

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



Exprese endoglinu po podávání *Spirulina platensis*
u myšího modelu aterosklerózy.

The endoglin expression after administration of
Spirulina platensis in mouse model of atherosclerosis.

(rigorózní práce)

Vedoucí rigorózní práce
Hradec Králové 2011

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD.
Mgr. Alena Vondráčková

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

„Ráda bych poděkovala Doc. PharmDr. Petru Nachtigalovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady a za příjemnou spolupráci při sestavování mé rigorózní práce. Děkuji také mé rodině a přátelům za podporu a povzbuzení.“

Abstrakt

Mgr. Alena Vondráčková

Expresi endoglinu po podávání *Spirulina platensis* u myšního modelu aterosklerózy.

Rigorózní práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

Cíl práce: Cílem této práce bylo objasnit, zda podání *Spiruliny platensis* ovlivňuje expresi endoglinu a produkci kolagenu v aterosklerotických plátech. Dále jsme sledovali vliv *Spiruliny* na hladiny krevních lipidů.

Metody: Experimentální část probíhala na myších kmene C57BL/6J s deficitem apolipoproteinu E ve věku 3 měsíců. Tyto myši byly náhodně rozděleny do dvou skupin. Kontrolní skupina byla krmena aterogenní dietou s obsahem 1% cholesterolu. Druhá skupina dostávala stejnou stravu obohacenou o 20 mg *Spiruliny platensis* denně. Po osmítýdenním experimentu byla provedena biochemická analýza krve. Detekce kolagenu byla provedena histologickým barvením zelený trichrom. Imunohistochemická analýza odebraných segmentů tkáně (aorta a horní polovina srdce) byla použita pro stanovení exprese endoglinu. Dále jsme provedli kvantitativní analýzu histologie a imunohistochemie pomocí stereologických metod.

Výsledky: Podání *Spiruliny* vedlo k poklesu hladin LDL cholesterolu. Celkový cholesterol ani další frakce nebyly ovlivněny. Výsledky histologického barvení zelený trichrom neprokázaly změny v množství kolagenu v aterosklerotických plátech po podání *Spiruliny*. Imunohistochemickou analýzou jsme pozorovali expresi endoglinu u obou skupin. Mezi oběma skupinami jsme nezaznamenali významné rozdíly. Výsledky kvantitativní analýzy barvení kolagenu a exprese endoglinu neprokázaly vliv *Spiruliny* na množství kolagenu a expresi endoglinu.

Závěr: Výsledky této práce poukazují na slabé hypolipidemické účinky *Spiruliny platensis*. Podávání *Spiruliny* nemělo žádný efekt na expresi kolagenu, či stabilitu aterosklerotických plátů. Výsledky práce přisuzujeme nižší dávce *Spiruliny*, která byla zvolena v této pilotní studii.

Abstract

Mgr. Alena Vondráčková

The endoglin expression after administration of *Spirulina platensis* in mouse model of atherosclerosis.

Thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Pharmacy

Background: The aim of this study was to clarify whether the administration of *Spirulina platensis* affects the expression of endoglin and the production of collagen in atherosclerotic plaques. We also study the effect of *Spirulina* on blood lipid levels.

Methods: We used the mouse strain C57BL/6J deficient apolipoprotein E in the age of 3 months. These mice were randomly divided into two groups. The control group was fed with atherogenic diet containing 1% cholesterol. The second group received the same diet enriched with *Spirulina platensis* 20 mg daily. After an eight-week experiment, biochemical analysis of blood was performed. Detection of collagen was performed by histological staining green trichrom. Immunohistochemical analysis of tissue samples of segments (aorta and upper half part of heart) were used to determine the endoglin expression. In addition, we performed immunohistochemistry and histology quantitative analysis by stereological methods.

Results: Administration of *Spirulina* resulted in a decrease in LDL cholesterol. Total cholesterol fraction and others plasma cholesterol levels were not affected. The result of histological staining green trichrom did not confirm changes in the amount of collagen in the atherosclerotic plaques after administration of *Spirulina*. Immunohistochemical analysis, we observed the expression of endoglin in both groups. We did not notice significant differences between both groups. We had no significant differences among the both group. The result of quantitative analysis of collagen staining and endoglin expression did not show effects on the amount of collagen and endoglin expression.

