchy a identifikovat geny, které jsou zodpovědné za rozvoj aterosklerózy. V roce 1992 se podařilo cíleně potlačit aktivitu genu zodpovědného za expresi apolipoproteinu E (apoE). ApoE je bílkovinná součást lipoproteinů (HDL, VLDL, chylomikronů), která slouží pro přenos cholesterolu a rovněž jako ligand pro vazbu na buněčné receptory v játrech a mozku. Jeho spojitost s rozvojem aterosklerózy je jednoznačně prokázána a díky inaktivaci apoE genu se podařilo vytvořit nový kmen myší – apoE-deficientní myši. (44).

ApoE-deficientní myši měli 5x vyšší plasmatickou hladinu cholesterolu než měli původní kmeny. Ačkoli celkový cholesterol byl vysoký, HDL cholesterol byl snížen o více než polovinu normální plasmatické hladiny. Hladina triglyceridů se zvýšila o 68%. Předpokládá se, že myši postrádají cholesteryl-ester transferový protein, enzym, který přenáší esterifikovaný cholesterol z HDL do VLDL a LDL. I přes tyto rozdíly mají apoE-deficientní myši srovnatelné fenotypy s lidmi. Ukázalo se, že chronologický sled událostí vedoucích ke vzniku aterosklerotických lézí u těchto myší je velice podobný lidským modelům aterosklerózy (45).

Již ve věku 5-6 týdnů probíhá na endoteliálním povrchu aorty adheze monocytů. Pod mikroskopem můžeme spatřit transendoteliální migraci monocytů. V 6-10. týdnu života lze u apoE-deficientních myší pozorovat migraci hladko-svalových buněk a vznik pěnových buněk s následným rozvojem tukových proužků. Tukové proužky se poměrně rychle rozvíjí v pokročilé léze. Tyto léze obsahují typická nekrotická jádra obklopená proliferujícími hladko-svalovými buňkami s různým množstvím extracelulární matrix. Tyto léze mívají dobře vytvořenou vazivovou čepičku. Poměrně běžně se stává, že se zánětlivá léze nahlodá hluboko do medie a způsobí tam aortální aneurysma. Na mnoha plátech u starších zvířat nalézáme kalcifikovaná ložiska (46).

Složitost lézí spolu s výhodami použití těchto myší jako modelů pro lidskou aterosklerózu dělá tento model žádoucím pro studium environmentálních a genetických příčin aterosklerózy. Objev apoE-deficientních myší potvrdil vhodnost těchto zvířat jako modelů pro výzkum aterosklerózy u lidí a položil základ pro budoucí studium speciálních diet.

Hayek a kol. překonali Paigenovu myší dietu a přišli s tzv. "western-type" dietou, která je více fyziologická než byla několik let stará Paigenova. Tato dieta obsahuje 21% tuku, 0,15% cholesterolu a žádnou cholovou kyselinu. Pokud jsou touto dietou krmeny obyčejné kmeny myší, dochází u nich k dvojnásobnému zvýšení hladiny plazmatického cholesterolu, zatímco u apoE-deficientních myší dochází k více než trojnásobnému zvýšení cholesterolu. Postprandiální clearance lipoproteinů je výrazně narušena. ApoE-deficientní myši na "western-type" dietu odpovídají podobně jako lidé na běžnou stravu. Při této dietě je značně urychlen vývoj lézí a jejich velikost je větší. U deseti týdenních zvířat, která byla po dobu 5 týdnů krmena touto dietou, dochází k tři až čtyřnásobnému zvětšení velikosti lézí než dochází u zvířat krměných nízkotučnou dietou.

Kromě histologické podobnosti s lidskými lézemi, ukazují myší modely na podobnost i v odpovědích na environmentální podněty. Zatím však u žádného myšího kmenu nebyla pozorována ruptura plátu. Progrese aterosklerotických lézí probíhá rychleji než u lidí, což se může jevit jako výhodné v mnoha experimentálních výzkumech (45).

5 P - SELEKTIN

P-selektin (CD62P) je adhezní molekula, patřící do skupiny selektinů (P-selektin, E-selektin, L-selektin). Její struktura je znázorněna na obrázku 8. Dohromady hrají selektiny důležitou roli při zahájení migrace leukocytů do arteriální stěny. P-selektin je částečně zodpovědný za adhezi leukocytů a krevních destiček k endotelu. P-selektin je rovněž objektem zájmu kvůli možnému využití jeho rozpustné formy jako plazmatického ukazatele nepříznivých kardiovaskulárních událostí.

Zvířecí modely ukázaly na důležitost role P-selektinu v procesu aterogeneze. Zvýšená hladina rozpustného P-selektinu v plazmě byla s různým vztahem k prognóze prokázána u kardiovaskulárních onemocnění, včetně ICHS, hypertenze a u fibrilace síní. Například v aktivním aterosklerotickém plátu u myši byla prokázána zvýšená exprese P-selektinu a naopak při nedostatku P-selektinu byla pozorována snížená tendence formování plátů (47).

Obrázek 8: Struktura molekuly P-selektinu (47).

P-selektin je největší ze selektinů. Jeho atomová hmotnost činí 140 kDa. Tato molekula se skládá z endotelového růstového faktoru, devíti opakujících se regulačních sekvencí, lecitinu s amino- skupinou na jednom konci a transmembránové sekvenci s karboxy-skupinou na druhém konci molekuly.



EGF - endotelový růstový faktor

1-9 - opakující se regulační sekvence

○ - transmembránová doména

NH₂ - amino skupina na konci molekuly

COOH - karboxy skupina na konci molekuly

5.1 Exprese na endotelu

P-selektin je součástí membrány krevních destiček nebo také součástí membrány Weibel-Paladeho tělísek endoteliálních buněk. Po *in vitro* působení zánětlivých mediátorů (histamin, trombin, phorbolové estery, hypoxie) na endoteliální buňky dochází během několika minut k mobilizaci Weibel-Paladeho tělísek a degranulaci jejich von Willebrandova faktoru. Zhruba během dvou minut po stimulaci je na povrchu

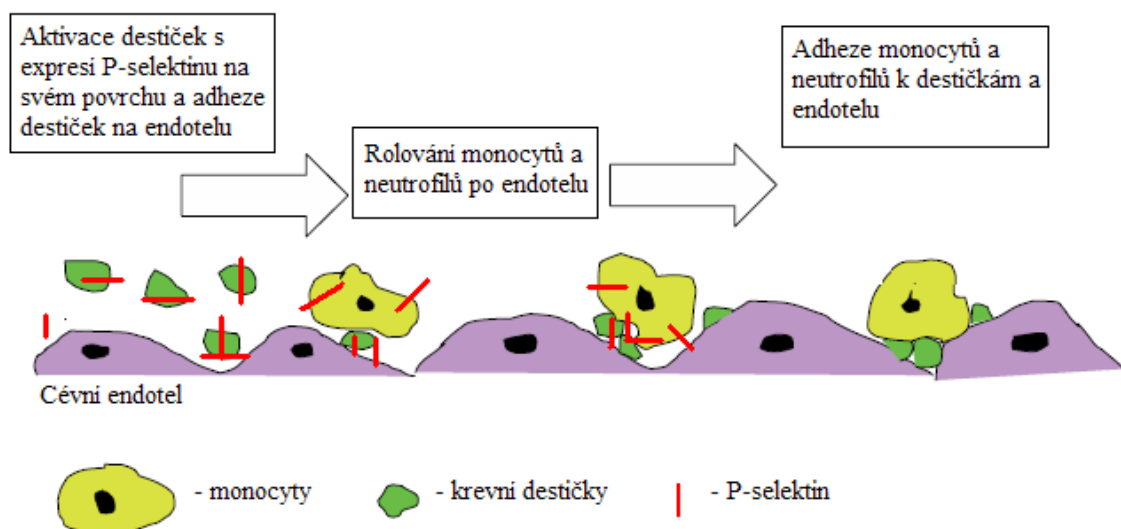
destiček nebo na endotelu exprimován rovněž P-selektin. Tato exprese trvá jen chvíli, kulminuje po 10 min a odeznívá do 3 hodin. K další syntéze P-selektinu dochází během 2 hodin díky cytokinům, jako jsou IL-1, TNF- α , trombin, liposacharidy nebo kyslíkové radikály (48).

Předpokládá se, že určitý vliv na expresi P-selektinu mají metabolity ateroprotektivního oxidu dusnatého (NO). Minamino a kol. popisují spojitost mezi nízkou hladinou NO metabolitů a vysokou expresí destičkového P-selektinu. Inhibitory NO syntázy by pak byli zodpovědní za zvýšenou expresi P-selektinu (49).

