

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd



Vliv *Spirulina platensis* na endoteliální expresi ICAM-1 u myši

Effects of *Spirulina platensis* on endothelial expression of ICAM-1 in mice

(diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce
Hradec Králové 2012

doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.
Vladimíra Maxová

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

„Poděkování patří doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za příjemnou spolupráci, cenné rady a odborné vedení, Mgr. Janě Rathouské za rady při experimentální části této práce a mé rodině a přátelům za povzbuzení.“

Abstrakt

Vladimíra Maxová

Vliv *Spirulina platensis* na endoteliální expresi ICAM-1 u myši.

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce: Cílem bylo zjistit a popsat vliv podávání *Spirulina platensis* na endoteliální expresi ICAM-1 v aortě ApoE-deficientních myši za použití imunohistochemických a stereologických metod.

Metody: Použitá zvířata byli myši samci kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E ve stáří 3 měsíců. Myši byli náhodně rozděleny do dvou skupin, z nichž každá byla krmena speciální aterogenní stravou s obsahem 1% cholesterolu po dobu 8 týdnů. Myším ve *Spirulina platensis* skupině bylo denně k dietě přidáváno 40mg Spiruliny. Poté byla provedena biochemická analýza vzorků krve odebraných ze srdce a imunohistochemická a stereologická analýza materiálu z aortálního sinu a horní části aortálního oblouku. Detekce exprese ICAM-1 byla uskutečněna pomocí metodiky Avidin-Biotin Complex (ABC) s využitím detekce diaminobenzidinem (DAB).

Výsledky: Biochemická analýza neprokázala signifikantní změny hladin celkového cholesterolu po 8 týdnech podávání Spiruliny v porovnání s kontrolní skupinou. Imunohistochemickým barvením se prokázala exprese ICAM-1 v endotelu i aterosklerotických plátech u obou skupin zvířat. Intenzita zbarvení se nelišila v obou skupinách. Stereologická analýza neprokázala signifikantní změny v endoteliální expresi ICAM-1 po podávání Spiruliny ve srovnání s kontrolní skupinou.

Závěr: Změna experimentálního designu v budoucích studiích by měla prokázat, zda zvyšování dávky *Spirulina platensis* může vést k antiaterogenním účinkům u těchto myši.

Abstract

Vladimíra Maxová

Effects of *Spirulina platensis* on endothelial expression of ICAM-1 in mice

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background: The aim of this diploma thesis was to identify and describe effects of administration of *Spirulina platensis* on endothelial expression of ICAM-1 in ApoE-deficient mice using immunohistochemical and stereological methods.

Methods: We used strain C57BL/6J male mice deficient in apolipoprotein E, in age of 3 months. Mice were randomly divided into two groups, each of which was fed a special diet containing 1% cholesterol for 8 weeks. *Spirulina platensis* was added daily at a dose 40 mg to *Spirulina*-group mice. Biochemical analysis was performed in blood, and immunohistochemical and stereological analysis was performed of aorta. Detection of expression of ICAM-1 was carried out by using Avidin-Biotin Complex methodology (ABC) using diaminobenzidine detection (DAB).

Results: Biochemical analysis revealed no effect of *Spirulina* treatment on levels of total cholesterol after 8 weeks when compared with non-treated mice. Immunohistochemical staining showed ICAM-1 expression in all mice in the experiment. The expression was visible in luminal endothelial cells, and also inside atherosclerotic lesions. No difference in the staining intensity of ICAM-1 was visible between both groups. Stereological analysis did not show statistically significant difference in the ICAM-1 endothelial expression after *Spirulina* treatment when compared with non-treated mice.

Conclusions: Change in the experimental design of future studies should show whether increasing the dose of *Spirulina platensis* can lead to demonstrate anti-atherogenic effects.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. MIKROSKOPICKÁ STAVBA CÉV, ARTÉRIÍ A ENDOTELU	10
2.1 OBECNÁ STAVBA KREVNÍCH CÉV	10
2.2 SPECIFICKÁ STAVBA KREVNÍCH CÉV	11
2.3 ENDOTEL	12
3. ATEROSKLERÓZA	13
3.1 ÚVOD	13
3.2 EPIDEMIOLOGIE	14
3.3 PATOGENEZE	14
3.3.1 ENDOTELOVÁ DYSFUNKCE	14
3.3.2 LIPIDY A JEJICH ROLE V ROZVOJI ATEROSKLERÓZY	15
3.3.3 BUŇKY HLADKÉHO SVALSTVA	16
3.3.4 PATOLOGIE ATEROSKLEROTICKÉ LÉZE A STABILITA PLÁTU	17
3.4 RECEPTORY	17
3.5 ENZYMY	18
3.6 KLINICKÉ PROJEVY A KOMPLIKACE	19
3.7 DIAGNOSTIKA	19
3.8 RIZIKOVÉ FAKTORY VZNIKU ATEROSKLERÓZY	20
4. ADHEZNÍ MOLEKULY	24
4.1 OBECNÉ VLASTNOSTI	24
4.2 SKUPINA IMUNOGLOBULINŮ	24
4.3 REGULACE ENDOTELIÁLNÍ CAM EXPRESE	25
4.4 CAM A ATEROSKLERÓZA	26
5. SPIRULINA PLATENSIS	27
5.1 HYPOLIPIDEMICKÉ EFEKTY	27
5.2 ANTIOXIDAČNÍ A PROTIZÁNĚTLIVÉ EFEKTY	28
5.3 MECHANISMUS ÚČINKU	29
5.3.1 HYPOLIPIDEMICKÝ EFEKT	29
5.3.2 ANTIOXIDAČNÍ A PROTIZÁNĚTLIVÝ EFEKT	29
5.4 BEZPEČNOSTNÍ PROFIL	29
6. MYŠÍ MODELY ATEROSKLERÓZY	31
6.1 APOLIPOPROTEIN E	32
6.2 APOE DEFICIENTNÍ MYŠÍ MODELY	32
6.3 APO-E/LDLR-DKO MYŠI	33

7. CÍL PRÁCE – ZADÁNÍ PRÁCE	34
8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
8.1 ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA	35
8.2 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	35
8.3 IMUNOHISTOCHEMIE	36
8.3.1 PRACOVNÍ POSTUP – ABC METODIKA	36
8.3.2 KVANTITATIVNÍ ANALÝZA IMUNOHISTOCHEMIE – STEREOLOGICKÁ ANALÝZA	37
8.3.3 STATISTICKÁ ANALÝZA	38
9. VÝSLEDKY	39
9.1 BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	39
9.2 IMUNOHISTOCHEMICKÁ ANALÝZA	39
9.2.1 IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ ICAM-1 V SINU AORTY	39
9.3 STEREOLOGICKÁ ANALÝZA ENDOTELIÁLNÍ EXPRESE ICAM-1 V AORTĚ	42
10. DISKUZE	43
11. ZÁVĚR	45
12. SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ	46
13. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	47
14. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49

1. ÚVOD

Podle údajů World Health Organisation jsou kardiovaskulární nemoci a jejich komplikace příčinou třetiny světové úmrtnosti. Jedná se především o ICHS a onemocnění mozkových cév. V České republice je úmrtnost na KVO jedna z nejvyšších v Evropě (asi 50% všech úmrtí (1,2)), ale v posledních letech začíná naštěstí klesat, během posledních dvaceti let o 35% (2).

Všechny příčiny vzniku aterosklerózy a ICHS nejsou známy (2), nicméně ICHS vzniká nejčastěji jako důsledek akutního nebo chronického omezení (či zastavení) krevního zásobení myokardu kvůli změnám na věnčitých tepnách. Následně probíhá ischemizace až nekrotizace tkáně. Důvod snížení prokrvení koronárními cévami je stenóza fixní (ateroskleróza, infekce, embolie apod.), dynamická (spasmus koronárních tepen), onemocnění malých cév nebo hypertrofie myokardu (3).

Ateroskleróza vzniká na podkladě zánětu a účastní se na ní dysfunkce endotelu, pronikání lipidů a monocytů do cévní stěny a proliferace buněk hladkého svalstva. Vznikají postupně tukové proužky, fibrózní a ateromový plát, který je stabilní, nebo nestabilní, a může tedy prasknout, a dochází k zachycování trombocytů. Vznik akutních forem ICHS má na svědomí ruptura aterosklerotického plátu, nasedající trombus, embolizace mikrotrombů a spasmus věnčitých tepen (3). Klinický obraz nemoci má projevy od zcela asymptomatického průběhu až po náhlou srdeční smrt (2).

První známky rozvíjejících se aterosklerotických lézí nalzáme dokonce již v dětském věku (1). Vznik aterosklerózy a jejích komplikací podmiňují rizikové faktory, z nichž některé jsou neovlivnitelné, včetně genetických predispozic (2), ale zásahem do ovlivnitelných faktorů lze ateroskleróze předejít nebo alespoň zmírnit progresi onemocnění (3). Primární prevence ICHS i aterosklerózy zahrnuje komplexní ovlivnění všech ovlivnitelných rizikových faktorů u dosud zdravých lidí. Sekundární prevence se provádí při již projevených komplikacích aterosklerotického poškození tepen a spočívá v důsledném ovlivňování rizikových faktorů a ve farmakologické léčbě (2).

Terapie se skládá v první řadě z nefarmakologických postupů, zahrnujících změnu životního stylu včetně stravování, fyzickou aktivitu, nekuřáctví a je možno doporučit pravidelnou konzumaci malého množství alkoholu. Pokud tyto postupy na zlepšení stavu nestačí, používá se farmakoterapie založená na ovlivnění rizikových faktorů – antihypertenziva, hypolipidemika, rostlinné steroly, vazodilatancia,

antiagregační léčba a v neposlední řadě u kuřáků pomáhá nikotinová substituce, případně vhodná antidepressiva (3).

2. MIKROSKOPICKÁ STAVBA CÉV, ARTÉRIÍ A ENDOTELU

2.1 Obecná stavba krevních cév

Tunica intima

Tato vrstva se skládá z jedné vrstvy plochých endotelových buněk, tvořících vnitřní povrch cévy, a subendotelové vrstvy řídkého vaziva (elastických a kolagenních vláken nebo elastických blanek, které se nazývají *membrana elastica interna* a oddělují intimu od medie) (4, 5).

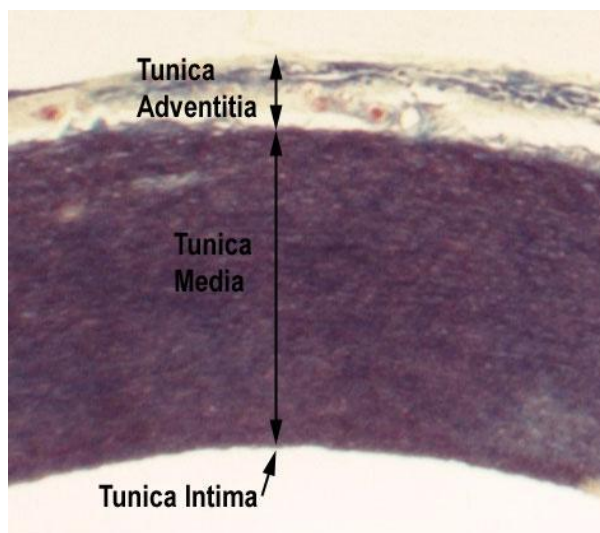
Tunica media

Je z cévních vrstev ta nejsilnější. Tvoří ji hladkosvalové buňky (probíhající cirkulárně nebo v nízkých spirálovitých závitěch) prostoupené různým množstvím elastických a kolagenních (typ III) vláken a proteoglykanů. Podle velikosti tepny převládá elastická, nebo svalová složka. Ve větších tepnách je tenčí *lamina elastica externa*, oddělující medii od adventicie (4, 5).

Tunica adventitia (externa)

Tuto vnější vrstvu tvoří fibrilární vazivo s kolagenními (typ I) a elastickými vlákny, která se na povrchu překřížují v síť, a povrchová vrstva adventicie přechází do vaziva orgánu, jímž céva prochází.

Obr. 1 – Arterie



2.2 Specifická stavba krevních cév

ARTERIE

Podle velikosti je dělíme na arterioly, střední a velké svalové artérie a velké elastické artérie. Stěna artérie je obecně silnější než stěna žíly (4).

Arterioly

Mají úzký průsvit a průměr pod 0,5 mm s lumen vystlaným endotelovými buňkami. Subendotelová vrstva je velice tenká a lamina elastica interna chybí. Medii tvoří 1 – 5 vrstev hladkosvalových buněk. Adventicie je tenká bez *lamina elastica externa*.