Conclusions: The results of this thesis point to a weak lipid-lowering effects of *Spirulina platensis*. The administration of *Spirulina* had no effects on collagen expression, or stability of atherosclerotic plaques. We attribute results of this work to lower dose of *Spirulina*, which was chosen in this pilot study.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	ATEROSKLERÓZA	8
2.1	ÚVOD	8
2.2	EPIDEMIOLOGIE.....	8
2.3	ETIOPATOGENEZE.....	9
2.3.1	Přehled fází aterosklerózy	10
2.3.2	Endoteliální dysfunkce a úloha buněk v procesu aterosklerózy	13
2.4	RIZIKOVÉ FAKTORY	16
3	MYŠÍ MODEL Y ATEROSKLERÓZY	20
3.1	TRANSGENNÍ MYŠÍ MODEL Y	21
3.2	LDL – RECEPTOR DEFICITNÍ MYŠÍ MODEL (LDLR-KO)	22
3.3	APO E – DEFICITNÍ MYŠÍ MODEL (APOE-KO)	22
3.4	DALŠÍ MYŠÍ MODEL Y	24
4	SPIRULINA PLATENSIS	25
5	ENDOGLIN	28
6	CÍL PRÁCE	31
7	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
7.1	ZVÍŘATA A PŘEDEPSANÁ DIETA.....	32
7.2	BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	32
7.3	HISTOLOGICKÉ BARVENÍ ZELENÝ TRICHROM – DETEKCE KOLAGENU.....	33
7.4	IMUNOHISTOCHEMIE.....	35
7.5	KVANTITATIVNÍ ANALÝZA BARVENÍ KOLAGENU A EXPRESE ENDOGLINU.....	37
8	VÝSLEDKY	38
8.1	BIOCHEMICKÁ ANALÝZA	38
8.2	HISTOLOGICKÉ BARVENÍ ZELENÝM TRICHROMEM	38
8.3	IMUNOHISTOCHEMICKÉ BARVENÍ ENDOGLINU V OBLASTI AORTÁLNÍHO SINU.....	40
8.4	KVANTITATIVNÍ ANALÝZA BARVENÍ KOLAGENU	42
8.5	KVANTITATIVNÍ ANALÝZA EXPRESE ENDOGLINU	43
9	DISKUZE	44
10	ZÁVĚR	46
11	SEZNAM ZKRATEK	47
12	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49

1 ÚVOD

Kardiovaskulární choroby jsou hlavní příčinou úmrtnosti obyvatel v průmyslově vyspělých zemích. Česká republika se řadí mezi státy s největší kardiovaskulární úmrtností. Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou v současné době zodpovědné za téměř polovinu celkové mortality a velkou měrou se podílejí na nemocnosti, pracovní neschopnosti a stupňujících se výdajích na zdravotní péči (1).

Nejčastější příčinou KVO je ateroskleróza. Jedná se o chronické zánětlivé onemocnění srdce a cév, které se pozvolna vyvíjí několik let a první symptomy se obvykle objeví až klinickou manifestací v jejím pokročilém stádiu. Mezi klinické projevy aterosklerózy patří ischemická choroba srdeční (ICHS), cerebrovaskulární choroba, ischemická choroba dolních končetin (ICHDK) a další (1, 2).

Ateroskleróza je komplexním onemocněním. Jde o složitý proces, na jehož rozvoji se podílí řada faktorů a genetická výbava jedince. Kauzální léčba neexistuje. Podstatou léčby aterosklerotických onemocnění je snaha odstraňovat symptomy a léčit komplikace (3).

Současný trend léčby kardiovaskulárních onemocnění se výrazně opírá o prevenci. Prevence časného stadia aterosklerózy se nazývá primární prevencí a spočívá v komplexním ovlivnění všech modifikovaných rizikových faktorů. Má za cíl zabránit vzniku aterosklerózy a jejím klinickým manifestacím u dosud zdravých jedinců. V oblasti sekundární prevence je důraz kladen na pacienty s manifestní aterosklerózou. Zde je důležitá intervence všech ovlivnitelných faktorů spolu s farmakologickou profylaxí.

V posledních dvaceti letech můžeme ve statistikách kardiovaskulární úmrtnosti nalézt trochu optimismu. Standardizovaná mortalita na KVO v ČR klesá a to zejména v důsledku změn životního stylu u určitých skupin populace. Velký pokrok zaznamenala léčba hypertenze a dyslipidemií. Dochází také k lepšímu uplatňování zásad primární a sekundární prevence společně s včasnou detekcí pacientů trpících aterosklerózou (2).