Hlavním ligandem pro P-selektin je glykoprotein PSGL-1 (P-selektin glykoprotein ligand-1), který se nachází na většině hemopoetických buněk, jako jsou neutrofilů, lymfocytů, eosinofilů, monocytů. Můžeme ho tedy nalézt u těch, u kterých dochází k adhezi na endoteliální povrch cévní stěny. PSGL-1 však slouží i pro ostatní typy selektinů.

Četné experimenty u apo-E deficientních myší a lidí dokládají účast P-selektinu a PSGL-1 při rolování leukocytů po endotelu a popisují vliv P-selektinu na interakci mezi destičkami a leukocyty. Tyto interakce znázorňuje obrázek 9 (50).

Obrázek 9: Funkce P-selektinu: obrázek popisuje vztah mezi P-selektinem, destičkami, leukocyty a aterogenezí.(47).



Pokud u myší chybí P-selektin, jeho funkci adheze leukocytů a rolování po endotelu přebírá L-selektin. U myší bez P-selektinu, které jsou léčeny TNF- α , je pro omezení

rolování nutné blokovat funkci E-selektinu. U E-selektin/P-selektin deficientních myší vůbec nedochází k rolování leukocytů po endoteliálním povrchu.

Pozorování a studie selektinů indikují, že P-selektin je zodpovědný za časné rolování leukocytů, zatímco E-selektin přispívá k rolování v menší míře a je zodpovědný spíše za adhezi (51).

Hustota P-selektinu v aktivovaném endotelu není *in vivo* známá, avšak imunohistochemické výzkumy předpokládají, že je mnohem menší než hustota E-selektinu.

Imunohistochemické analýzy prokázaly výraznou endotelovou expresi P-selektinu v lidských nestabilních aterosklerotických plátech. Barvení ukázalo na silnou spojitost s expresí adhezní molekuly ICAM-1. Avšak v normálních artériích nebo ve stabilních fibrózních plátech nebyla přítomnost P-selektinu detekována. Adhezi leukocytů ke tkáním lze inhibovat pomocí protilátek pro P-selektin mířených do specifického místa adheze.

Expresí P-selektinu se zvyšuje u pacientů s nestabilní anginou pectoris či po mozkové mrtvici. Tyto experimenty podporují koncept, že zvýšená exprese P-selektinu hraje v rozvoji aterosklerózy významnou roli (52).

5.2 Průřezové studie kardiovaskulárních onemocnění (rozpuštěný P-selektin)

První klinické studie zaměřené na souvislost mezi P-selektinem a KVO se začaly objevovat před deseti lety. Zvýšená hladina rozpustného P-selektinu byla prokázána v široké škále akutních i chronických kardiovaskulárních onemocněních. Wu a kol. popsali zvýšenou hladinu po AIM a při mozkové trombóze. Spolu s Chong a kol. jasně uvedli, že rozpustný P-selektin by mohl být užitečný jako nový marker trombotických onemocnění (53).

Zvýšené hladiny rozpustného P-selektinu byly dále hlášeny řadou výzkumných týmů u ICHDK, chronických ICHS, u hypertenze a u nestabilní AP (nikoli však u stabilní AP). Co se týká cerebrovaskulárních onemocnění, byl nalezen zvýšený rozpustný P-selektin u pacientů se symptomatickou stenózou vnitřních karotid a akutní cévní mozkovou příhodou (49).

5.3 Farmakologické intervence

Riondino a kol. zjistili, že snížení krevního tlaku u starších hypertenzních lidí pomocí ACE-inhibitorů či blokátorů vápníkových kanálů vede k redukci shlukování destiček a ke snížené expresi destičkového i endotelového P-selektinu (54).

Statiny patří do skupiny léků snižující hladinu cholesterolu v krvi. Nově však bylo uznáno, že kromě hypolipidemických účinků mají statiny příznivý vliv i na endotel a rozvoj a progresi zánětu. Pucetti a kol. prokázali výrazné zlepšení funkce krevních destiček a snížení hladiny P-selektinu u hypercholesterolemických pacientů po terapii některými statiny (simvastatin, atorvastatin, fluvastatin). Ukázalo se, že statiny snižují hladinu P-selektinu po akutní koronární příhodě i u pacientů se stabilní ICHS. Jedním z předpokládaných mechanismů snížení exprese selektinů by mohla být stimulace oxidu dusnatého, který má za následek snižování aktivace krevních destiček (55).

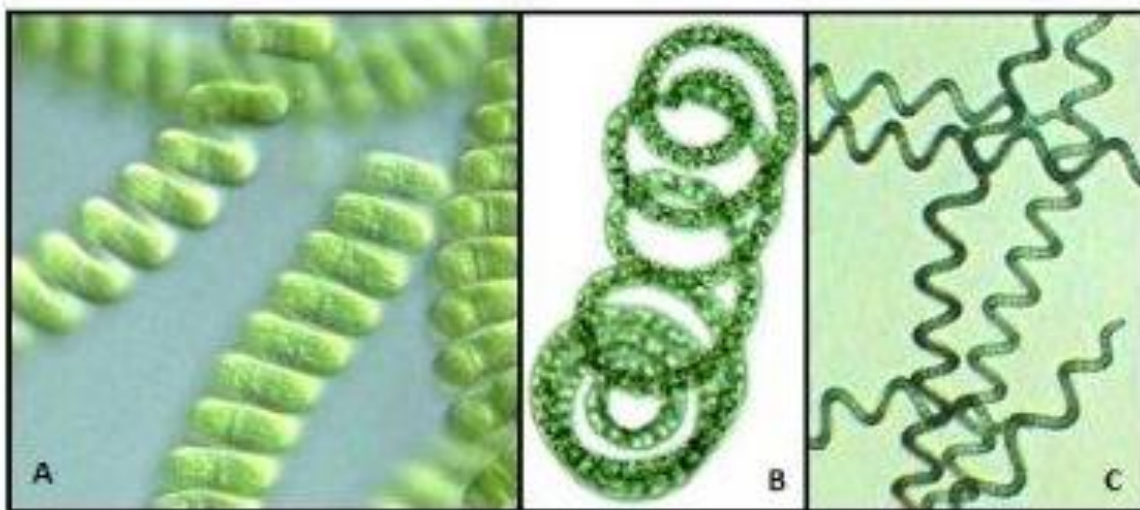
6 SPIRULINA PLATENSIS

Spirulina platensis je volně plovoucí jednobuněčná řasa se spirálovitě stočenými vlákny. Její mikroskopická struktura je patrna z obrázku 10. Někdy je označována jako *Athrospira platensis*, řadí se do třídy cyanobakterií (sinic) a má schopnost fotosyntézy. Přirozeně se vyskytuje ve slaných alkalických vodních nádržích v subtropích nebo tropech, především v Americe, Mexiku, Asii a střední Africe.

První výzkumy byly zaměřeny na studium nutričních hodnot *Spiruliny* jako zdroje potravy. *Spirulina* je významná pro svůj neobvykle vysoký obsah bílkovin (až 70% suché váhy). Rovněž je velmi bohatá na vitamíny, minerály, esenciální mastné kyseliny a jiné živiny (56).

Na počátku 80. let se výzkum obrátil na studium *Spiruliny* jako potenciálního nutraceutika v prevenci různých onemocnění. *Spirulina* se stala jedním z významných potravinových doplňků s příznivými účinky na řadu chorob. Bylo hlášeno, že konzumace *Spiruliny* má význam v prevenci hypercholesterolemie, kardiovaskulárních onemocnění, určitých zánětlivých onemocnění, alergií, rakovin, virových infekcí, porušené glukózové tolerance, diabetu a jiných metabolických onemocnění (57).

Obrázek 10: *Spirulina platensis* pod mikroskopem: jedná se o jednobuněčnou řasu spirálovitého tvaru.



A: <http://vitainfo.cz/eshop/detail.php?idzb=230> (11.3.2012),

B: <http://www.mokkka.hu/drupal/en/node/9923> (11.3.2012)

C: <http://www.sciento.co.uk/catalog/item/247/> (11.3.2012)

6.1 Složení

Suchá váha Spiruliny je z 51-70% tvořena proteiny. Jedná se o kompletní bílkoviny obsahující všechny esenciální a některé neesenciální aminokyseliny. Svoji nutriční hodnotou mohou tyto proteiny připomínat bílkoviny obsažené v mase, mléku či vejcích.