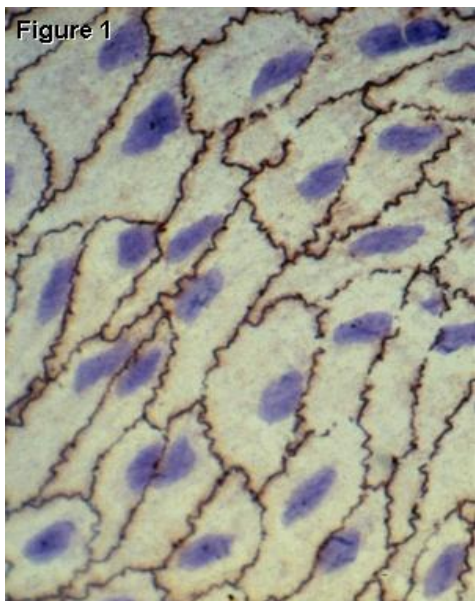
Artérie svalového typu

Subendotelová vrstva je silnější než u arteriol. *Lamina elastica interna* je vyvinutá, medie obsahuje až 40 vrstev hladkosvalových buněk. *Lamina elastica externa* je jen ve větších artériích. Adventicii tvoří kolagenní, elastická vlákna, ale také fibroblasty a tukové buňky.

Velké elastické artérie

Jedná se o aortu a její hlavní větve. Nažloutlé zbarvení je způsobeno velkým množstvím elastinu v medii. Intima je tlustší než ve svalových artériích a je vystlána endotelovými buňkami. Subendotelová vrstva není příliš vyvinutá. Její vazivová vlákna jsou podélně uspořádaná a jsou důležitá při endoteliální deformaci při kontrakcích a dilataci tepen. Medii tvoří perforované koncentrické elastické membrány, jejichž počet se s věkem zvyšuje. Již vytvořené struktury jsou metabolicky inertní. Jak se elastin dále ukládá, laminy postupně sílí. Adventicie je málo vyvinutá, bez *lamina elastica externa* a s obsahem kolagenních a elastických vláken (4).

2.3 Endotel



Endotelové buňky jsou velmi ploché s centrálním jádrem, tenké 1 – 2 μm , s průměrem okolo 10 – 20 μm . Mezibuněčné spoje jsou tvořeny oblastmi, které se vzájemně překrývají, čímž jsou spoje těsnější. Tyto spoje rozhodují o integritě cévy. V cytoplazmě se kromě několika obvyklých organel (v perinukleární zóně) vyskytují ještě malé pinocytické váčky přiléhající k buněčné membráně (díky nim probíhá výměna látek mezi krví a přilehlými tkáněmi) (6).

Obr. 2 - Endotel

3. ATEROSKLERÓZA

3.1 Úvod

Podle současných poznatků je považována nikoli za degenerativní, jak tomu bylo dlouhou dobu (3), ale za imunitně zánětlivé onemocnění vyvolané poškozením cévní intimy (7), s účastí buněk jako monocyty, lymfocyty, aktivované endotelie a buňky hladkého svalstva cév, které tvoří zánětlivé mediátory (3).

Ateroskleróza postihuje větší tepny, především koronární věnčité, renální, ilické, mozkové, aortu, krkavici a tepny dolních končetin. Na aortě dochází k nejčastějšímu poškození břišní části aorty (8).

Rozlišují se základní formy aterosklerózy:

- a) časné léze a tukové proužky
- b) fibrózní a ateromové pláty
- c) stádium komplikací (komplikované léze)

Pro vývoj komplikací je důležitá stabilita plátu, ruptura vede k nasedající trombóze a provalení ateromových hmot (9).

Klinické projevy aterosklerózy zahrnují všechny formy ICHS, dále ICHDK, cévní mozková příhoda aj. Již vzniklou aterosklerózu nelze léčit, můžeme pouze ovlivnit následky a ovlivňovat rizikové faktory, a tím zasáhnout do progresu nemoci (3).

Hlavními spouštěcími mechanismy zánětu v aterogenezi jsou oxidované lipoproteiny uložené v intimě indukující expresi adhezních molekul a mediátorů zánětu v makrofázích i buňkách cévní stěny. Oxidovatelné jsou i VLDL a IDL rovněž s aterogenními vlastnostmi. Nejspíš mohou samy aktivovat zánět v endotelu. HDL má naopak vlastnosti antioxidační a působí protizánětlivě. Zánět se může podílet i na rozvoji hypertenze (angiotenzin II zvyšuje hladiny IL-6 a VCAM-1). Jedním z nejvýznamnějších rizikových faktorů je diabetes mellitus, protože „díky“ hyperglykémii vznikají modifikované makromolekuly, jež zvyšují produkci cytokinů v endotelu. Predispozicí k inzulinové rezistenci, diabetu a diabetické dyslipidémii je obezita, ale tuková tkáň navíc produkuje cytokiny (TNF α , IL-6), a tím se podílí na aterogenezi už sama o sobě. Infekce je stimulem pro zánět, je tedy uvažováno o tom, že v rozvoji aterosklerózy hraje také nezanedbatelnou roli. Z provedených studií jsou

zmiňovány protilátky proti *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, herpes simplex virus a CMV jako předpověď vaskulárního rizika. Nejsou však zatím dostupné intervenční studie prokazující pozitivní vliv podávání antibiotik na rozvoj aterosklerózy a vzniku jejích komplikací (7).

3.2 Epidemiologie

Není snadné ani příliš možné prezentovat přesná čísla pacientů s aterosklerózou, protože k jejich odhalení dochází zpravidla až tehdy, když se začne ateroskleróza projevovat klinicky, tedy svými komplikacemi (ICHS, ICHDK, CMP aj.) (3).

3.3 Patogeneze

3.3.1 Endotelová dysfunkce

Endotel je jednovrstevná výstelka cév. Kromě role mechanické má i roli sekreční a metabolickou. Ovlivňuje hemostázu, vazokonstrikci a vazodilataci cév, permeabilitu. Produkuje řadu substancí, jako: NO, prostacyklin, adhezní molekuly, endoteliny (7, 9).

Endotelová dysfunkce stojí na počátku vznikající aterosklerózy, je při ní narušena funkce cévního endotelu, což zahrnuje vyšší vazokonstrikční a protrombotickou aktivitu, expresi adhezních molekul a zvýšenou permeabilitu. Vzniká působením rizikových faktorů (9).

Poškození endotelu způsobuje řada působících faktorů – mechanické (vířivý proud krve při hypertenzi), chemické, imunitní, degenerativní, imunologické, metabolické, infekční aj. (7).

3.3.2 Lipidy a jejich role v rozvoji aterosklerózy

Člověk potravou přijímá asi 20 – 30% tuků různé povahy. Lipidy jsou strukturální složkou buněčných a mezibuněčných membrán, u savců jsou nejdůležitější energetickou rezervou a mají termoregulační a mechanicky ochrannou funkci.

V poslední době je věnována velká pozornost plazmatickým lipidům, neboť byla prokázána souvislost mezi obsahem některých typů lipoproteinů a projevy aterogeneze a s tím spojeným kardiovaskulárním rizikem (10).

V plasmě jsou lipidy transportovány ve formě kulovitých molekulárních komplexů – lipoproteinů. Zevní vrstvu tvoří fosfolipidy a cholesterol, vnitřní vrstva je hydrofobní, tvořená TAG, estery cholesterolu a apolipoproteiny (11). Neesterifikované mastné kyseliny jsou transportovány ve vazbě s albuminy (10).

Chylomikrony jsou částice s velmi krátkým poločasem, tvořené sliznicí tenkého střeva, a transportují se do lymfy nebo portálního oběhu. Jejich hlavní složkou jsou TAG (10). V periférii je jejich apolipoproteinem aktivována endotelová lipoproteinová lipáza, která od TAG odštěpí VMK, které následně přijmou tukové a svalové buňky. Chylomikronové remnanty v játrech se vážou na receptory prostřednictvím ApoE a uvolňují TAG, cholesterol a cholesterolové estery (11).

Na **VLDL** působí stejné enzymy jako na chylomikrony: lipoproteinová lipáza (povrch endotelu kapilár) a lecitin-cholesterol-acyltransferáza. Ty změní VLDL z jater na IDL a LDL (10).

HDL aktivují svým apolipoproteinem (ApoAI) lecitin-cholesterol-acetyltransferázu (11) a vážou cholesterol z buněčných membrán a transportují ho z periférie do jater, odkud je vylučován žlučí (10).

TAG z potravy jsou štěpeny na VMK a 2-monoacylglyceroly. Také se syntetizují v játrech a odebírají potřebné VMK z plazmy, nebo je tvoří z glukózy. TAG z jater jsou následně použity jako součást LDL, které odcházejí do plazmy (11).

VMK jsou v krvi vázány na albuminy nebo jsou z větší části transportovány jako TAG v lipoproteinech. Ty, které jsou vázány na albumin, jsou transportovány hlavně do ledvin, srdeční a kosterní svaloviny, tukových buněk a jater.

Transport **cholesterolu** (esterů cholesterolu) je možný jen prostřednictvím lipoproteinů (nebo vazbou na bílkoviny). Nejvíce (42%) cholesterolu je v LDL. Cholesterol je strukturální složkou buněčných membrán a výchozí látka pro tvorbu žlučových kyselin a steroidů. Při nadbytku cholesterolu v buňce se utlumí jeho syntéza

a aktivuje se enzym acyl-CoA-cholesterol-acyl-transferáza (dochází k esterifikaci cholesterolu a jeho uložení) (11).

3.3.3 Buňky hladkého svalstva

Mají roli ve fibroproliferativní složce aterogeneze. Tyto buňky se vyskytují ve dvou fenotypech. Jeden je kontraktilní a reaguje na látky indukující vazodilataci nebo vazokonstrikci (NO, endotelin, PGE, PGI₂, angiotenzin II, katecholaminy, neuropeptidy, leukotrieny). Druhý fenotyp je syntetický. Buňky vytváří geny pro mnoho růst regulujících molekul a cytokinů. Takto mohou reagovat na růstové faktory a syntetizovat ECM (12).

Přestože většina hladkosvalových buněk se nachází v medii, významná část leží rovněž v intimě. Tyto části se nazývají „zahuštění intimy“ (*intimal thickening*), mohou být excentrické nebo difúzní. Části s excentrickým zahuštěním korelují s místy výskytu aterosklerotických lézí. Difúzní zahuštění prochází skrz cévu, nalezneme jej u starších pacientů a je považováno za normální proces stárnutí. Oba typy zahuštění jsou tvořeny hladkosvalovými buňkami a proteoglykany, které produkují.

Jednou z hlavních funkcí těchto buněk je produkce ECM, jak ve zdravé, tak v aterosklerózou postižené cévě. Ve zdravé tepně je ECM složena z fibrilárního kolagenu typu I a III, aterosklerotická léze obsahuje více proteoglykanů s roztroušenými vlákny kolagenu typu I a fibronektin. Tato změna neznamena jen změnu v architektuře cévy, ale i změny obsahu lipidů a indexu proliferace (13).

Buňky hladké svaloviny se při aterogenezi mění z fyziologického kontraktilního fenotypu na sekreční fenotyp a migrují dovnitř plátu (14). Mění se složení proteinů ECM secernovaných buňkami. Stejně jako makrofágy mohou exprimovat řadu receptorů pro vychytávání lipidů a mohou tak vytvářet pěnové buňky. Exprimují i adhezní molekuly jako VCAM-1 a ICAM-1, na které adherují monocyty a lymfocyty a migrují do stěny cévy. Díky adhezním molekulám jsou pěnové buňky odolné vůči apoptóze. Jako mnoho buněk v plátu produkují buňky hladké svaloviny PDGF, TGFβ, IFNγ a MCP-1 (13).

3.3.4 Patologie aterosklerotické léze a stabilita plátu

LDL částice cholesterolu pronikají do stěny tepen, kde dochází k jejich oxidaci a akumulaci – to vede k aktivaci endotelií. Dochází k adhezi monocytů z krve. Ty prostupují cévní stěnu, mění se v makrofágy a scavengerovými receptory pohlcují oxidované LDL částice, čímž vznikají pěnové buňky. Jejich nahromadění v cévní stěně dává první makroskopické projevy aterosklerózy – tukové proužky.