Nadále je epidemiologie KVO označována jako masivní a je předmětem intenzivního výzkumu v řadě experimentálních i klinických laboratořích na celém světě a také na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

2 ATEROSKLERÓZA

2.1 Úvod

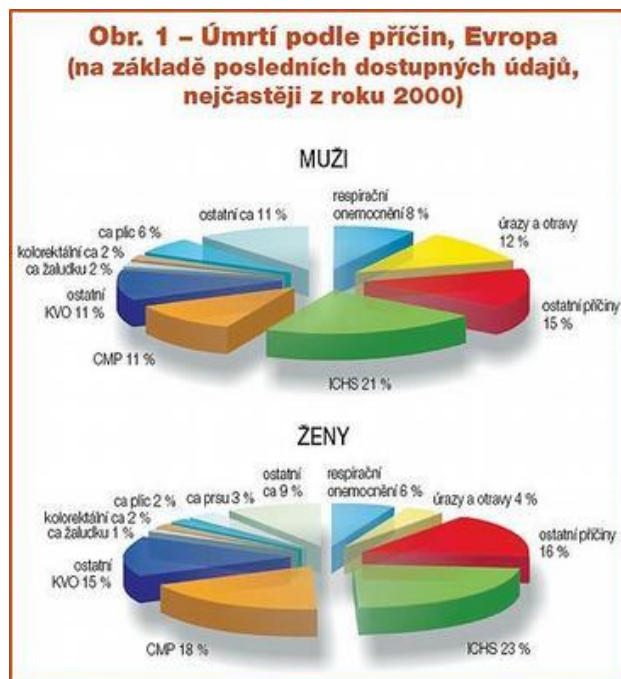
Ateroskleróza je onemocnění postihující cévy tepenného řečiště. Postiženy mohou být středně velké a velké arterie mozku, srdce, ledvin a dalších důležitých orgánů včetně končetin. Definuujeme ji jako chronický zánět charakterizovaný nadměrnou proliferativní odpovědí intimy a medie tepen na různé podněty (4).

Proces aterosklerózy se vyznačuje dysfunkcí endotelu a následnou akumulací lipidických látek, cholesterolu, makrofágů, buněk hladkého svalstva, fibrózní tkáně, odpadních produktů buněk, kalcia a dalších látek ve stěně cév. Proces aterogeneze vede k zúžení postižené tepny různého stupně až po její úplnou obliteraci, na které se podílí nasedající trombóza.

Jelikož se jedná o dlouhodobý proces lze ho charakterizovat několika fázemi. Zjednodušeně můžeme rozlišit časnou a pozdní fázi aterosklerotického procesu. V časně fázi dochází k akumulaci lipidů v cévní stěně. Pro pozdní fázi je charakteristická intimální proliferace a nasedající trombóza (3, 4).

2.2 Epidemiologie

Ateroskleróza je nejčastější příčinou KVO ve vyspělých zemích světa a České republice. Mezi její nejčastější klinické manifestace patří ICHS. Ta představuje 40 % všech úmrtí z kardiovaskulárních příčin (5). Na obrázku č. 1 je patrné, že ICHS je zároveň nejčastější příčinou úmrtí v Evropě.



www.zdn.cz

2.3 Etiopatogeneze

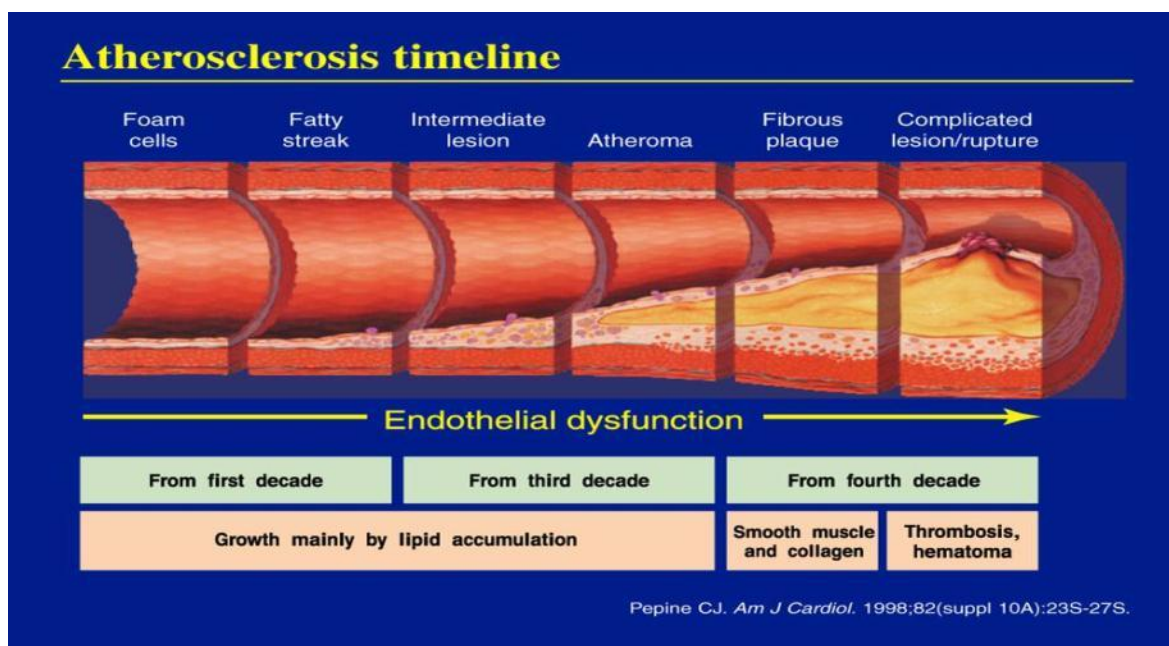
Teorii vzniku aterosklerózy bylo v literatuře popsáno již několik. Dlouhou dobu se soudilo, že tvorba aterosklerotických plátů je způsobena pasivním ukládáním lipidů do cévní stěny. Dále byly navrženy teorie, které tento proces charakterizují jako aktivní multifaktoriální děj (6).