Spirulina obsahuje kolem 7 % lipidů, považuje se za významný zdroj nenasycených mastných kyselin (NMK), z nichž nejdůležitější je kyselina γ -linoleová. Z dalších významných NMK poskytuje Spirulina kyselinu α -linoleovou, linolovou, stearidonovou, eikosapentaenovou, dokosahexaenovou a arachidonovou. Dále obsahuje 15-20% sacharidů, z nichž nejvíce je zastoupena rychle se využívající rhamnóza a glykogen. Oba dva sacharidy mají nízký glykemický index.

Spirulina obsahuje četná přírodní barviva, především karotenoidy, 1,2% chlorofylu a až 15% fykocyaninu. Dále obsahuje antioxidační enzymy (superoxid dismutázu a glutathion peroxidázu) a polyaminy, díky kterým získává spirulina charakteristický zápach. Spirulina je rovněž bohatá na minerální prvky. Z těch nejdůležitějších obsahuje snadno resorbovatelné železo, velké množství vápníku, hořčíku a chrom. Spirulina obsahuje celou škálu vitamínů, zejména vitamíny B₁, B₂, B₆, niacin, biotin, kyselinu pantotenovou, listovou, inositol a vitamín E. Také je označována za jeden z největších rostlinných zdrojů vitamínu B₁₂ (58).

6.2 Příznivé účinky na kardiovaskulární onemocnění (KVO)

Přínosy Spiruliny v KVO vyplývají především z jejích hypolipidemických, antioxidačních a protizánětlivých účinků. Tyto účinky byly prokázány na velkém počtu preklinických studií na zvířecích modelech. Výsledky klinických studií na lidech do značné míry odpovídají hypolipidemickým a protizánětlivým účinkům, které byly pozorovány u zvířat. Zatím byl však proveden pouze omezený počet těchto klinických studií, který by mohl potvrdit validitu účinků této řasy u lidí. Zároveň jsou omezené i současné poznatky o základních mechanismech účinků Spiruliny, zejména těch hypolipidemických (59).

6.3 Hypolipidemické účinky

Ačkolí byl vliv Spiruliny na hladinu lipidů jasně prokázán v řadě preklinických i klinických studií, mechanismus hypolipidemického účinku je nám stále nejasný.

Účinná látka, která je zodpovědná za hypolipidemickou aktivitu dosud nebyla identifikována. Díky studii s koncentrátem *Spiruliny platensis* (SPC) se zjistilo, že SPC může vázat cholesterolové metabolity žlučových kyselin a rovněž může snižovat rozpustnost cholesterolu, a tím tak podporovat jeho vylučování stolicí. Předpokládá se, že tohle by mohl být jeden z hypolipidemických mechanismů SPC.

Fykocyanin je ve vodě rozpustný protein obsažený ve *Spirulině*. Konzumace fykocyaninového preparátu získaného z koncentrátu SPC výrazně snížila aterogenní index i hladinu celkového cholesterolu. Proto se o fykocyaninu uvažuje jako o potenciální účinné látce zodpovědné za hypolipidemickou aktivitu. Pro potvrzení těchto závěrů je třeba provést řadu dalších studií zaměřených na čistý extrakt fykocyaninu (60).

6.3.1 Preklinické studie

Hypolipidemický účinek *Spiruliny* a jejích extraktů byl prokázán u řady zvířecích modelů zahrnujících myši, potkany, křečky a králíky. V myších studiích, kde byly myši krmeny vysoko cholesterolovou dietou s příměsí *Spiruliny* (16% potravy), došlo k výraznému snížení celkového plasmatického cholesterolu, LDL, VLDL a fosfolipidů. Naopak hladina HDL zaznamenala podstatné zvýšení oproti normálu. Také hladina jaterních triglyceridů byla po požití *Spiruliny* a vysoko tučné diety snížena (63).

Další výzkum za experimentálně upravených podmínek byl proveden u „Wistar“ potkanů. Speciálně upravenou stravou s 68% fruktózy bylo docíleno hyperlipidémie. Zařazením *Spiruliny* (5%, 10%, 15%) do této diety došlo k markantnímu zlepšení lipidového profilu. Bylo pozorováno zvýšení aktivity lipoproteinové a jaterní lipázy. Díky tomu se předpokládá, že zvýšení těchto lipáz je jedním z mechanismů hypolipidemické aktivity *spiruliny* při uměle navozené vysokofruktóзовé dietě (62).

Po zařazení *Spiruliny* do běžné stravy bylo prokázáno zlepšení lipidového profilu i u potkanů, kterým byla předem intraperitoneálně aplikována injekce tetrachlormetanu, pro navození hyperlipidémie. Hypolipidemický účinek *Spiruliny* byl potvrzen i u diabetických myších modelů. U těchto modelů byly diabetické podmínky navozeny podáváním aloxanu (59).

Hypolipidemické účinky zjištěné u myši a potkanů byly ověřeny ve dvou studiích na křečcích a králících. U skupiny křečků, kteří byli krmeni aterogenní dietou s příměsí *Spiruliny* nebo jejího fykocyaninového extraktu došlo k snížení celkového cholesterolu,

LDL, VLDL, zatímco hladina HDL nebyla ovlivněna. Dále byla pozorována redukce tukových proužků v aortách křečků, což svědčí pro antiaterogenní účinek spiruliny. U králíků byla po podávání vysokocholesterolové stravy se Spirulinou pozorována snížená hladina cholesterolu až o 49% a zvýšená hladina HDL o 25% (63).

6.3.2 Klinické studie

Byla provedena řada klinických studií k posouzení hypolipidemické aktivity Spiruliny u lidí. Cílové skupiny zahrnovaly zdravé dobrovolníky, pacienty s ICHS, s diabetem mellitus 2. typu, nefrotickým syndromem a starší pacienty s nebo bez cholesterolemie. Denní dávka Spiruliny, délka užívání a výsledky testování jsou patrné z tabulky č. 5.

Tabulka 5: Hypolipidemické účinky Spiruliny; souhrn výsledků klinických studií (59).

Skupina	Počet	Dávka a Doba užívání	Účinek
<i>Pacienti s ICHS</i>	30	2g nebo 4g Po 3 měsíce	Výrazně byla snížena hladina celkového cholesterolu o 22,4% (2g)/33,5% (4g), LDL o 31%/45%, VLDL o 22%/23% a triglyceridy o 22%/23%. Hladina HDL se naopak zvýšila o 11,5%/12,8%. Rovněž u obou skupin došlo k výraznému snížení váhy.
<i>Pacienti s nefrotickým syndromem</i>	23	1g po 2 měsíce	Celková hladina cholesterolu, LDL a triglyceridů byla u všech snížena a to o 1,19mmol/l, 0,86mmol/l a 1,17mmol/l. Také poměr LDL/HDL a celkový cholesterol/HDL byl výrazně snížen.
<i>Zdraví dobrovolníci</i>	36	4,5g po 6 týdnů	Celkový plasmatický cholesterol a triglyceridy byly sníženy o 10% a 28%. Hladina HDL vzrostla o 15%., zatímco LDL se podstatně snížila. Současně se jak u mužů, tak u žen normalizovala hladina krevního tlaku.
<i>Pacienti s diabetem mellitus</i>	15	2g po 2 měsíce	Výrazné snížení bylo zjištěno u hladiny triglyceridů, celkového cholesterolu a volných žlučových kyselin. LDL a VLDL se rovněž snížily a navíc se snížila i hladina cukru v krvi a glykovaný hemoglobin.
<i>Zdraví starší dobrovolníci</i>	78	8g po 16 týdnů	Celková plasmatická hladina cholesterolu a LDL byla výrazně snížena u žen, zatímco u mužů nebyla pozorována statisticky významná redukce. Hladina HDL a triglyceridů nebyla rovněž ovlivněna.

Shrnutí výsledků klinických testů

Uvažujeme-li komplexně nad těmito studii, nemůžeme opomenout rozdíly v typech studií, malých počtech účastníků v testovaných skupinách i rozdílech ve zdravotním stavu dobrovolníků. To všechno značí na určitý nesoulad v reakcích na podávání Spiruliny. I přes to, že na vyslovení dostatečné průkaznosti účinku neexistuje dostatek dat a informací, souhrnná data z těchto studií ukazují na hypolipidemický efekt Spiruliny u lidí. Většina těchto studií je bohužel limitována omezeným počtem osob v testovaných skupinách a poměrně jednoduchým experimentálním designem. K potvrzení validních hypolipidemických účinků je třeba provést další studie se zaměřením na tyto nedostatky (59).