Další fáze se účastní hladkosvalové buňky cévní stěny. Dochází k jejich proliferaci a migraci do prostoru mezi endotel a medii. Hladkosvalové buňky tvoří kolagen, elastin, proteoglykany a zároveň i proteolytické enzymy, které nově se tvořící mezibuněčnou hmotu rozrušují a umožňují tak další migraci buněk. Tím, že se zvětšuje množství fibrózního vaziva, dochází ke vzniku tzv. fibrózních plátů. Ateromové pláty vznikají z tuku uvolněného z pěnových buněk do subendotelového prostoru. Pláty pak mají tedy tukové jádro a vazivovou čepičku různé tloušťky, která se podílí na stabilitě plátu.

Stabilní plát má silnou čepičku tvořenou malým počtem buněk a „pouze“ zužuje cévní průsvit. Kdežto nestabilní plát (= vulnerabilní) je kryt tenkou čepičkou, která je prostoupena i makrofágy a jeho nestabilita spočívá v riziku eroze nebo možnosti prasknutí (3, 8).

3.4 Receptory

Metabolismus lipidů a lipoproteinů ovlivňuje přítomnost a aktivita specifických proteinů (glykoproteinů). Zodpovídají za vazbu a internalizaci lipoproteinových částic do buňky na její membráně z receptorů (12).

LDL-receptor

Hlavní úloha je zabezpečit dostatek cholesterolu pro buňku. Nejvíce LDL-receptorů je v játrech, gonádách a nadledvinách.

Poruchy LDL-receptoru:

- poruchy syntézy receptoru
- porucha transportu receptoru z ER na povrch buňky

- porucha vazby LDL-částic na receptor
- porucha internalizace (12)

Acetyl-LDL(scavenger)-receptor

Scavengerové receptory se vyskytují na mikrofázích, buňkách hladké svaloviny a endotelu. Vážou se na ně modifikované LDL-částice, hrají tedy roli v aterogenezi. Jejich důležitost roste v případech, kdy chybí funkční LDL-receptory a většina LDL-částic se metabolizuje cestou scavengerových receptorů (např. při familiární hypercholesterolémii) (12).

Receptor chylomikronových remnant

Chylomikronové remnanty vážou jen částice obsahující ApoE (jsou proto funkční i v případě familiární hypercholesterolémie) (12).

3.5 Enzymy

LPL – Lipoproteinová lipáza

Uplatnění nachází v katabolismu částic bohatých na TAG (chylomikrony, VLDL), dochází ke štěpení TAG na glycerol a VMK. Najdeme ji v tukové tkáni, příčně pruhovaných svalech, myokardu, ledvinách a laktující mléčné žláze v luminu kapilár na povrchu endotelu. Kofaktorem LPL je Apo-CII, dále ji ovlivňují další faktory. Aktivitu snižuje zvýšená koncentrace volného cholesterolu a naopak zvýšení aktivity LPL působí insulin, tyroxin (částečně možná i prolaktin) a fyzická aktivita (12).

HL – Jaterní lipáza

Nacházíme ji v játrech. Má také roli při odbourávání částic bohatých na TAG, dále působí konverzi částic HDL-2 na HDL-3 (dochází i k hydrolýze fosfolipidů). Aktivita závisí zčásti na insulinu (a možná thyreoidálních hormonů) (12).

LCAT – Lecitin-cholesterol-acyltransferáza

K syntéze dochází v játrech, v plazmě je v komplexech s HDL lipoproteiny. LCAT odpovídá za přenos MK z lecitinu na cholesterol. Kofaktor pro esterifikaci je ApoAI a ApoCI.

HMG-CoA reduktáza

Jedná se o nejdůležitější enzym syntézy cholesterolu buňkou. Vyskytuje se v ER všech buněk produkujících cholesterol (tzn. prakticky všechny). Největší aktivita je v gonádách, nadledvinách, játrech a tenkém střevě. Je katalyzátorem přeměny hydroxymethyl-glutarylu CoA na mevalonát. Aktivitu snižuje zvýšená koncentrace nitro-buněčného cholesterolu. Spolu s aktivitou LDL-receptorů se podílí na regulaci koncentrace plazmatického cholesterolu (hlavně LDL) (12).

3.6 Klinické projevy a komplikace

V momentě, kdy se ateroskleróza projeví, jedná se již o její komplikace. Těmi jsou stenóza či uzávěr tepny, která vede k ischemii tkáně, přičemž rozsah a důsledky jsou závislé na odolnosti tkáně k nedostatečné zásobě kyslíkem. Také závisí na oblasti poškození.

Při ateroskleróze koronárních tepen vzniká ICHS, která se manifestuje jako akutní koronární syndrom (IM a nestabilní AP; plát nezužuje cévu vůbec, nebo málo, ale je nestabilní, a na prasklé čepičce vzniká trombus, který cévu uzavře), případně stabilní AP (při snížení průsvitu cévy plátem o více než 60%), městnavá srdeční slabost nebo poruchy srdečního rytmu.

Ateroskleróza v jiných oblastech řečiště může vést např. k CMP, ICHDK, stenóze renálních tepen, vakovitým a ciselujícím aneurysmatům aorty apod. (3).

3.7 Diagnostika

Diagnostika chronické ICHS se kromě anamnézy, klidového EKG a Holterova monitoringu provádí na základě zátěžového testu. Při podezření na akutní koronární

syndrom se hodnotí laboratorní ukazatele nekrózy myokardu – enzymy, troponiny a myoglobin. Konečné potvrzení doloží koronarografie či intravaskulární ultrazvuk.

Při postižení tepen mozku vznikají nejčastěji poruchy hybnosti, citění a řeči, nebo demence. Přívodné tepny se vyšetřují ultrazvukem. Přesné informace o stavu karotického a vertebrálního řečiště přinese arteriografie a ložisko odhalí CT nebo MR.

ICHDK se projevuje bolestivostí při chůzi; jak plát roste, zkracuje se tzv. klaudikační vzdálenost. Nakonec se mohou objevit bolesti klidové a úplným uzavřením přívodu krve vzniká ischemická nekróza postižené části končetiny. Diagnóza ICHDK se stanovuje na základě anamnézy, vyšetřením pulsací a poslechem přístupných tepen či ultrazvukem nebo arteriografií.

Stenóza renálních tepen je jednou z příčin sekundární hypertenze. Využívá se vyšetření ultrazvukem, angiografie CT nebo MR, i angiografie s katetrizací.

Aortální aneurysma vzniká nejčastěji v oblasti břišní aorty. Hlavní riziko spočívá v možnosti ruptury plátu, které může skončit smrtí. Aneurysma nezpůsobuje subjektivní potíže, zjistí se většinou náhodně, k hodnocení se využívá arteriografie pomocí CT či MR (3).

3.8 Rizikové faktory vzniku aterosklerózy

Rizikové faktory neovlivnitelné

Patří sem věk, pohlaví a dědičnost. Rizikovým faktorem je stáří nad 55 let u mužů, nad 45 let u žen, a výskyt úmrtí z kardiovaskulárních příčin u příbuzných žen první linie před 55. rokem a u mužů před 45. rokem života (7).

Rizikové faktory ovlivnitelné

Jedná se o nedostatek pohybu, kouření, hypertenzi, dyslipidemie a diabetes mellitus.

KOUŘENÍ

Aktivní kouření cigaret s sebou nese riziko prostřednictvím účinku na sympatický nervový systém, zvyšováním spotřeby kyslíku myokardem, zvýšením tonu cévní stěny, působením oxidačního stresu (včetně LDL-částic), zvyšováním hladiny

fibrinogenu a naopak snižováním hladiny HDL-cholesterolu. V neposlední řadě vede k endoteliální dysfunkci a ke vzniku koronární trombózy.

Rizikové je i pasivní kouření. Ve studii ARIC (The Atherosclerosis Risk in Communities Study), které se zúčastnilo 10 914 lidí, se prostřednictvím ultrazvuku sledovala tloušťka intimy a medie karotid. Kouření zvyšovalo riziko hlavně ve spojení s výskytem diabetu a hypertenze. Progrese aterosklerózy souvisela s počtem vykouřených cigaret/let, ne s rozdělením na kuřáky a nekuřáky. Z toho vychází domněnka, že některé nežádoucí účinky kouření mohou být charakteru kumulativního a ireverzibilního (12).

HYPERTENZE

Arteriální hypertenze s hodnotami vyššími než 140/90 mm Hg je jedním z nejdůležitějších rizikových faktorů KVO (7).

Zvýšením hladiny angiotenzinu II dochází k remodelaci cévní stěny, hypertrofii levé srdeční komory. Dochází opět k endoteliální dysfunkci, zvyšuje se permeabilita cévy pro lipoproteinové částice, k větší tvorbě endotelinu a zesílené adhezenci leukocytů.

Japonské epidemiologické studie 60. a 70. let dokládají, že samotný, i když výrazný výskyt hypertenze, není-li provázen zvýšeným výskytem dyslipidemií, nemá za následek zvýšené riziko ICHS v populaci (12).

DIABETES MELLITUS

Při vysoké glykémii dochází ke vzniku glykovaných LDL-částic a následně dochází k jejich snadnější oxidaci. Glyoxidované LDL-částice umožňují patrně jednodušší přeměnu makrofágu na pěnovou buňku. K diabetu mellitu se často přidružují další onemocnění, charakterizující metabolický syndrom, jako například hypertenze, hypertriglyceridémie a hypercholesterolemie.

U pacientů s DM dochází navíc k častějším poruchám koagulace, fibrinolýzy, funkce trombocytů a dochází ke zvýšené agregabilitě a tvorbě tromboxanu.

OBEZITA

O obezitě se hovoří při hodnotách BMI>25. Důležitým faktorem je distribuce tuku, abdominální je z hlediska rozvoje KVO nebezpečnější.

Do jisté míry s obezitou související nízká pohybová aktivita je sama o sobě také rizikovým faktorem (7).

Novější rizikové faktory

Někteří lidé jsou z hlediska klasických rizikových faktorů zdánlivě mimo riziko, a přesto se u nich ateroskleróza vyvine. To je důvodem zkoumání dalších hodnot a faktorů, které mohou mít s výskytem KVO spojitost. Celkové riziko se pak nesčítá, ale násobí. Provádí se tedy proto odhad celkového rizika (global risk assessment), na jehož základě se vytváří algoritmy pro stanovení prevence a terapie. V současné době se věnuje pozornost hlavně faktorům zánětu (15).

HLADINA CRP

CRP jako marker zánětlivé složky aterosklerózy je významný rizikový faktor a ukazatel rizika u pacientů s ICHS i u osob dosud nesymptomatických. Podle studií dává nejlepší předpověď rizika aterosklerózy poměr celkového cholesterolu k HDL a CRP (15).

LEPTIN

Jedná se o hormon typu polypeptidu produkovaný převážně adipocyty a působící po vazbě na leptinové receptory. Plazmatické hladiny leptinu korelují s obsahem tělesného tuku, u štíhlých 1 – 20 ng/ml, u obézních až 100 ng/ml. Hlavní funkcí je regulace energetické homeostázy, ovlivňuje ale i angiogenezi, reprodukci a imunitní pochody. Expresi a sekreci leptinu v adipocytech indukuje IL-6 a TNF α .

Leptin stimuluje transport glukózy, glykogensyntázu a proteosyntézu u buněk citlivých na insulin a aktivuje proteinkinázu A. Má také pleiotropní účinky ovlivňující kardiovaskulární systém. Indukuje oxidační stres v endoteliích, potencuje proliferaci, zvyšuje tvorbu MCP-1, endotelinu 1, podporuje agregaci trombocytů a kalcifikaci cév. Centrální stimulací sympatiku zvyšuje krevní tlak a stimuluje syntézu NO v endotelu. Při současné hyperglykémii zvyšuje akumulaci cholesterolu v mikrofázích.

Ve studiích se ještě předpokládá významu leptinu jako rizikového faktoru pro KVO musí ověřit (15).

REAVENŮV SYNDROM (metabolický syndrom)

Je charakterizován hyperinzulinémií, inzulinovou rezistencí a spadá pod něj obezita centrálního typu, hypertenze, hypertriacylglyceridémie a typ II diabetu mellitu, případně porušená glukozová tolerance. U pacientů dochází navíc k snížení HDL-částic a zvýšení hladiny fibrinogenu a častějšímu výskytu ICHS.