6.4 Antioxidační a protizánětlivé účinky

Jak oxidační stres, tak rozvoj zánětu přispívají k patogenezi KVO, zahrnujících aterosklerózu, srdeční hypertrofii, srdeční selhání a hypertenzi. Při KVO dochází k nadprodukci reaktivních sloučenin kyslíku (ROS), které působí oxidační stres endoteliálními buňkami, a tím dochází k jejich dysfunkci. Následkem oxidačních změn dochází k remodelaci a dysfunkci endotelu. Rovněž oxidace LDL částic patří mezi nezbytné procesy pro rozvoj aterosklerózy. Kromě souvislosti s poruchou v metabolismu lipidů je ateroskleróza považována za chronické zánětlivé onemocnění. Látky s antioxidační či protizánětlivou aktivitou jsou v rozvoji KVO považovány za přínosné (64).

Spirulina obsahuje několik účinných látek, zejména **fykocyanin** a **β -karoten**. Tyto látky mají potenciální antioxidační a protizánětlivý účinek. Fykocyanin má schopnost vyhledávat volné radikály, snižovat produkci škodlivých dusitanů, potlačovat expresi inhibitorů NO syntézy a zabraňovat mikrosomální peroxidaci lipidů v játrech.

Z dalších protizánětlivých aktivit dokáže fykocyanin inhibovat vznik zánětlivých cytokinů (TNF- α), potlačit expresi COX-2 a snížit produkci prostaglandinu E.

β -karoten přispívá k omezení peroxidace lipidů, jež způsobuje singletový kyslík. Studie rovněž ukázaly, že β -karoten inhibuje produkci prostaglandinu E a potlačuje expresi iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 a IL-12 (65).

6.4.1 Preklinické a klinické studie

In vitro studie

Výsledky *in vitro* studií jasně ukazují na antioxidační a protizánětlivou aktivitu Spirulinového extraktu. Bylo zjištěno, že Spirulina podporuje aktivitu buněčných antioxidačních enzymů, inaktivuje volné kyslíkové radikály a také omezuje metabolickou aktivitu funkčních neutrofilů, které spouští zánětlivou odezvu. Dále *in vitro* studie prokázaly, že spirulinový etanolický extrakt zvyšuje syntézu a uvolňování oxidu dusnatého. Rovněž inhibuje syntézu a uvolnění vazokonstrikčních metabolitů z kyseliny arachidonové.

In vivo studie

Byla provedena řada zvířecích testů k potvrzení antioxidačních a protizánětlivých účinků Spiruliny. 2 skupiny *in vivo* studií potvrdily, že Spirulinový extrakt zvyšuje syntézu a uvolňování NO a redukuje endoteliální syntézu vazokonstrikčního prostanoïdu. Souhrnná data z *in vivo* studií potvrdila, že konzumace Spiruliny zklidňuje nebo předchází oxidačnímu stresu a zánětu. Ačkoli tyto studie nebyly přímo zaměřené na zkoumání účinků na KVO, závěry jasně ukazují na antioxidační a protizánětlivé aktivity Spiruliny *platensis*.

Klinické studie

Na rozdíl od preklinických studií, klinických pokusů zatím nebylo provedeno dostatečné množství, aby se mohly formulovat určité závěry ohledně antioxidačních a protizánětlivých účinků Spiruliny u lidí (59).

7 CÍL PRÁCE, ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo detekovat a kvantifikovat endoteliální expresi P-selektinu v aortě apoE-deficientních myší po podávání *Spiruliny platensis*. K hodnocení exprese byly použity imunohistochemické metody a ke kvantifikaci stereologické metody.

8 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Zvířata a předepsaná dieta

Samci myši kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E (apoE^{-/-}) 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 40 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 vylučněna 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 Imunohistochemie

Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a v části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm na zmrazovacím mikrotomu. Řezy byly přeneseny na sklíčka, která byla předem upravena v roztoku želatiny. Tato sklíčka se nechala oschnout (60 min).

Pro detekci exprese P-selektinu v aortálních řezech byla použita metodika s avidin-biotinovým komplexem (ABC) a vizualizací pomocí diaminobenzidinu (DAB). V místě detekce antigenu ve tkáni poskytuje DAB hnědou barevnou reakci. K imunohistochemické detekci byly použity následující protilátky:

Primární protilátka:

goat anti-mouse P-selectin (Santa Cruz, sc-6943)

Sekundární protilátka:

horse anti-goat IgG (Vector Laboratories)

8.3.1 Pracovní postup – ABC metodika

Před vlastní analýzou se řezy fixovaly 20 min v acetonu při -20°C a následně se 15 min sušily. Díky tomu došlo k fixaci a pevnější adhezi řezů na podložní sklíčko. Po oschnutí řezů byla sklíčka na 2x5 min vložena k promytí do pufru z hydrogenfosforečnanových solí (PBS). Potom byl na řezy napipetován roztok 10% goat séra v PBS (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo), (30min), který zablokoval nespecifická vazebná místa před vlastní aplikací primární protilátky. Poté byl na sklíčka s řezy nanesen roztok anti-avidinu D (15 min) a po promytí v PBS (5 min) na 15 min nanesen roztok anti-biotinu. Tyto roztoky byly použity pro zabránění nežádoucí reaktivity těchto látek v myší tkáni. Po oplachu v PBS nastala vlastní šedesátiminutová inkubace tkáňových řezů s primární protilátkou - goat anti-mouse P-selectin (Santa Cruz, sc-6943). Další fází bylo promytí v PBS (2x5 min) a patnáctiminutová aplikace 10% goat séra v PBS. Následovala inkubace řezů se sekundární protilátkou (30 min) - horse anti-goat IgG (Vector Laboratories). Po promytí v PBS (5 min) byla sklíčka vložena na 15 min do roztoku 3% H₂O₂ a znovu propláchnuta v PBS (2x5 min). Dále byl na sklíčka pro zesílení vizualizace nanesen avidin-biotinový komplex (ABC) obsahující peroxidázový substrát (Vector Laboratories). K vizualizaci navázaných protilátek se po pětiminutovém oplachu v PBS použil diaminobenzidin (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Po inkubaci s DAB byla sklíčka opláchnuta v destilované vodě. Na závěr byly řezy odvodněny. Nejprve byly opláchnuty acetonem a poté byly vloženy na 3 min do roztoku aceton-xylen (10:1) a následně na 3 min do roztoku aceton-xylen (1:10). Sklíčka byla montována Eukittem. Fotofokumentace a digitalizace snímků pořízených mikroskopem

Olympus AX 70 byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., Kanada) pomocí softwaru NIS (Laboratory Imaging, Česká republika). Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

8.3.2 Kvantitativní analýza imunohistochemie – stereologická analýza

Plocha velikosti endoteliální exprese P-selektinu byla kvantifikována pomocí stereologických metod. Nejprve se nakrájela série 100 řezů o tloušťce 7 μ m. Byl proveden systematický náhodný výběr řezů z referenčního objemu. První řez pro každé barvení byl vybrán náhodně a pak se vybral každý 12 řez, takže osm řezů barvení bylo použito ke stereologickému odhadu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 100 průsečíků mezi body sítě a P-selektin barvením na cévním endotelu na jednu z cév. Odhadovaná plocha barvení se vypočetla podle vzorce:

$$estA = a * P,$$

kde parametr a charakterizuje plochu příslušející jednomu testovacímu bodu a P je počet průsečíků mezi body testovací sítě a pozitivitou barvení (66).

8.3.3 Statistická analýza

Hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Statistická významnost rozdílů ve skupinách byla hodnocena t-testem pomocí softwaru GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., Kalifornie). P hodnoty 0,05 nebo méně byly považovány za statisticky významné.

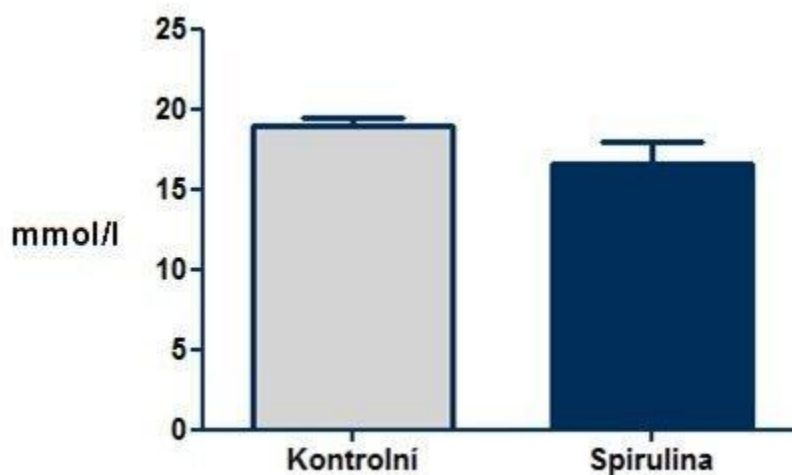
9 VÝSLEDKY

9.1 Biochemická analýza

Biochemická analýza neprokázala signifikantní změny v hladinách celkového cholesterolu u kontrolních myší ve srovnání se skupinou, které byla podávána Spirulina (18.99 ± 0.5 mmol/l vs 16.56 ± 1.3 mmol/l), (viz Graf 1).

Graf 1: Lipidový profil u myší kontrolních a myší krmených Spirulinou platensis.

Osmítýdenní podávání Spiruliny nevedlo ke statisticky významnému poklesu hladin celkového cholesterolu ($p = 0,0983$).



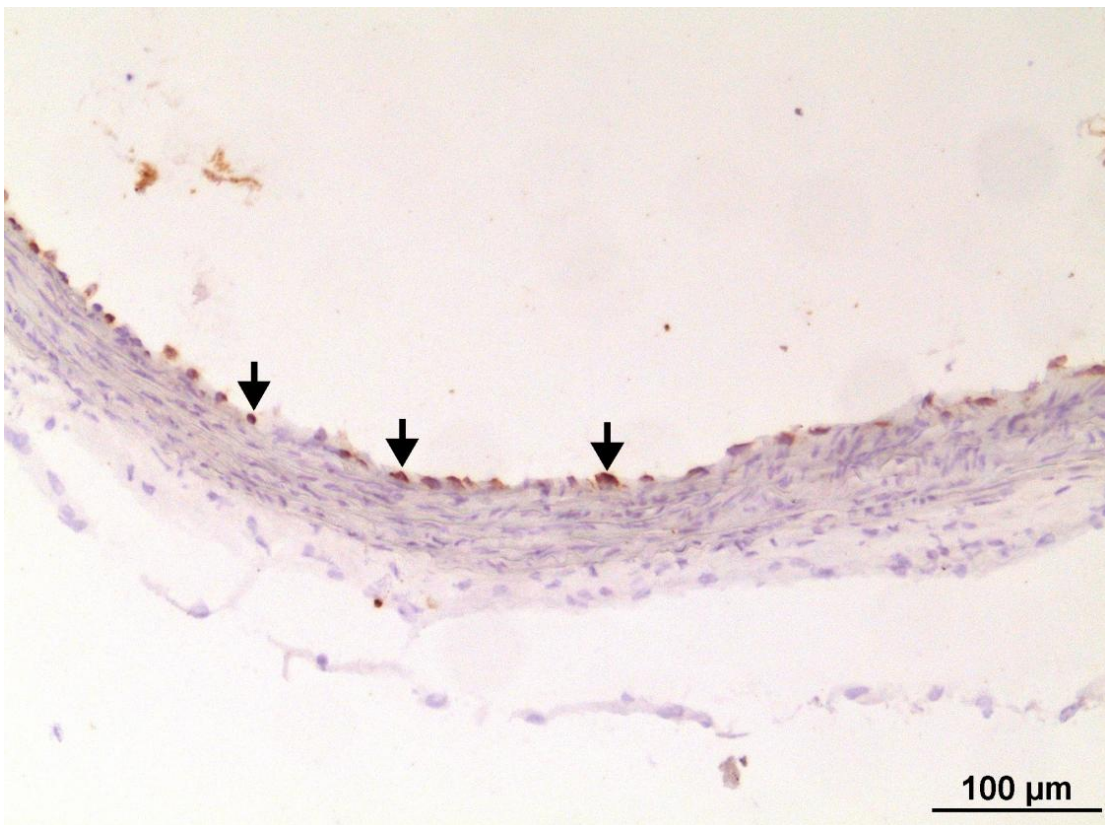
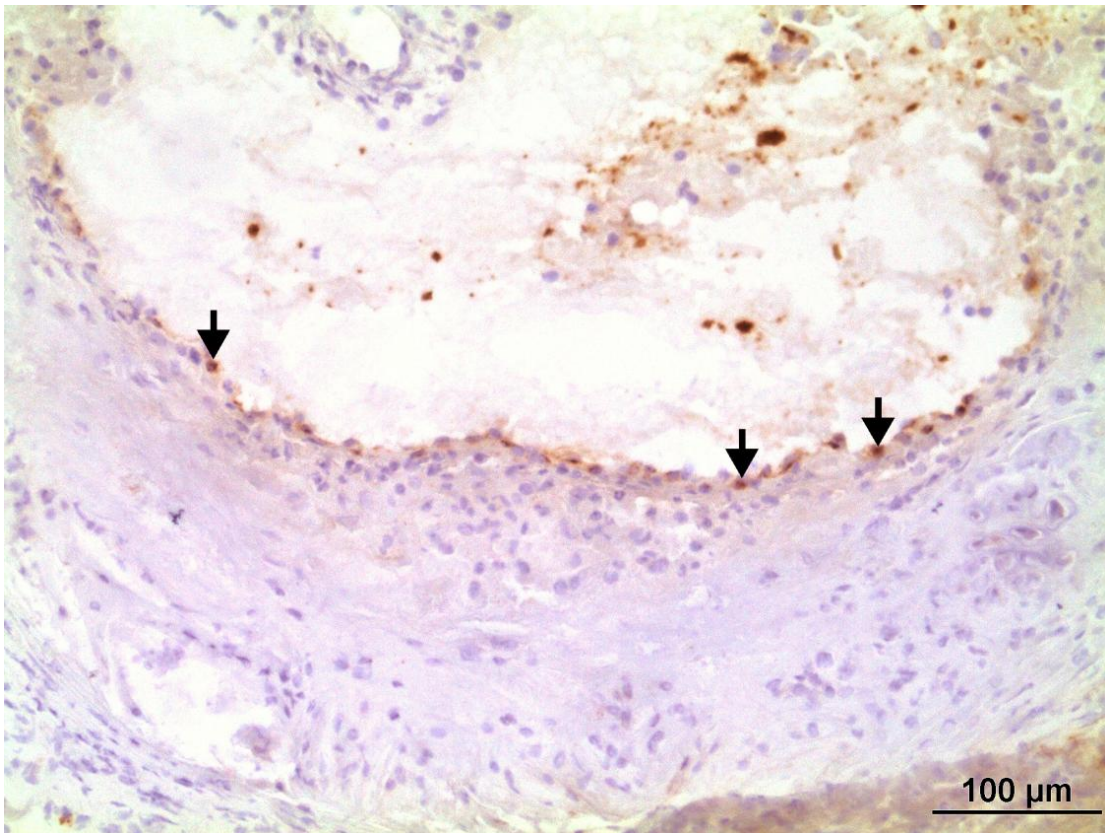
9.2 Imunohistochemická analýza

9.2.1 Imunohistochemické barvení P-selektinu v oblasti aortálního sinu

Expres P-selektinu byla pozorována u všech myší v experimentu. Expres byla detekována pouze na cévním endotelu plátu i mimo něj (viz Obr. 11-12). Imunohistochemická analýza byla provedena na 120 řezech z obou skupin myší. Expres P-selektinu byla velmi vyrovnaná u obou skupin zvířata a nebyly zde patrné významné změny z hlediska intenzity exprese (viz Obr. 11-12).