Pro stanovení rizika vzniku aterosklerózy a KVO je důležitá distribuce tělesného tuku. Obezita centrálního typu je již sama o sobě rizikově významnější, než pouhé zvýšení celkové hmotnosti (12).

NEDOSTATEK ANTIOXIDANTŮ

Nedostatek zejména vitamínu E, snad i C a dalších antioxidačně působících látek jako selen, flavonoidy, polyfenoly a fytosteroly vede k silnější oxidaci LDL (12).

NEDOSTATEK ESTROGENŮ

Estrogeny působí snižování hladiny LDL a zvyšování hladiny HDL inhibicí jaterní lipázy a zvyšováním syntézy ApoA v játrech. V menopauze dochází ke snížení hladiny estrogenů a tím způsobeným změnám složení lipidového spektra.

Kromě toho estrogeny zvyšují tvorbu vazodilatačně a protideštičkově působícího PGI-2 endotelem. Příznivě ovlivňují inzulinovou rezistenci (12).

KOAGULAČNÍ RIZIKOVÉ FAKTORY

Mezi výskytem ICHS a CMP a hladinou fibrinogenu a fibrinolytickou aktivitou krve existuje spojitost. KV riziko souvisí s aktivitou tkáňového aktivátoru plazminogenu – zvýšenou hladinou PAI-1 doprovází zvýšené riziko KVO a naopak zvýšením aktivity tkáňového aktivátoru plazminogenu dojde ke snížení tohoto rizika.

U pacientů s DM je vztah mezi polymorfismem fibrinového genu, množstvím fibrinogenu a rizikem ICHS (12).

4. ADHEZNÍ MOLEKULY

4.1 Obecné vlastnosti

Většina dějů imunitního systému je podmíněna interakcemi mezi páry adhezních molekul, které jsou exprimovány každá jinou buňkou (interakce mezi receptorem a ligandem). Přenos signálu adhezní molekulou do buňky potom nastane po proběhnutí interakce.

Některé adhezní molekuly jsou exprimovány konstitučně, některé až po aktivaci. Aktivaci může způsobit vazba cytokinu nebo dochází k signalizaci přes jiný povrchový receptor. Adhezní molekuly mohou existovat v různě afinních formách v závislosti na stavu aktivace buněk. Expres adhezních molekul neprobíhá pouze v rámci imunitního systému, adheze je projevem i jiných fyziologických (neimunních), a v nemalé řadě i patofyziologických procesů, jakými jsou např. i kancerogeneze a metastazování.

Adhezní molekuly umožňují komunikaci mezi buňkami, která je založena na jejich přímém kontaktu. To je odlišuje od cytokinů a hormonů, kde probíhá komunikace bez nutnosti bezprostředního kontaktu. Řada adhezních molekul může existovat alternativně v rozpustných formách, které ovlivňují cílové buňky na určitou vzdálenost, stejně jako jsou naopak známé membránové formy některých cytokinů (16).

Adhezní molekuly se dělí do dvou skupin:

- a) integriny
- b) adhezní molekuly imunoglobulinové skupiny (17)

4.2 Skupina imunoglobulinů

Do této skupiny patří široká škála molekul s rozličnými Ig-podobnými doménami. Některé hrají důležitou roli v cévních onemocněních. Jsou to ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1, MadCAM-1.

ICAM-1 je exprimována na mnoha typech buněk, regulace exprese probíhá na buňkách endotelu (18,19), přičemž se projevuje různorodost mezi cévními řečišti (20, 21). Orgány s relativně vysokou bazální expresí ICAM-1 (např. plíce) vykazují menší

zvýšení exprese ICAM-1 po stimulaci cytokiny, než orgány s nízkou bazální konstitutivní expresí ICAM-1 (např. srdce) (20, 21).

Rozpustnou isoformu ICAM-1 lze nalézt v normálním séru, přičemž hodnoty výrazně vzrůstají při probíhajících různých onemocněních (22, 23).

ICAM-2 je zkrácená forma ICAM-1, která je exprimována na buňkách endotelu (24), ale při jejich aktivaci exprese nevzrůstá (25).

VCAM-1, která na nestimulovaných endoteliálních buňkách vykazuje nízkou až zanedbatelnou expresi, může být silně up-regulován cytokiny. Zprostředkovává adhezi lymfocytů a monocytů v zánětem postiženém krevním řečišti.

PECAM-1 je konstitučně exprimována na destičkách, většině leukocytů a na endotelových buňkách (26). Může zprostředkovat adhezi prostřednictvím homofilních nebo heterofilních interakcí (27). Protože stimulace cytokiny neovlivní expresi PECAM-1, používá se hodnota jeho hustoty jako index cévní plochy (21).

MadCAM-1 je exprimována hlavně na vysokých žilkách Peyerových plátů, na žilkách *lamina propria* tenkého střeva, na okrajovém sinu sleziny a na vysokých endoteliálních žilkách embryonálních lymfatických uzlíků (28).

4.3 Regulace endoteliální CAM exprese

Koordinovaný odsun leukocytů do míst zánětu je z velké části řízen časovým průběhem a rozsahem endoteliální exprese CAM. Velký odsun leukocytů může být důsledek aktivace L-selektinu na leukocytech a rapidní mobilizací P-selektinu na povrchu endoteliálních buněk. Adherence leukocytů se vyskytuje také brzy po expresi β 2-integrinu nebo po aktivaci pohyblivých leukocytů, což umožňuje buňkám endotelu exprimovat ICAM-1. Vysoká hustota endoteliálních CAM, která je potřebná k udržení velkého množství leukocytů, které infiltrují zánětlivou tkáň, je také důležitá pro syntézu proteinů *de-novo*.

Různé bakteriální toxiny, cytokiny a oxidanty hrají roli v indukci transkripčně závislé syntézy endotelových CAM. Maximální exprese CAM je pozorována mezi třemi až šesti hodinami po počáteční expozici zánětlivého stimulu (16).

Regulace endoteliální exprese CAM se účastní dva transkripční faktory: NF- κ B a AP-1 (29, 30). Vazebná místa pro NF- κ B jsou v oblasti promotoru genu pro E-

selektin, VCAM-1 a ICAM-1, vazebná místa pro AP-1 jsou v oblasti promotoru genu pro ICAM-1 a E-selektinu (31). Inhibitory aktivace a jaderné translokace NF- κ B a AP-1 oslabují cytokiny, lipopolysacharidy (30).

4.4 CAM a ateroskleróza

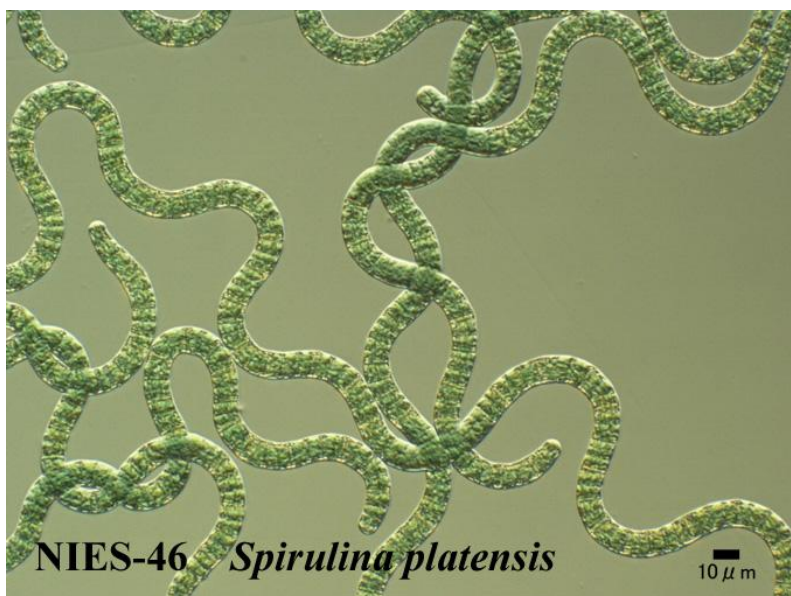
Dostupné důkazy naznačují, že CAM jsou důležitými mediátory komplexních buněčných interakcí, které se podílejí na procesu aterogeneze. Např. na lumenálnímu povrchu aterosklerotických lézí byla zjištěna vyšší imunoreaktivita ICAM-1 v místech tukových proužků, kde převažují T-lymfocyty a monocyty (32, 33).

Exprese VCAM-1 a ICAM-1 v neovaskularizovaných a neendotelových buňkách je spojena s nárůstem akumulace leukocytů v intimě, což naznačuje, že adhezními molekulami zprostředkovaný pohyb leukocytů nebo aktivace neovaskularizace intimy může hrát kritickou roli v patogenezi lidské aterosklerózy (34).

Úbytek CAM (ICAM-1) z povrchu aktivovaného endotelu a makrofágů vede k měřitelným plasmatickým hladinám rozpustných CAM u pacientů s aterosklerózou a může sloužit jako užitečný marker endoteliální aktivace, která je s aterogenezí spojena (35).

Nyní je vynakládáno úsilí směrem k vývoji terapeutických strategií zaměřených na předcházení časných lézí prostřednictvím zásahu do funkce CAM (36).

5. SPIRULINA PLATENSIS



Obr. 3 – Spirulina platensis

Spirulina (*Arthrospira*) je volně plovoucí filamentózní mikrořasa patřící do třídy *Cyanobacteriaceae*. Má fotosyntetickou aktivitu (38, 39) a vysokou nutriční hodnotu s neobvykle vysokým obsahem proteinů (60 – 70% v suchém stavu), je bohatá na vitaminy, minerály, esenciální mastné kyseliny a jiné látky. Vyskytuje se v alkalických vodních zdrojích subtropických a tropických oblastí Ameriky, Mexika, Asie a Centrální Afriky (40, 41).

V současné době je široce užívána jako potravní doplněk a je věnována velká pozornost studiím její terapeutické prospěšnosti v řadě onemocnění, zahrnující hypercholesterolemie, hyperglykémie, kardiovaskulární onemocnění, zánětlivá onemocnění, rakovinu a virové infekce (37).

5.1 Hypolipidemické efekty

Preklinické studie:

Proběhly studie na krysách a myších, kdy doplňky obsahující 16% Spiruliny při jinak vysoce tučné a cholesterolové dietě vedly k výraznému poklesu celkového cholesterolu, LDL, VLDL a fosfolipidů, a k nárůstu hodnot HDL (42).

Klinické studie:

První studie proběhla v r. 1988 na 30 zdravých mužských subjektech, rozdělených do 2 skupin, kdy 1. skupina dostávala po 8 týdnů 4,2g Spiruliny denně a 2. skupina dostávala Spirulinu 4 týdny a další 4 týdny následovala normální strava. Spirulina již během 4 týdnů výrazně snížila celkový cholesterol, a tento pokles byl výraznější u mírně hypercholesterolemických mužů než u normocholesterolemických. Přerušeni Spiruliny po 4 týdnech vedlo k návratu k původním hodnotám cholesterolu. Nedošlo k žádným změnám v hladinách TAG nebo v tělesné hmotnosti (43).

Hypolipidemický efekt Spiruliny byl prokázán ve studii u pacientů s ICHS a hypercholesterolémií (44), u pacientů postižených DM II typu (45) a pacientů s nefrotickým syndromem a hyperlipidémií (46).

5.2 Antioxidační a protizánětlivé efekty

Preklinické studie in vitro:

Ve studii, kde byl použita krysí aorta a ethanolický extrakt Spiruliny, byla pozorována snížená kontraktilní odpověď aorty při podání fenylefrinu (v závislosti na dávce), a zároveň silnější relaxační odpověď na podání karbacholu, což bylo v souladu s představou, že Spirulina snižuje syntézu a/nebo uvolnění NO endotelem a COX-dependentního vasokonstrikčního prostanoиду hladkosvalovými buňkami (47).

V jiné studii, myši krmené Spirulinou a léčené doxorubicinem (250mg/kg/den) vykazovaly výrazně nižší mortalitu, ascites a peroxidaci lipidů; Spirulina normalizovala hladiny antioxidačních enzymů a minimalizovala mikroskopické poškození srdce (48).

Klinické studie:

Ve studii s 26-letými ženskými subjekty, kterým byla podávána Spirulina v dávce 7,5mg/den po 8 týdnů, bylo dosaženo poklesu sérového IL-6 a snížené produkci IL-6 lymfocyty v periferní krvi (49).