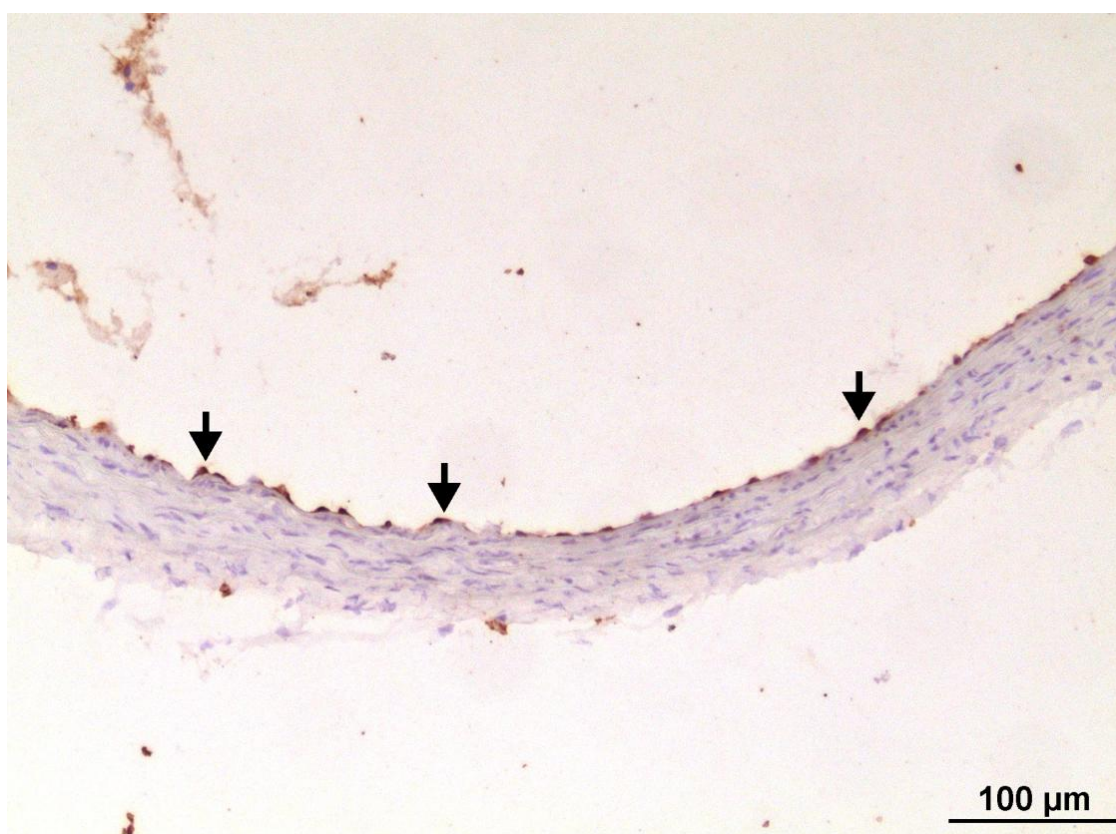
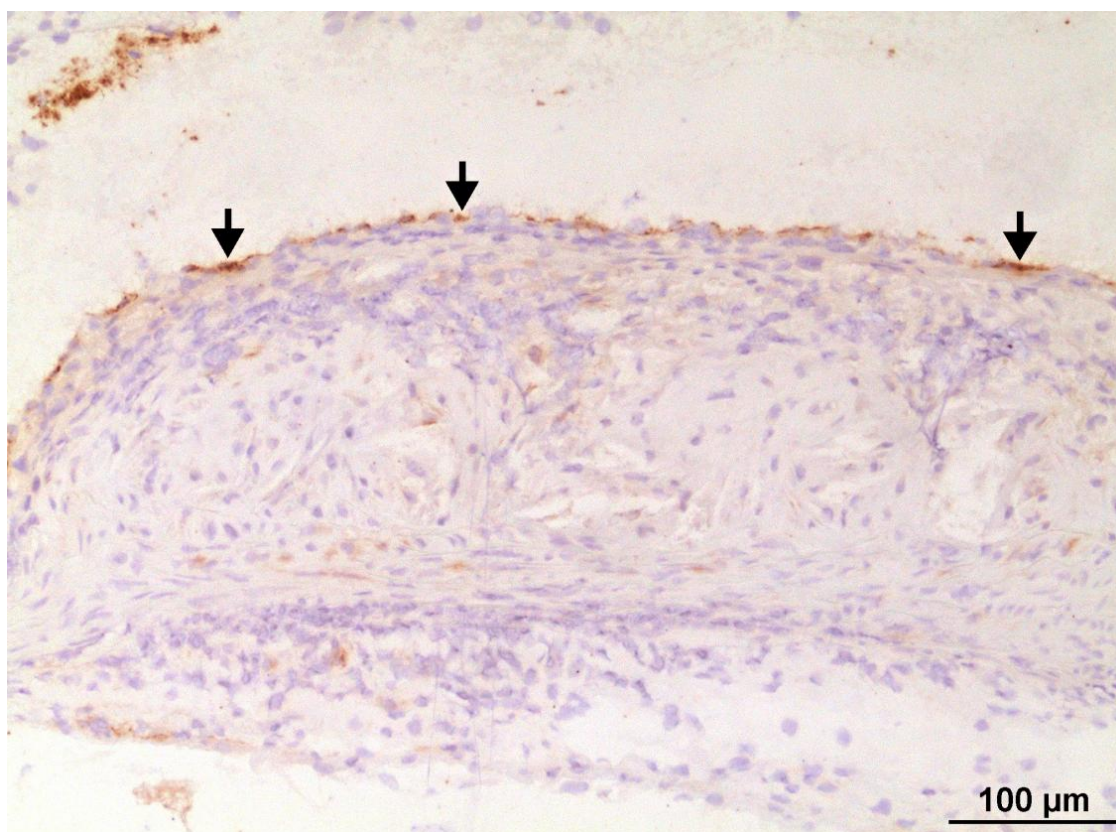
Obrázek 11: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení P-selektinu u kontrolní skupiny zvířat.

Exprese P-selektinu je detekována pouze na cévním endotelu plátu i mimo plát (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem.



Obrázek 12: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení P-selektinu u skupiny zvířat, kterým byla podávána *Spirulina platensis*.

Expres P-selektinu je detekována pouze na cévním endotelu plátu i mimo plát (šipky). Řezy jsou dobarveny hematoxylinem.

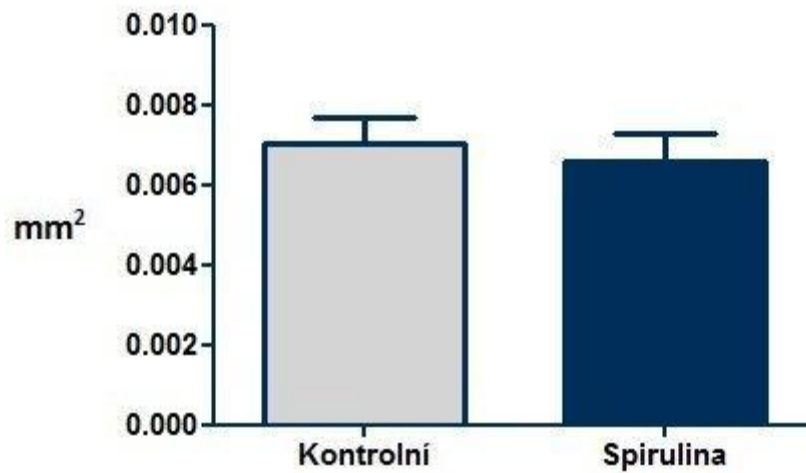


9.3 Stereologická analýza exprese P-selektinu v aortě

Stereologická analýza v zásadě potvrdila, že podávání *Spiruliny platensis* neovlivnilo endoteliální expresi P-selektinu ve srovnání s kontrolní skupinou ($0.007 \pm 0.001 \text{ mm}^2$ vs $0.007 \pm 0.001 \text{ mm}^2$), (viz Graf 2).

Graf 2: Stereologická analýza exprese P-selektinu v aortě.

Podávání Spiruliny nevedlo k signifikantní změně exprese P-selektinu ve srovnání s kontrolní skupinou ($p = 0,6615$).



10 DISKUZE

Hypercholesterolemie hraje zásadní roli v rozvoji aterosklerózy. Osobám se zvýšenou hladinou cholesterolu hrozí větší riziko kardiovaskulárních onemocnění. Dosud není plně objasněn přesný mechanismus vzniku hypercholesterolemické aterosklerózy, ale je zřejmé, že na jejím rozvoji se podílí oxidační stres, který vyplývá ze zvýšené produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Pokusy předejít nebo zabránit ateroskleróze proto souvisí se snahou snížit hladiny cholesterolu a redukovat buněčný stres (67).

Kromě statinů, které významně redukuje hladiny cholesterolu a působí výrazně ateroprotektivně se zkoumá také řada substancí, které nelze zařadit mezi léčiva. Protektivní účinky z hlediska kardiovaskulárních komplikací jsou pozorovány u vlákniny, jako psyllium, pectin, nebo celulóza (68).

Přípravky obsahující *Spirulina platensis* se pro svoje terapeutické účinky používají v léčbě mnoha onemocnění zahrnující hypercholesterolemii a aterosklerózu. Stejně tak se používá ke snížení hmotnosti u obézních lidí. Předpokládá se, že látky zodpovědné za tyto léčebné vlastnosti mají antioxidační schopnosti, například nenasycené mastné kyseliny a fykocyanin (69, 70).

Naše předchozí studie poukázaly na jisté hypolipidemické účinky spiruliny podávané hypercholesterolemickým myším (nepublikované výsledky). V současné době jsme navíc zjistili endotel-protektivní účinky spiruliny *in vitro* u endoteliálních buněk (Mgr. Stráský, nepublikované výsledky).