Na základě předpokladu antioxidačního účinku Spiruliny před svalovou únavou a poškození po fyzické námaze se šestnácti dobrovolníkům podávala dieta obsahující 5% Spiruliny po 3 týdny. Byl pozorován výrazný pokles plazmatického oxidačního markeru MDA a vzrůst aktivity superoxidové dismutasy (50).

V jiné studii prokázalo podávání Spiruliny ve srovnání s placebem výrazné zlepšení symptomů alergické rýmy (51).

5.3 Mechanismus účinku

5.3.1 Hypolipidemický efekt

Mechanismus účinku je neznámý, je však možné, že se jedná o sníženou střevní absorpci cholesterolu a žlučových kyselin, za níž je zodpovědný ve vodě rozpustný protein phycocyanin, který Spirulina obsahuje. V jedné studii krysy krmené koncentrátem *S. platensis* vykazovaly zvýšené vylučování cholesterolu a žlučových kyselin stolicí (snížená rozpustnost cholesterolu a vazba žlučových kyselin na Spirulinu) (52).

5.3.2 Antioxidační a protizánětlivý efekt

Phycocyanin má schopnost vychytávat volné radikály, snižuje produkci dusitanů, potlačuje expresi iNOS, inhibuje jaterní peroxidaci mikrosomálních lipidů, inhibuje prozánětlivé cytokiny, snižuje expresi COX-2 a produkci PGE-2. Účinek se prokazoval s použitím rekombinantního phycocyaninu (53).

Obsažený β -karoten chrání proti kyslíkem navozené peroxidaci lipidů (54). Inhibuje produkci NO a PGE-2 a potlačuje expresi iNOS, COX-2, TNF- α a IL-1 β (55).

5.4 Bezpečnostní profil

Ve studiích na zvířatech nebyly zjištěny změny váhy plodu nebo matky, žádné teratogenní účinky; ani dávky mnohem vyšší, než jaké jsou lidmi používány, nevyvolaly embryotoxicitu. Spirulina nemá žádný vliv na fertilitu, gestaci a mláďata. Nebyly pozorovány abnormality v laboratorních hodnotách, chování, zdraví a příjmu potravy a vody (56-58).

Ve Spirulině rostoucí v otevřených vodních zdrojích byly nalezeny nízké hodnoty rtuti a jiných těžkých kovů. Konzumace může vést k ukládání depozit v organismu. Nicméně, komerční produkty z kontrolovaných vodních zdrojů obsahují mnohem nižší hodnoty těžkých kovů, než jsou limity při dodržování doporučených denních dávek (59).

Kvůli možnosti poškození obsaženými cyanotoxiny jsou doporučeny kontroly (60).

Byl popsán jeden případ hepatotoxicity v možném spojení s užíváním Spiruliny, nicméně pacient užíval ještě další 3 léky (61), a jeden případ rhabdomyolýzy (62).

6. MYŠÍ MODELY ATEROSKLERÓZY

Myši jsou přirozeně velice odolné vůči ateroskleróze. Jedinou výjimkou je kmen C57BL/6, u kterého byla ateroskleróza indukována dietou vyvinutou ve Wisslerově laboratoři. Dieta obsahovala 30% tuku, 5% cholesterolu a 2% cholové kyseliny. Tato dieta však byla pro myši vysoce toxická a vedla ke ztrátě hmotnosti a smrtelným respiračním infekcím. Paigen a kol. modifikovali tuto dietu na třetinové podíly, potom se tedy sestávala z 10% tuku, 1, 25% cholesterolu a 0,5% cholové kyseliny (63). Paigen a kolegové také vyvinuli testy pro obecnou kvantifikaci aterosklerózy na myším modelu. Nejstandardnější postup je měření průřezu oblasti kmene aorty postižené lézemi (64).

Ačkoli se našlo mnoho využití tohoto myšího modelu, bylo zde i několik nevýhod. Léze byly velmi malé (u myši starých 4 – 5 měsíců), v rozmezí 20 – 1000 μm^2 , většinou byly omezeny pouze na vzestup aorty a nepřeměňovaly se na pěnové buňky ani na lipidové proužky. Vzhledem k vysokému podílu cholesterolu a přítomnosti cholové kyseliny, nebyla tato dieta fyziologická. Kromě toho, Lusic a kol. poukázali na to, že tato dieta byla už sama o sobě prozánětlivá (65).

Dlouhou dobu nebyly myši jako model pro výzkum aterosklerózy vůbec používány, protože panovala domněnka, že by nebyly schopny přežít vysokolipidovou aterogenní dietu, léze by byly nereprodukovatelné nebo že by se většině myši léze ani nevytvořily, a že myši léze jsou patologicky neshodné s lidskými. Avšak použití diety s nižším obsahem tuků vyřešilo problém přežití; použití inbredních kmenů namísto náhodného množení vyřešilo problém reprodukovatelnosti; použití citlivých kmenů vedlo k tomu, že se léze projeví u většiny myši; a dlouhodobé pozorování odhalilo, že dochází k přeměně i na léze s fibrozní čepičkou (66).

Myš se průměrně dožije stáří 2 let, ve srovnání se 75 lety u člověka. Dospělá myš váží asi 30 g a její lipidové spektrum je od člověka odlišné. Člověk má vázáno 75% cholesterolu z plazmy na LDL, kdežto myš ho má v podobě HDL, který je u lidí protektivní složkou lipidového spektra proti ateroskleróze. Takže u myši krmené její přirozenou nízkotučnou stravou se ateroskleróza nikdy neprojeví (66).

Výhodou u zvířecích modelů je, že můžeme mít kontrolu nad stravou a prostředím v kterém žijí, což je u člověka v dlouhodobých studiích nemožné. Taktéž s myši můžeme provádět genetické změny, například vložit exogenní transgeny a tím vypnout nebo nahradit endogenní geny (66).

6.1 Apolipoprotein E

Jedná se o glykoprotein o molekulové hmotnosti okolo 34 kD, který je syntetizován játry (47), mozkiem a dalšími tkáněmi těla člověka i myši. Je to strukturální složka všech lipoproteinových částic, kromě LDL. Jedna z nejdůležitějších funkcí ApoE je, že slouží jako vysokoafinitní ligand pro ApoB a ApoE(LDL) receptor a pro receptor chylomikronových remnant, čímž umožňuje specifické vychytávání částic obsahujících ApoE z krve játry (15, 66).

6.2 ApoE deficientní myší modely

Roku 1992 byl vyvinut myší model s inaktivovaným genem pro apolipoprotein E (ApoE) (68). Došlo k tomu homologní rekombinací u myších embryonálních kmenových buněk použitím dvou plazmidů obsahujících neomycin-rezistentní gen, kterým se nahradila část apoE genu a tím byla narušena jeho struktura.

Navzdory fyziologickým odlišnostem mezi lipidovými spektry člověka a myši, ApoE deficientní myši se fenotypově nesmírně podobají fenotypu ApoE deficientního člověka. Taktéž pochody podílející se na vývoji aterosklerotických lézí jsou nápadně podobné těm u jiných, dobře zavedených zvířecích modelů, i těm, které probíhají v lidském těle (69).

U myši starých 5 – 6 týdnů se elektronovým mikroskopem dá pozorovat adheze monocytů na endotel na povrchu aorty i transendotelová migrace monocytů. Mezi 6 – 10 týdny se u většiny těchto myších modelů vyvinou léze typu tukových proužků, sestávající se primárně z pěnových buněk s migrujícími hladkosvalovými buňkami. Tyto léze rapidně progredují v rozvinuté heterogenní léze, složené z nekrotického jádra, obklopeného proliferujícími buňkami hladké svaloviny a různého množství extracelulární matrix (s obsahem elastinu a kolagenu). Tyto léze již mají vyvinutou fibrózní čepičku obklopenou pěnovými buňkami. Pro zánětlivé léze není výjimkou eroze do střední stěny aorty a vyústění v aneurysma aorty. Velké množství lézí pozorovaných u starších myši se rozvinulo v kalcifikovaná ložiska (70).

Proces spontánního rozvoje hyperlipidémie a aterosklerózy u ApoE deficientních myších modelů je urychlen dietou obsahující 21% tuku, 0,15%

cholesterolu a žádnou kyselinu cholovou. Vyvinul ji Hayek a kol. a je mnohem více fyziologická, než Paigenova, a podobná stravě člověka (71).

6.3 Apo-E/LDLr-DKO myši

V poslední době byly vyvinuty dvojitě deficientní myši – ApoE/LDLr-DKO (73), jakožto nový model, u něhož se rozvíjí četná hyperlipidémie a ateroskleróza (74). Uvádí se, že rozvoj aterosklerózy je mnohem silnější u dvojitě deficientní myši, dokonce i při normální neaterogenní dietě, než u samotné ApoE deficientní (75). Tudíž, ApoE/LDLr-DKO je vhodný model pro studium anti-aterosklerotického vlivu různých látek bez toho, abychom museli myš krmit aterogenní stravou (76).

7. CÍL PRÁCE – ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této práce bylo zjistit a popsat vliv podávání *Spirulina platensis* na endoteliální expresi ICAM-1 v aortě ApoE-deficientních myší za použití imunohistochemických a stereologických metod.

8. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

8.1 Zvířata a předepsaná dieta

Jako experimentální zvířata byli použiti ApoE-deficientní myši samci kmene C57BL/6J o hmotnosti 15 – 20g (Jackson Laboratories, USA). Ve stáří 3 měsíců jsme myši rozdělili náhodně do dvou skupin.

Obě skupiny zvířat byly 8 týdnů krmeny aterogenní dietou obsahující 1% cholesterolu. Kontrolní skupina dostávala pouze tuto stravu. Ve skupině *Spirulina platensis* byla k aterogenní dietě přidávána *Spirulina platensis* v denní dávce 40 mg. Myši v této skupině byly chovány odděleně v samostatných klecích. Ve formě speciálních granulí se myším podávalo každý den 6 g potravy a voda jim byla přístupná během celého experimentu volně. V průběhu studie se neprojevila změna hmotnosti, která by souvisela se spotřebou krmiva.

V závěru studie byla na myších v lačném stavu vykonána euthanasie párami etheru. Vzorky krve ze srdce zvířat byly použity pro biochemickou analýzu a odebrané části tkáně (aorta a horní polovina srdce) byly vloženy do OCT media (Leica, Praha, Česká republika) a poté zmrazeny tekutým dusíkem a uloženy při teplotě – 80 °C.

8.2 Biochemická analýza

Ve Fakultní nemocnici Hradec Králové na Klinice gerontologické a metabolické byla z myší krve uskutečněna biochemická analýza. Hodnocení celkové koncentrace cholesterolu bylo provedeno enzymaticky standardními diagnostickými metodami (Lachema, Brno, Česká republika) a spektrofotometricky (vlnová délka pro proměrování cholesterolu: 510 nm, pro TAG: 540 nm), (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB biotechnologie, Uppsala, Švédsko).

8.3 Imunohistochemie

Pro imunohistochemickou analýzu se použil materiál velikosti 1cm aortálního sinu a část aortálního oblouku. Z materiálu byly na zmrazovacím mikrotomu nařezány skupiny příčných řezů o síle 7 μm . Řezy se umístily na sklíčka, předem upravená v želatinovém roztoku a 60 min oschnutá.

Pro detekci endoteliální exprese ICAM-1 ve vzorcích se použila metodika avidin-biotinového komplexu (ABC) a vizualizace za pomoci diaminobenzidinu (DAB). Ten umožňuje ve tkáni v místě detekce ICAM-1 hnědou barevnou reakci.

K detekci byly použity tyto protilátky:

Primární protilátka:

rat anti-mouse ICAM-1 (Pharmlingen)

Sekundární protilátka:

horse anti-goat IgG (Vector Laboratories)

8.3.1 Pracovní postup – ABC metodika

Nejprve bylo potřeba řezy fixovat v acetonu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 20 min a potom 15 min sušit, aby došlo i k pevnější adhezii řezů na sklíčka. Poté se sklíčka ponořila dvakrát po sobě na 5 min do pufru z hydrogenfosforečnanových solí (PBS) na promytí. Na to se na sklíčka pipetou nanese 10% roztok goat séra v PBS (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo) na dobu 30 min. Tím došlo k blokaci nespecifických vazebných míst, než dojde k nanesení primární protilátky. Následně se na 15 min na sklíčka nanese roztok anti-avidinu D, potom se promývala 5 min v PBS a na dalších 15 min se nanese roztok anti-biotinu. Takto jsme zabránili nežádoucí reaktivitě těchto látek ve tkáni.

Sklíčka se opět opláchla v PBS a mohlo dojít k vlastní 60 min inkubaci s primární protilátkou rat anti-mouse ICAM-1 (Pharmlingen). Po dvojitým pětiminutovém omytí v PBS se aplikovalo 10% roztoku goat séra v PBS na 15 min. Poté se řezy 30 min inkubovaly se sekundární protilátkou horse anti-goat IgG (Vector Laboratories). Následně se sklíčka opět promyla v PBS dvakrát 5 min a vložily do 3% roztoku H_2O_2 na dobu 15 min. Po promytí v PBS (2x5min) se pro silnější vizualizaci

nanesl avidin-biotinový komplex (ABC) s peroxidázovým substrátem (Vector Laboratories). Provedl se pětiminutový oplach v PBS a použil se DAB substrát-chromogen roztok (DAKO, Carpinteria, USA). Řezy se po inkubaci omyly v destilované vodě. Odvodnění bylo provedeno omytím v acetonu a vložením na 3 min do roztoku aceton-xylenu (10:1) a na 3 min do roztoku aceton-xylenu (1:10). K montování sklíček se použil Eukitt. Snímky byly pořízeny mikroskopem Olympus AX 70 a digitální kamerou Pixelink PL-A642 (Vitana Corp., Kanada) byla provedena fotodokumentace a digitalizace. Použil se při tom software NIS (Laboratory Imaging, Česká republika). Software použitý při stereologickém hodnocení byl PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

8.3.2 Kvantitativní analýza imunohistochemie – stereologická analýza

Kvantifikace plochy velikosti endoteliální exprese ICAM-1 byla provedena prostřednictvím stereologických metod. Po nakrájení série o 100 řezech síly 7 μm se z referenčního objemu řezy systematicky náhodně vybraly. Pro každé barvení se první řez vybral náhodně, potom byl vybrán každý dvanáctý řez. Tím pádem osm barvených řezů se použilo ke stereologickému hodnocení. Použila se metody bodové testovací mřížky, ta se volila tak, aby bylo napočítáno přes 100 průsečíků mezi body sítě a ICAM-1 barvením na endotelu na jednu z cév. Odhadovaná barvená plocha se vypočítala dle vzorce:

$$estA = a * P,$$

kde a je plocha odpovídající 1 testovacímu bodu, P znamená 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 osm myší v každé skupině. Statistická významnost rozdílů ve skupinách se hodnotila t-testem za použití softwaru GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., Kalifornie). *P* hodnoty 0,05 nebo menší byly považovány za statisticky významné.

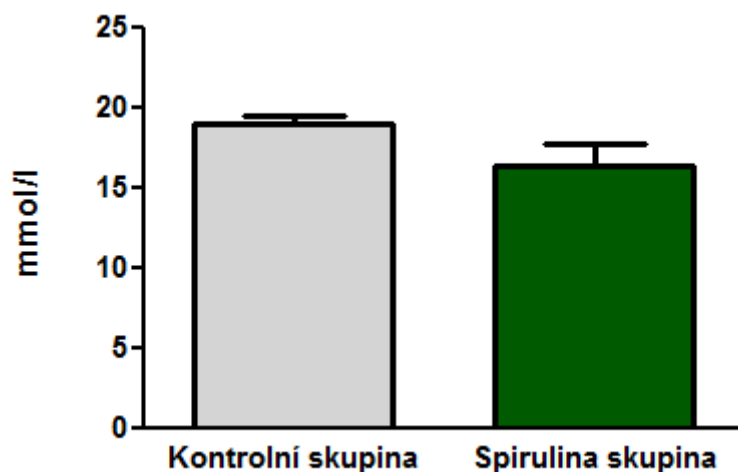
9. VÝSLEDKY

9.1 Biochemická analýza

Biochemická analýza neodhalila žádný efekt podávání *Spiruliny platensis* na hladiny celkového cholesterolu (18.99 ± 0.5 mmol/l vs 16.56 ± 1.3 mmol/l), (viz Graf 1).

Graf 1: Hladiny celkového cholesterolu u obou skupin myší.

Osmítýdenní podávání Spiruliny platensis neovlivnilo statisticky významně hladiny celkové koncentrace cholesterolu, v porovnání s kontrolní skupinou myší ($p = 0,0983$).



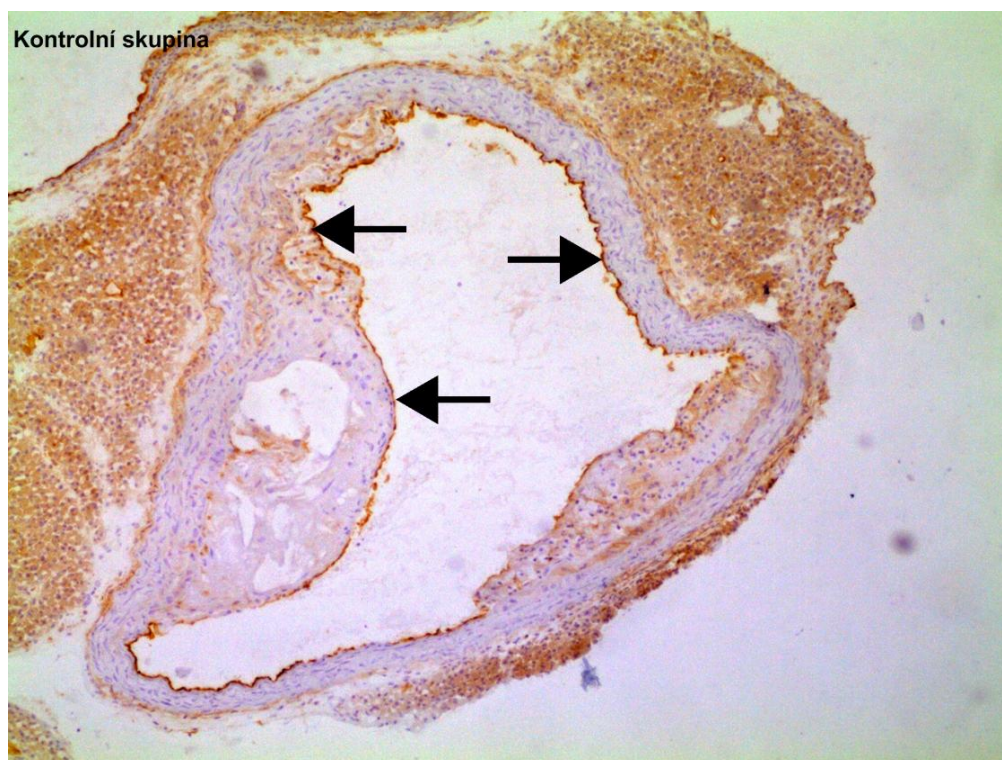
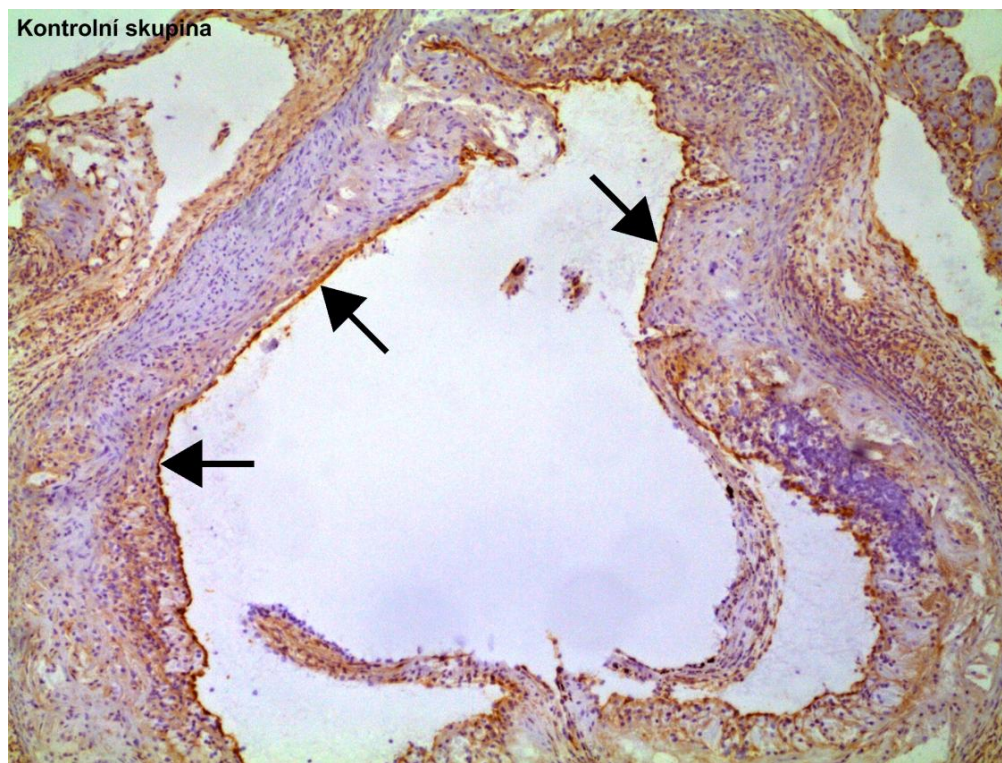
9.2 Imunohistochemická analýza

9.2.1 Imunohistochemické barvení ICAM-1 v sinu aorty

Imunohistochemická detekce ICAM-1 byla provedena na 120 sklíčkách s řezy z obou skupin myší. Imunohistochemické barvení prokázalo expresi ICAM-1 u všech myší ve studii. Expresie byla viditelná u endoteliálních buněk cévního lumen a také uvnitř aterosklerotických lézí (obr. 4). Kvalitativně byla exprese ICAM-1 u obou skupin myší velmi podobná. Mezi skupinami nebyly pozorovány změny intenzity zbarvení ICAM-1 (obr. 5). Všechny 120 řezů bylo použito pro stereologickou analýzu, kde jsme se soustředili jen na expresi na cévním endotelu.

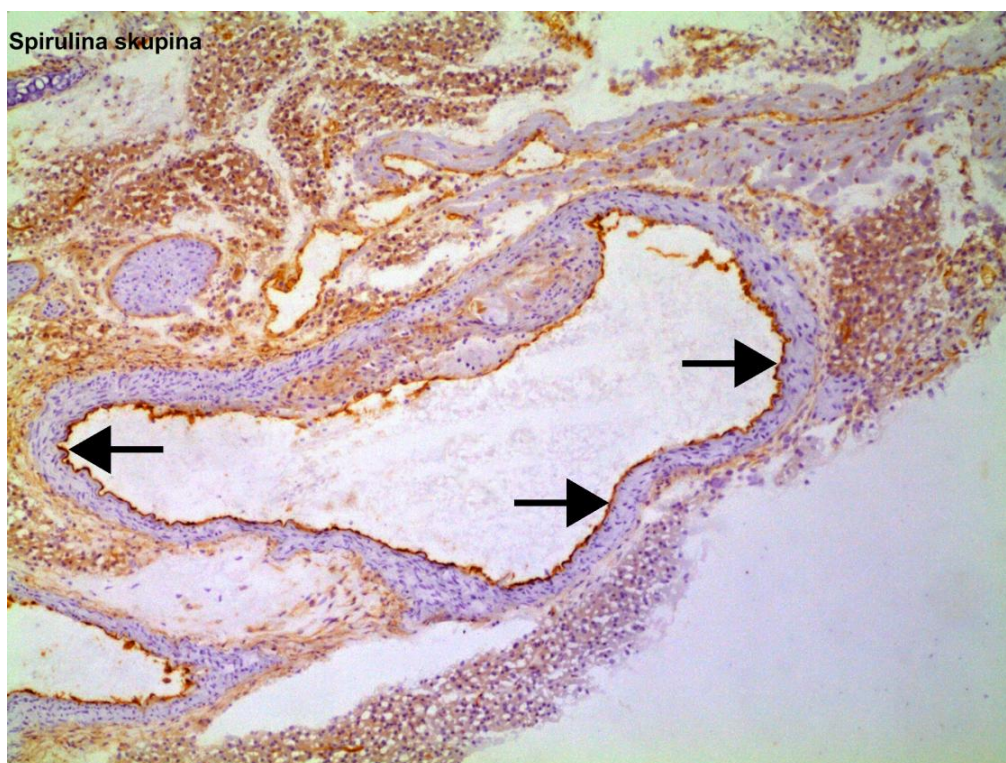
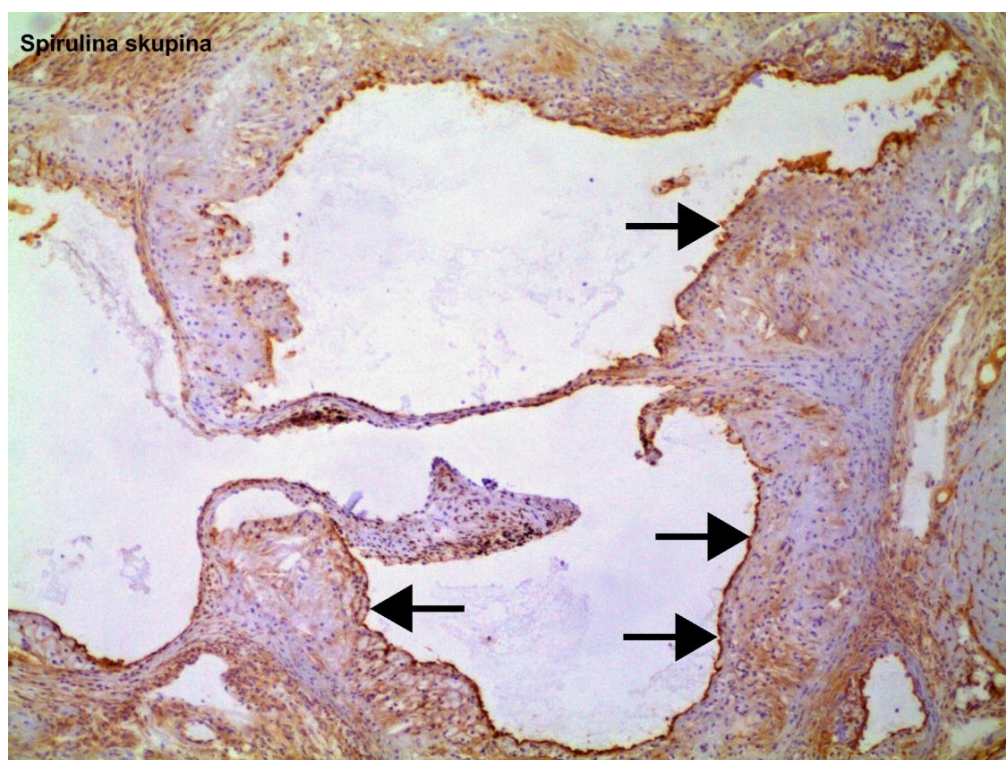
Obrázek 4: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení ICAM-1 u kontrolní skupiny zvířat.