Proto jsme se v této diplomové práci snažili zachytit změny endoteliální exprese prozánětlivého a proaterogenního markeru, P-selektinu u apoE-deficientních myší, kterým byla podávána *Spirulina platensis*.

Podávání *Spiruliny platensis* nevedlo k signifikantním změnám v hladinách cholesterolu u těchto myší. Tento fakt poukazuje na možnou nízko zvolenou dávku Spiruliny nebo na krátkou dobu podávání, která by mohla být nedostačující pro snížení hladin takto vysokého cholesterolu. Navzdory tomu jsme přistoupili k analýze exprese P-selektinu v aortě.

Adhezní molekuly jsou látky proteinového charakteru, které jsou exprimované na povrchu všech tkání organismu. Selektiny představují skupinu 3 adhezivních molekul, konkrétně E-, L- a P-selektinu. P-selektin se nachází v alfa granulích destiček a Weibel-Paladeho těliscích endoteliálních buněk a je důležitý při interakci mezi leukocyty,

aktivovanými destičkami a endotelem. Jeho exprese je na klidovém endotelu velmi nízká. Expresi P-selektinu je zvýšená v aterosklerotických plátech. Navíc bylo zjištěno, že P-selektin je společně s VCAM-1 exprimován endotelem ještě před akumulací makrofágů a T lymfocytů v intimě cév. P-selektin se tedy významně podílí na iniciaci i progresi aterogeneze (71, 72).

Expresi P-selektinu jsme detekovali pouze na cévním endotelu aorty na povrchu plátu i mimo plát na intaktním endotelu, což je v souladu s literárními zdroji. Podávání spiruliny však neovlivnilo expresi P-selektinu, což bylo potvrzeno i stereologickou analýzou (73)

Expresi P-selektinu je snížena po podávání statinů, což ukazuje, že je možné jej použít jako marker účinnosti podávaného léčiva, či substance. Negativní výsledek z hlediska podávání Spiruliny však šlo očekávat neboť bez hypolipidemického účinku pravděpodobně nelze vidět výrazný vliv Spiruliny na cévní endotel během aterogeneze.

Změna dávkovacího schématu bude tedy zřejmě nutná k potvrzení endotel-protektivních účinků Spiruliny *in vitro* v podmínkách *in vivo* aterogeneze (74).

11 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda *Spirulina platensis* ovlivňuje endoteliální expresi adhezní molekuly P-selektinu v aortě apoE-deficientních myší.

Podávání spiruliny nevedlo k signifikantním změnám hladin cholesterolu ve srovnání s neléčenou skupinou.

Expresie P-selektinu byla detekována pouze na cévním endotelu na povrchu plátů i mimo plát u všech zvířat v experimentu.

Stereologická analýza imunohistochemického barevní P-selektinu neprokázala signifikantní vliv podávání spiruliny *platensis* na jeho expresi.

Změna dávkovacího schématu bude tedy zřejmě nutná k potvrzení endotel-protektivních účinků spiruliny *in vitro* v podmínkách *in vivo* aterogeneze.

12 SEZNAM ZKRATEK

ABC	Avidin-biotinový komplex (avidin-biotin complex)
ABCA-1	ATP-binding cassette sub-family A member 1 transporter
ABCG-1	ATP-binding cassette sub-family G member 1 transporter
ACEi	Inhibitor angiotensin konvertujícího enzymu (angiotensin-converting-enzyme inhibitor)
AIM	Akutní infarkt myokardu
AP	Angina pectoris
ApoB	Apolipoprotein B
ApoE	Apolipoprotein E
BSA	Bovine serum albumin
C57BL/6	Inbrední myš kmen (C57 black 6)
CCL-2	Chemokinový ligand 2 (C-C motif ligand 2)
CCR-2	Chemokinový receptor 2 (C-C motif receptor 2)
CD36	Scavengerový receptor (cluster of differentiation 36)
CMP	Cévní mozková příhoda
COX-2	Cyklooxygenáza 2
CRP	C- reaktivní protein
CSF	Kolonie stimulující faktor (colony stimulating factor)
DAB	Diaminobenzidin
estA	Odhadovaná plocha barvení
FGF	Fibroblastový růstový faktor (fibroblast growth factor)
HDL	Lipoprotein o vysoké hustotě (high density lipoprotein)
ICAM-1	Mezibuněčná adhezní molekula 1 (intercellular adhesion molecule 1)

ICHDK	Ischemická choroba dolních končetin
ICHS	Ischemická choroba srdeční
IFN- γ	Interferon γ
IgG	Imunoglobulin G
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-12	Interleukin 12
IL-18	Interleukin 18
IM	Infarkt myokardu
iNOS	Inhibitors nitric oxide synthase
KVO	Kardiovaskulární onemocnění
LDL	Lipoprotein o nízké hustotě (low density lipoprotein)
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
M-CSF	Monocyte colony-stimulating factor
MMPs	Matrix metalloproteinases
NMK	Nenasycené mastné kyseliny
NO	Oxid dusnatý (nitric oxid)
OCT	Medium (optimal cutting temperature)
PBS	Fosfátový pufr (phosphate buffered saline)
pJPB63	Plasmid JPB63
pNMC109	Plasmid NMC109
PDGF	Destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor)

PECAM-1	Destičková adhezivní molekula (platelet-endothelial cell adhesion molecule)
PF4	Destičkový faktor 4 (platelet factor 4)
PPARs	Peroxisome proliferator-activated receptors
PSGL-1	P-selektin glykoprotein ligand 1
PTX3	Dlouhý pentraxin (pentraxin-related protein)
ROS	Reaktivní kyslíkové sloučeniny (reactive oxygen species)
SEM	Střední chyba průměru
SPC	Koncentrát <i>Spiruliny platensis</i> (<i>Spirulina platensis</i> concentrate)
TLRs	Toll-like receptors
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
TGF- β	Transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)
USA	Spojené státy americké (United State of America)
VCAM-1	Cévní adhezivní molekula 1 (vascular cell adhesion molecule 1)
VLDL	Lipoprotein o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein)
VSCMs	Hladkosvalové buňky (vascular smooth muscle cells)

13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. George, S. a J. Johnson. *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanismus*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2010. ISBN 978-3-527-32448-4. s. 3.
2. Zemřelí 2009. *ÚZIS* [online]. [cit. 2012-12-29]. Dostupné z: <http://uzis.cz/cr-kraje>
3. Mačák, J. a J. Mačáková. *Patologie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 80-247-0785-3. s. 171.
4. Vlček, J. a D. Fialová. *Klinická farmacie I*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2010. ISBN 978-80-247-3169-8. s. 109.
5. Býma, S. a J. Hradec. *Prevence kardiovaskulárních onemocnění: Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné lékaře*. Společnost všeobecného lékařství ČSL JEP, 2004. ISBN 80-903573-5-0. s. 1.
6. Junqueira, L. C. et al. *Základy histologie*. 7. vydání. Jinočany: H&H, 1999. ISBN 80- 85787-37-7 s. 204-208.
7. Konrádová, V., J. Uhlík a L. Vajner. *Funkční histologie*. 2. vydání. Jinočany: H, 2000. ISBN 80-86022-80-3. s. 120-121.
8. Masopust, J. et al. *Patobiochemie buňky*. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003. ISBN 80-239-1011-6. s. 88–92.
9. Jelínek, R., M. Dostál a Z. Lipovský. *Histologie a embryologie*. 1993. Skripta. 3. Lékařská fakulta. s. 109-110.
10. Lasheras, Juan C. The Biomechanics of Arterial Aneurysms. 2007, **39**, (1), s. 295.
11. Malík, J. Funkce endotelu – klíč k pochopení aterosklerózy? *Zdravotnické noviny: Lékařské listy*. 2003. **19**. s. 18.
12. Nečas, E. et al. *Obecná patologická fyziologie*. Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0051-X. s. 106.
13. Deanfield, J., A. Donald, C. Ferri et al. Endothelial function and dysfunction.: Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds. *Journal of Hypertension*. 2003, **23** (1), s. 7-17.
14. Ross, R., J. Glomset a L. Harker. Response to injury and atherogenesis. *American Journal of Pathology*. 1977, **86** (3), s. 675-684.
15. George, S. a J. Johnson. *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanismus*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2010. ISBN 978-3-527-32448-4. s. 3-5.
16. Allender, S., V. Peto, P. Scarborough et al. *Coronary Heart Disease Statistics*, British Heart Foundation, 2008, London.

17. Stary, H. C., A. B. Chandler, V. Fuster. et al. A definition of advanced types of atherosclerosis lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*. 1995, **15** (9), s. 1512-1531.
18. Fuster, V., L. Badimon, J. J. Badimon et al. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (first of two parts). *The New England Journal of Medicine*. 1992, **326** (4), s. 242-250.
19. Ross, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*. 1999, **340** (2), s. 115-123.
20. Soška, V. *Poruchy metabolismu lipidů. Diagnostika a léčba*. 1. Praha: Grada Publishing, 2001. ISBN 80-247-0234-7. s. 23-25.
21. George, S. a J. Johnson. *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanismus*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2010. ISBN 978-3-527-32448-4. s. 6-8
22. Masserberg, S., K. Brand, S. Gruner et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *Journal of Experimental Medicine*. 2002, **196**, s. 887-896.
23. Huo, Y., a K. Ley. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2001, **173**, s. 35-43.
24. Libby, P. Atherosclerosis: the new view. *Scientific American*. 2002, **May**, s. 47-55.
25. Tedgui, A. a Z. Mallat. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological Reviews*. 2006, **86**, s. 515-581.
26. Edfeldt, K., A. M. Bennet, P. Eriksson et al. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *European Heart Journal*. 2004, **25** (16), s. 1447-1453.
27. Salio, M., S. Chimenti, N. de Angelis et al. Cardioprotective function of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2008, **117** (8), s. 1055-1064.
28. Li, A. C. a C. K. Glass. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature Medicine*. 2002, **8** (11), s. 1235-1242.
29. Van Berkel, T. J. C., R. Out, M. Hoekstra et al. Scavenger receptors: friend or foe in atherosclerosis?. *Current Opinion in Lipidology*. 2005, **16** (5), s. 525-535.
30. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002, s. 868-874.

31. Kovanen, P. T. Mast cells in human fatty streaks and atheromas: implications for intimal lipid accumulation. *Current Opinion in Lipidology*. 1996, **7** (5), s. 281-286.
32. Newby A. C. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovascular Research*. 2006, **69** (3), s. 614.
33. Van der Wall, A. C. a A. E. Becker. Atherosclerotic plaque rupture - pathologic basic of plaque stability and instability. *Cardiovascular Research*. 1999, **41** (2), s. 334-344.
34. Fay, W. P., N. Garg a M. Sunkar. Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007, **27** (6), s. 1231-1237.
35. Newby, A. C. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008, **28** (12), s. 2108-2114.
36. De Boer, O. J., A. C. van der Wal, P. Teeling a A. E. Becker. Leukocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization?. *Cardiovascular Research*. 2004, **41** (2), s. 443-449.
37. Kolodgie, F. D., H. K. Gold a A. P. Burke. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *The New England Journal of Medicine*. 2003, **349** (24), s. 2316-2325.
38. Harper, M. T. a A. W. Poole. Isoform-specific functions of protein kinase C: the platelet paradigm. *Biochemical Society Transactions*. 2007, **35**, s. 1005-1008.
39. Ignatowski, A. C. Influence of animal food on the organism of rabbits. *S Peterb Izviest Imp Voyenno Med Akad*. 1908, **16**, s. 154-173.
40. Faggiotto, A. a R. Ross. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Atherosclerosis*. 1985, **4**, s. 341-356.
41. Paigen, B., C. Morrow, C. Brandon et al. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis*. 1985, **57**, s. 65-73.
42. Liao, F., A. Andalibi, F. C. de Beer et al. Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 1993, **91**, s. 2572-2579.
43. Waterson, R. H., K. Lindbad-Toh, E. Birney et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002, **420**, s. 520-562.

44. Piedrahita, J. A., S. H. Zhang, J. R. Hagaman et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *PNAS*. 1992, **89**, s. 4471-4475.
45. Nakashima, Y., A. S. Plump, E. W. Raines et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1994, **14**, s. 133-140.
46. Reddick, R. L., S. H. Zhang, N. Maeda et al. Atherosclerosis in mice lacking apoE. evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1994, **14**, s. 141-147.
47. Andrew, D. Blan, Nadar K. Sunil, Gregory Y. H. Lip et al. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *European Heart Journal*. 2003, **24**, s. 2166-2179
48. Khew-Goodall, Y., C. M. Butcher, M. S. Litwin et al. Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cells cytokine, interleukin-3. *Blood*. 1996, **87** (4), s. 1432-1438.
49. Armstead, V. E., A. G. Minchenko, R. A. Schuhl et al. Regulation of P-selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide. *American Journal of Physiology*. 1997, **273** (2 Pt 2), s. H740-H74.
50. Dore, M., R. J. Korthuis, D. N. Granger et al. P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood*. 1993, **82** (4), s. 1308-1216.
51. Johnson, R. C., S. M. Chapman a Z. M. Dong. Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 1997, **99**, s. 1037-1043.
52. Johnson-Tidey, R. R., J. L. McGregor, P. R. Taylor et al. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques: coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *American Journal of Pathology*. 1994, **144**, s. 952-961.
53. Chong, B. H., B. Murray, M. C. Berndt et al. Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders. *Blood*. 1994, **83**, (6), s. 1535-1541.
54. Riondino, S., P. Pignatelli a F. M. Pulcinelli et al. Platelet hyperactivity in hypertensive older patients is controlled by lowering blood pressure. *Journal of the American Geriatrics Society*. 1999, **32** (12), s. 943-947.
55. Puccetti, L., A. L. Pasqui a M. Pastorelli et al. Time-dependent effect of statins on platelet function in hypercholesterolemia. *European Journal of Clinical Investigation*. 2002, **32** (12), s. 901-908.

56. Sapp, J. The prokaryote-eukaryote dichotomy: Meanings and mythology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2005, **69**, s. 292-294.
57. Khan, Z., P. Bhadouria a P. S. Bisen. Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2005, **6**, s. 373-379.
58. Hronek, M. Spirulina platensis: Preklinické a klinické studie. [online]. [cit. 2012-03-12]. Dostupné z:
http://www.healthlink.cz/fileadmin/user_upload/produkty/potravinove_doplanky/spirulina_komplet.pdf
59. Ruitang, D. a T. J. Chow. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae Spirulina. *Cardiovascular Therapeutics*. 2010, **28**, e33-e45.
60. Nagaoka, S., K. Schimizu, H. Kaneko et al. A novel protein C-phycoyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of Spirulina platensis concentrate in rats. *Journal of Nutrition*. 2005, **135**, s. 2425-2430.
61. Kato, T., K. Takemoto, H. Katayama et al. Effects of Spirulina (Spirulina platensis) on dietary hypercholesterolemia in rats. *Journal of Japan Society of Nutrition and Food Sciences*. 1984, **37**, s. 323-332.
62. Iwata, K., T. Inayama, T. Kato et al. Effect of Spirulina platensis on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 1990, **36**, s. 165-171.
63. Riss, J., K. Décordé, T. Sutra et al. Phycobiliprotein C-phycoyanin from Spirulina platensis is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, **55**, s. 7962-7967.
64. Dhalla, N. S., R. M. Temsah, T. Netticadan et al. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension*. 2000, **18**, s. 655-673.
65. Romay, C. H., R. Gonzáles a N. Ledón. C-phycoyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*. 2003, **4**, s. 207-216.
66. Nachtigal, P., V. Semecky, M. Kopecky et al. Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathology - Research and Practice*. 2002, **200**, s. 219-229.
67. Bjorkbacka H. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Current Opinion in Lipidology*. 2008, **19**, s. 548-549.

68. Jamborova, G., N. Pospisilova, V. Semecky et al. Microdispersed Oxidized Cellulose as a novel potential substance with hypolipidemic properties. *Nutrition*. 2008, **24**, s. 1174-1181.
69. Riss, J., K. Decorde, T. Sutra et al. Phycobiliprotein C-phycoyanin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, **55**, s. 7962-7967.
70. Nagaoka, S., K. Shimizi, H. Kaneko et al. A novel protein C-phycoyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *Journal of Nutrition*. 2005, **135**, s. 245-2430.
71. Galkina, E. a K. LEY. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007, **27**, s. 2292-2301.
72. Demerath, E., B. Towne, J. Blangero et al. The relationship of soluble ICAM-1, VCAM-1, P-selectin and E-selectin to cardiovascular disease risk factors in healthy men and women. *Annals of Human Biology*. 2001, **28**, s. 664-678.
73. Sakai, A., N. Kume, E. Nishi et al. P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997, **17**, s. 310-316.
74. Nachtigal, P., M. Kopecky, D. Solichova et al. The changes in the endothelial expression of cell adhesion molecules and iNOS in the vessel wall after the short-term administration of simvastatin in rabbit model of atherosclerosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2005, **57**, s. 197-203.