Exprese ICAM-1 se nachází na cévním endotelu plátu (šipky) a v aterosklerotických plátech. Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.



Obrázek 5: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení ICAM-1 u skupiny zvířat, které byla podávána Spirulina.

Exprese ICAM-1 se nachází na cévním endotelu plátu (šipky) a v aterosklerotických plátech. Nebyly zde patrné žádné rozdíly v intenzitě barvení ve srovnání s kontrolní skupinou. Řezy jsou dobarveny hematoxylinem. Zvětšení 100x.

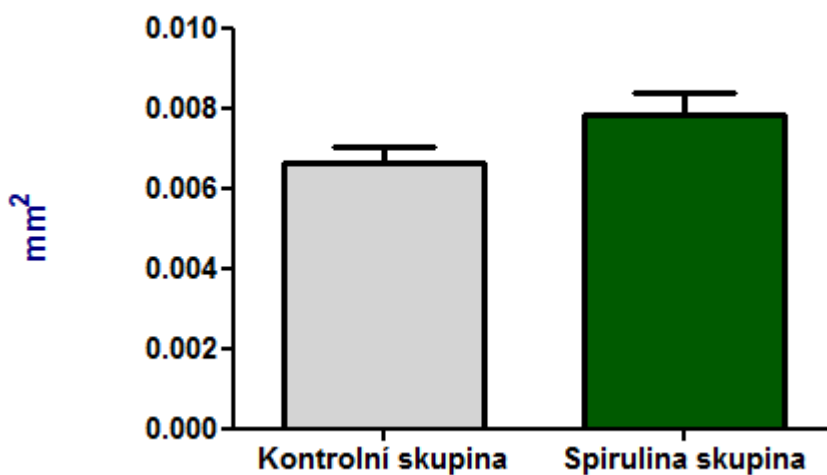


9.3 Stereologická analýza endoteliální exprese ICAM-1 v aortě

Stereologická analýza neprokázala statisticky významné rozdíly v endoteliální expresi ICAM-1 u myši, kterým byla podávána *Spirulina platensis*, ve srovnání s kontrolní skupinou ($0.007 \pm 0.0003 \text{ mm}^2$ vs $0.007 \pm 0.0005 \text{ mm}^2$), (viz Graf 2).

Graf 1: Stereologická analýza exprese ICAM-1 v aortě.

Podávání *Spiruliny* nevedlo k signifikantní změně endoteliální exprese ICAM-1 ve srovnání s kontrolní skupinou ($p = 0,1112$).



10. DISKUZE

Spirulina je volně plovoucí vláknitá řasa se spirálovitým uspořádáním vláken. Oficiálně je nazývána *Arthrospira* a patří do třídy *Cyanobacteriaceae* s charakteristickou fotosyntetickou aktivitou. Konzumace Spiruliny jako potravního doplňku je spojováno se zdravím prospěšnými účinky, jako prevence rozvoje hypercholesterolemie, hyperglycerolemie, některých zánětlivých onemocnění, alergií, rakoviny, ochrana před toxickými vlivy prostředí a toxicitou způsobenou léčivou, prevence virových infekcí, kardiovaskulárních nemocí, diabetu a dalších metabolických onemocnění (76).

Z tohoto důvodu jsme v této diplomové práci chtěli studovat efekty Spiruliny *platensis* na aterogenezi u hypercholesterolemických apoE-deficientních myší.

Spirulina byla podávána myším po dobu 8 týdnů společně s 1% cholesterolovou dietou a poté byly sledovány případné změny hladiny cholesterolu a změny endoteliální exprese prozánětlivé adhezní molekuly ICAM-1.

Hypolipidemické účinky Spiruliny (nebo jejích extraktů) byly prokázány na několika zvířecích modelech zahrnujících potkany, křečky a králíky. Krmení Spirulinou vedlo k významnému nárůstu aktivity lipoproteinové lipázy a jaterní lipázy (37, 77). Kromě toho, skupina křečků krměných aterogenní dietou doplněnou o Spirulinu (nebo její složku – phycocyanin), prokazovala nižší hladiny celkového cholesterolu, LDL i VLDL, přičemž hladina HDL se nezměnila (52).

Navzdory těmto studiím jsme v této diplomové práci nezaznamenali signifikantní vliv Spiruliny na hladiny celkového cholesterolu. Může to být dáno vysokými hladinami cholesterolu u použitých myší, které jsou výrazně vyšší, než u králíků, morčat nebo potkanů, a podávání Spiruliny tudíž nemuselo mít takový efekt.

Kromě hypolipidemických účinků byly u Spiruliny pozorovány i účinky antioxidační. Byly zkoumány účinky Spiruliny na oxidační stres vyvolaný železem. Podávání Spiruliny mělo ochranný vliv na aktivitu buněčných antioxidačních enzymů včetně glutathion peroxidázy (GPX), na selenu závislé peroxidázy (GPX-Se) a oxidované glutathion reduktázy (GR), a zvyšovalo hladiny glutathionu, které byly sníženy v důsledku poškození železem (78). Mimoto byly prokázány i protizánětlivé účinky a ochranný efekt na endotel. V závislosti na dávce Spiruliny se snížila kontraktilní odpověď oblouku aorty na vazokonstrikční agens – fenylefrin (PE), zatímco relaxační odpověď na vazodilatační podnět karchol byla zesílena; v souladu s představou, že Spirulina snižuje syntézu a/nebo uvolnění NO endotelem a COX-dependentního vasokonstrikčního prostanoиду hladkosvalovými buňkami (47).

Proto jsme také pozorovali jeden ze známých markerů endoteliální dysfunkce, ICAM-1 (79, 80). Exprese ICAM-1 je výrazně zvýšena při hypercholesterolemii. V řadě studií bylo prokázáno, že se tak děje v souvislosti rozvoje endoteliální dysfunkce a aterosklerózy (81 – 83). Kromě toho je prokázáno, že terapie aterosklerózy vede ke snížení exprese ICAM-1 v aterosklerotických plátech a na endotelu cév (83).

Navzdory výše uvedeným studiím jsme neprokázali signifikantní změnu exprese ICAM-1 po podávání Spiruliny na cévním endotelu. To může být dáváno do souvislosti s faktem, že nedošlo ke změně hladin cholesterolu. Snížení hladin cholesterolu může vést ke snížení exprese ICAM-1 (84). To, že nedošlo ke změnám exprese ICAM-1 může také souviset s velmi pokročilou aterosklerózou u použitých myši a tudíž dávka a délka podávání Spiruliny nemusí být dostačující pro ovlivnění exprese ICAM-1 *in vivo*. Další studie tedy budou zaměřeny na možné změny v dávkování Spiruliny s cílem zjistit její potenciální účinky v aterogenezi.

11. ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda podávání *Spiruliny platensis* ovlivňuje endoteliální expresi adhezní molekuly ICAM-1 v aortě ApoE-deficientních myší pomocí imunohistochemických a stereologických metod.

Biochemická analýza neprokázala žádný účinek podávání *Spiruliny* na hladiny celkového cholesterolu.

Imunohistochemické barvení prokázalo expresi ICAM-1 u všech myší ve studii. Expresie byla u endoteliálních buněk cévního lumen a také uvnitř aterosklerotických lézí. Mezi skupinami nebyly pozorovány změny z hlediska lokalizace a intenzity zbarvení ICAM-1.

Stereologická analýza neprokázala statisticky významné rozdíly v endoteliální expresi ICAM-1 u myší, kterým byla podávána *Spirulina platensis*, ve srovnání s kontrolní skupinou.

Změna experimentálního designu v budoucích studiích by měla prokázat, zda zvyšování dávky *Spiruliny platensis* může vést k antiaterogenním účinkům u těchto myší.

12. SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obr. 1: http://missinglink.ucsf.edu/lm/IDS_101_histo_resource/images/122X1_cropped-Q1_copy.jpg

(2012-02-22)

Obr. 2: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/moreabout/MoAbPics/JMcGendo.jpg>

(2012-03-06)

Obr. 3: <http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/images/strainsimage/nies-0046.jpg>

(2012-02-22)

Obr. 4: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení ICAM-1 u kontrolní skupiny zvířat.

Obr. 5: Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení ICAM-1 u skupiny zvířat, které byla podávána Spirulina.

13. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABC	avidin-biotin komplex
AIM	akutní infarkt myokardu
AP	angina pectoris
AP-1	activator protein-1
Apo	apolipoprotein
ApoE/LDLr-DKO	apolipoprotein E/LDL receptor double knock-out
BMI	body mass index
CAM	cellular adhesive molecule
CMP	cévní mozková příhoda
CMV	cytomegalovirus
COX	cyklooxygenáza
CRP	C-reaktivní protein
CT	počítačová tomografie
DAB	diaminobenzidin
DM	diabetes mellitus
ER	endoplazmatické retikulum
GPX	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
HDL	high-density lipoprotein
ICAM	intracellular adhesive molecule
IDL	intermediate-density lipoprotein
IL	interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	ischemická choroba srdce
IgG	imunoglobulin G
KVO	kardiovaskulární onemocnění
MadCAM	mucosal vascular addressin cell adhesive molecule
MCP-1	monocytární chemoatraktantový protein 1
MDA	malondialdehyd
MK	mastné kyseliny
MR	magnetická rezonance

NF- κ B	nuclear factor κ B
NO	oxid dusnatý
OCT	optima cutting temperature
PAI-1	inhibitor aktivátoru plazminogenu-1
PBS	phosphate buffer solution
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesive molecule-1
PG	prostaglandin
TAG	triacylglyceroly
TNF α	tumor-necrosis factor α
VCAM-1	vascular cell adhesive molecule-1
VLDL	very low-density lipoprotein
VMK	volné mastné kyseliny

14. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Josef Veselka, *Ischemická choroba srdeční Základní informace pro pacienty*, 1. vydání, Facta Medica, 2009, [s. 4], ISBN: 978-80-904260-4-7
2. J. Hradec a S. Býma, *Doporučené postupy pro praktické lékaře – ICHS*, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2007, [s.1], ISBN: 80-86998-14-2
3. Jiří Vlček, Daniela Fialová a kol., *Klinická farmacie I.*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2010, [s. 108-119], ISBN: 978-80-247-3169-8
4. L. Carlos Janqueira, José Carneiro, Robert O. Kelley, *Základy histologie*, 1. vydání (v ČR), H&H, 1997, [s. 204-211], ISBN: 80-85787-37-7
5. Radomír Čihák, *Anatomie 3*, 2. vydání, Grada Publishing a.s., 2004, [s. 71, 72], ISBN: 80-247-1132-X
6. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/moreabout/endothel.htm> (2012-03-06)
7. Češka Richard a kol., *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*, 1. vydání, Triton, 2005, 343 stran, ISBN: 80-7254-738-0
8. J. Mačák, J. Mačáková, *Patologie*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2004, [s. 171, 172], ISBN: 80-247-0785-3
9. Martin Vokurka, Jan Hugo a kol., *Velký lékařský slovník*, 6. vydání, Maxdorf, 2006, [s. 84, 239], ISBN: 80-7345-105-0
10. Stanislav Trojan a kol., *Lékařská fyziologie*, 4. vydání, Grada Publishing a.s., 2003, [s. 409, 410], ISBN: 80-247-0512-5
11. Stefan Silbernagl, Agamemnon Despopoulos, *Atlas fyziologie člověka*, 3. vydání, Grada Publishing a.s., 2004, [s. 254, 256], ISBN: 80-247-0630-X
12. Jiří Widimský, *Léčba dyslipidemií u pacientů s ICHS nebo jiným onemocněním aterosklerotické etiologie a u nemocných s diabetes mellitus*, 1. vydání, Triton, 2002, 190 stran, ISBN: 80-7254-252-4
13. Doran AC, Meller N, McNamara CA: The Role of Smooth Muscle Cells in the Initiation and Early Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008 May; **28**(5): 812-9
14. Rainger GE, Nash GB: Cellular pathology of atherosclerosis: smooth muscle cells prime cocultured endothelial cells for enhanced leukocyte adhesion. *Circ Res*, 2001 Mar 30; **88**(6): 615-22
15. Aleš Žák a kol., *Ateroskleróza – Nové pohledy*, 1. vydání, Grada Publishing, a.s., 2011, [s. 25, 26, 33], ISBN: 978-80-247-3052-3

16. Christian F. Krieglstein and D. Neil Granger, Adhesion molecules and their role in vascular disease, *AJH*, 2001, **14**: 44S-54S
17. Václav Hořejší, Jiřina Bartůňková, *Základy imunologie*, 1. vydání, Triton, 1998, [s. 58-61], ISBN: 80-85875-73-X
18. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MJ: Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; **84**: 9238-9242
19. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AF, Dinarello CA, Springer TA: A natural adherence molecule (ICAM-1): induction by IL-1 and IFN-, tissue distribution biochemistry, and function. *J Immunol* 1986; **137**: 245-254
20. Panés J, Perry MA, Anderson DC, Manning A, Leone B, Cepinskas G, Rosenbloom CL, Miyasaka M, Kvietys PR, Granger DN: Regional differences in constitutive and induced ICAM-1 expression in vivo. *Am J Physiol* 1995; **269**: H1955-H1964
21. Henninger DD, Panés J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN: Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 1997; **158**: 1825-1832
22. Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD: A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* 1991; **147**: 3788-3793
23. Banks RE, Gearing AJ, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ: Circulating intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), E selectin and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer* 1993; **68**: 122-124
24. De Fougères AR, Stacker SA, Schwarting R, Springer TA: Characterisation of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med* 1991; **174**: 253-267
25. Nortamo P, Li R, Renkonen R, Timonen T, Prieto J, Patarroyo M, Gahmberg CG: The expression of human intercellular adhesion molecule 2 is refractory to inflammatory cytokines. *Eur J Immunol* 1991; **21**: 2629-2632
26. Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ: Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1991; **114**: 1059-1068
27. De Lisser HM, Newman PJ, Albelda SM: Molecular and functional aspects of PECAM-1/DC31. *Immunol Today* 1994; **15**: 490-495
28. Streeter PR, Berg EL, Rouse BT, Bargatze RF, Butcher EC: A tissue-specific endothelial cell molecule involved in leukocyte homing. *Nature* 1988; **331**: 41-46

29. Baeuerle PA, Henkel T: Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 141-179
30. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 1995; **9**: 899-909
31. Montgomery KF, Osborn L, Hession C, Tizard R, Goff D, Vassallo C, Tarr PI, Bomsztyk K, Lobb R, Harlan JM, Pohlman TH: Activation of endothelial-cell leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 6523-6527
32. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR: Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1992; **140**: 665-673
33. Printseva OYu, Peclo MM, Gown AM: Various cell types in human atherosclerotic lesions express ICAM-1. Further immunocytochemical and immunochemical studies employing monoclonal antibody 10F3. *Am J Pathol* 1992; **140**: 889-896
34. O'Brien KD, Allen MD, Macdonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD, Lobb R, Alpers CE: Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1993; **92**: 945-951
35. Blann AD, McCollum CN: Circulating endothelial cell/leukocyte adhesion molecules in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1994; **72**: 151-154
36. Price DT, Loscalzo J: Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 1999; **107**: 85-97
37. Deng R, Chow T.-J.: Hypolipidemic, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*; *Cardiovascular Therapeutics* 2010; e33-e45
38. Sapp J. The procaryote-eucaryote dichotomy: Meanings and mythology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; **69**: 292-305
39. Komárek J, Hauer T. CyanoDB.cz – Online databáze of cyanobacterial genera. *Worldwide electronic publication*. Univ. of South Bohemia and Inst of Botany AS CR 2009; <http://www.cyanodb.cz>
40. Vonshak A (editor). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell biology and biotechnology*. London: Taylor and Francis, 1997

41. Gerschwin ME, Belay A (editors). *Spirulina in human nutrition and health*. Boca Raton: CRC Press, 2008
42. Kato T, Takemoto K, Katayama H, Kuwabara Y. Effects of *Spirulina* (*Spirulina platensis*) on dietary hypercholesterolemia in rats. *J Jap Soc Nutr Food Sci* 1984; **37**: 323-332
43. Nakaya N, Homa Y, Goto Y. Cholesterol lowering effects of *Spirulina*. *Nutr Rep Int* 1988; **37**: 1329-1337
44. Ramamoorthy A, Premakumari S. Effect of supplementation of *Spirulina* on hypercholesterolemic patients. *J Food Sci Technol* 1996; **33**: 124-128
45. Mani UV, Desai S, Iyer U. Studies on a long-term effect of *Spirulina* supplementation on serum lipid profile and glycated proteins in NIDDM patients. *J Nutraceut, Funct Med Foods* 2000; **2**: 25-32
46. Samuels R, Mani UV, Iyer U, Nayak US. Hypocholesterolemic effect of *Spirulina* in patients with hyperlipidemic nephrotic syndrome. *J Med Food* 2002; **5**: 91-96
47. Paredes-Carbajal MC, Torres-Durán PV, Díaz-Zagoya JC, Mascher D, Juárez-Oropeza MA. Effects of the ethanolic extract of *Spirulina maxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. *J Ethnopharmacol* 2001; **75**: 37-44
48. Khan M, Shobha JC, Mohan IK, et al. Protective effect of *Spirulina* against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytother Res* 2005; **19**: 1030-1037
49. Kim MH, Kim WY. The change of lipid metabolism and immune function caused by antioxidant material in the hypercholesterolemic elderly women in Korea. *Korean J Nutr* 2005; **38**: 67-75
50. Lu HK, Hsieh CC, Hsu JJ, Yang YK, Chou HN. Preventive effects of *Spirulina platensis* on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress. *Eur J Appl Physiol* 2006; **98**: 220-226
51. Cingi C, Conk-Dalay M, Cakli H, Bal C. The effects of *Spirulina* on allergic rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; **265**: 1219-1223
52. Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H, et al. A novel-protein C-phycoerythrin plays a crucial role in the hypercholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J Nutr* 2005; **135**: 2425-2430
53. Romay C, Armesto J, Ramirez D, González R, Ledon N, García I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue green algae. *Inflamm Res*, 1998; **47**: 36-41

54. Schafer FQ, Wang HP, Kelley EE, Cueno KL, Martin SM, Buettner GR. Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants. *Biol Chem* 2002; **383**: 671-681
55. Bai SK, Lee SJ, Na HJ, et al. beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. *Exp Mol Med* 2005; **37**: 323-334
56. Hutadilok-Towatana N, Reanmongkol W, Satitit S, Panichayupakaranant P, Ritthisunthorn P. A subchronic toxicity study of *Spirulina platensis*. *Food Sci Technol Res* 2008; **14**: 351
57. Chamorro G, Salazar M, Salazar S. Teratogenic study of *Spirulina* in rats. *Arch Latinoam Nutr*, 1989; **39**: 641-649
58. Kapoor R, Mehta U. Effect of supplementation of blue green alga (*Spirulina*) on outcome of pregnancy in rats. *Plant Foods Hum Nutr*, 1993; **43**: 29-35
59. Slotton DG, Goldman CR, Franke A. Commercially grown *Spirulina* found to contain low levels of mercury and lead. *Nutr Rep Int* 1989; **40**: 1165-1172
60. Rellán S, Osswald J, Saker M, Gago-Martinez A, Vasconcelos V. First detection of anatoxin-a in human and animal dietary supplements containing cyanobacteria. *Food Chem Toxicol* 2009; **47**: 2189-2195
61. Iwasa M, Yamamoto M, Tanaka Y, Kaito M, Adachi Y. *Spirulina*-associated hepatotoxicity. *Am J Gastroenterol* 2002; **97**: 3212-3213
62. Mazokopakis EE, Karefilakis CM, Tsartsalis AN, Milkas AN, Ganotakis ES. Acute rhabdomyolysis caused by *Spirulina (Arthrospira platensis)*. *Phytomedicine* 2008; **15**: 525-527
63. Paigen B, Morrow C, Brandon C *et al.* Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis* 1985; **57**: 65-73
64. Paigen B, Morrow A, Holme PA, Mitchell D, Williams RA. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987; **68**: 231-240
65. Liao F, Andalibi A, deBeer FC *et al.* Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kappa B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest* 1993; **91**: 2572-2579
66. Jawián J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology* 2004; **55**, **3**: 503-517
67. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992; **258**: 468-471

68. Piedrahita JA, Zhang SH, Hageman JR, Olivek PM, Maeda N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *PNAS* 1992; **89**: 4471-4475
69. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslows L, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Atheroscler Thromb* 1994; **14**: 133-140
70. Reddick RL, Zhang SH, Maeda N. Atherosclerosis in mice lacking apoE. Evaluation of lesion development and progression. *Atheroscler Thromb* 1994; **14**: 141-147
71. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K *et al.* Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; **71**: 343-353
72. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 1993; 883-893
73. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JC, Brown MS. The two receptor model of lipoprotein clearance: test of the hypothesis in „knockout“ mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 4431-4435
74. Bonthu S, Heistad DD, Chappell DA, Camping KG, Faraci FM. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endothelium – dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1997; **17**: 2333-2340
75. Witting PK, Petterson K, Ostlund – Lidqvist AH, Westernlund C, Ericsson AW, Stocker R. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *FASEB J* 1999; **13**: 667-675
76. Mazo VK, Gmshinskii IV, Zilova IS. [Microalgae Spirulina in human nutrition]. *Vopr Pitan* 2004; **73**: 45-53
77. Cheong SH, Kim MY, Sok DE *et al.* Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2010; **56**: 34-40
78. Bhat VB, Madyastha KM. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **285**: 262-266

79. Nachtigal P, Semecky V, Kopecky M et al. Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract* 2004; **200**: 219-229
80. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS et al. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; **18**: 842-851
81. Bourdillon MC, Poston RN, Covacho C et al. ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double-knockout mice (ApoE(-)/ICAM-1(-)) fed a fat or a chow diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 2630-2635
82. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001; **107**: 1255-1262
83. Sejda T, Jedliekova V, Svandova E, Poledne R. The effect of fluvastatin on cICAM-1 as a biomarker of endothelial dysfunction in patients with dyslipidemia. *Int Angiol* 2006; **25**: 414-417
84. Nachtigal P, Kopecky M, Solichova D 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. *J Pharm Pharmacol* 2005; **57**: 197-203