Za zmínku stojí připomenout teorii profesora Rosse, který v polovině 70. let minulého století formuloval hypotézu, že primární příčinou vzniku aterosklerózy je strukturální poškození endotelu. Ross označil za spouštěče aterogeneze různé mechanické, chemické, fyzikální a imunologické podněty, které poškozují endotel (7). V dalších letech byla jeho teorie dále rozšířena a označena za takzvanou jednotnou teorii vzniku aterosklerózy (8).

2.3.1 Přehled fází aterosklerózy

V současnosti můžeme rozdělit rozvoj aterosklerotického procesu na časnou a pozdní fázi. Mnoho autorů zabývajících se touto problematikou, rozlišuje v těchto fázích šest typů aterosklerotických lézí (9).

Obrázek 2: Rozvoj aterosklerózy v čase.



http://www.unimedic.co.uk/index.php?page=competence_centre

I. Iničiační fáze – akumulace lipidů.

1. typ léze – Změny v cévní stěně jsou minimální. Lipoproteinové částice se nacházejí izolovaně v intimě a medii cév. Jde o takzvané lipoproteiny o nízké hustotě (LDL). Přítomnost LDL v cévní stěně přitahuje monocyty, které se při přestupu z krve přemění na makrofágy. Makrofág je schopný fagocytovat lipidy a přecházet na pěnovou buňku.

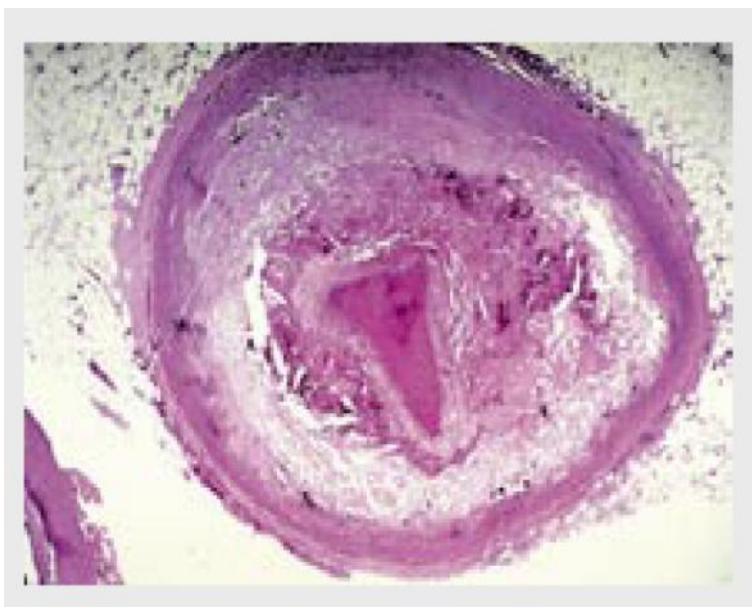
Tyto léze jsou nejčastěji popsány v dětském věku. Některé mohou zmizet anebo přejít v léze druhého typu. Záleží na okolnostech, jako je genetická výbava jedince, hladiny cholesterolu atd. (10, 11).

2. typ léze – Jsou označovány jako tukové proužky na povrchu intimy. Vznikají asi mezi 30 - 40 rokem. Pěnové buňky jsou navrstveny na sebe a mají vyšší obsah lipidů.
3. typ léze – Stojí na rozhraní mezi časnou a pozdní fází aterosklerózy a proto se nazývají intermediální či preateromové léze.

II. Pozdní fáze – proliferace do intimy a nasedající trombóza.

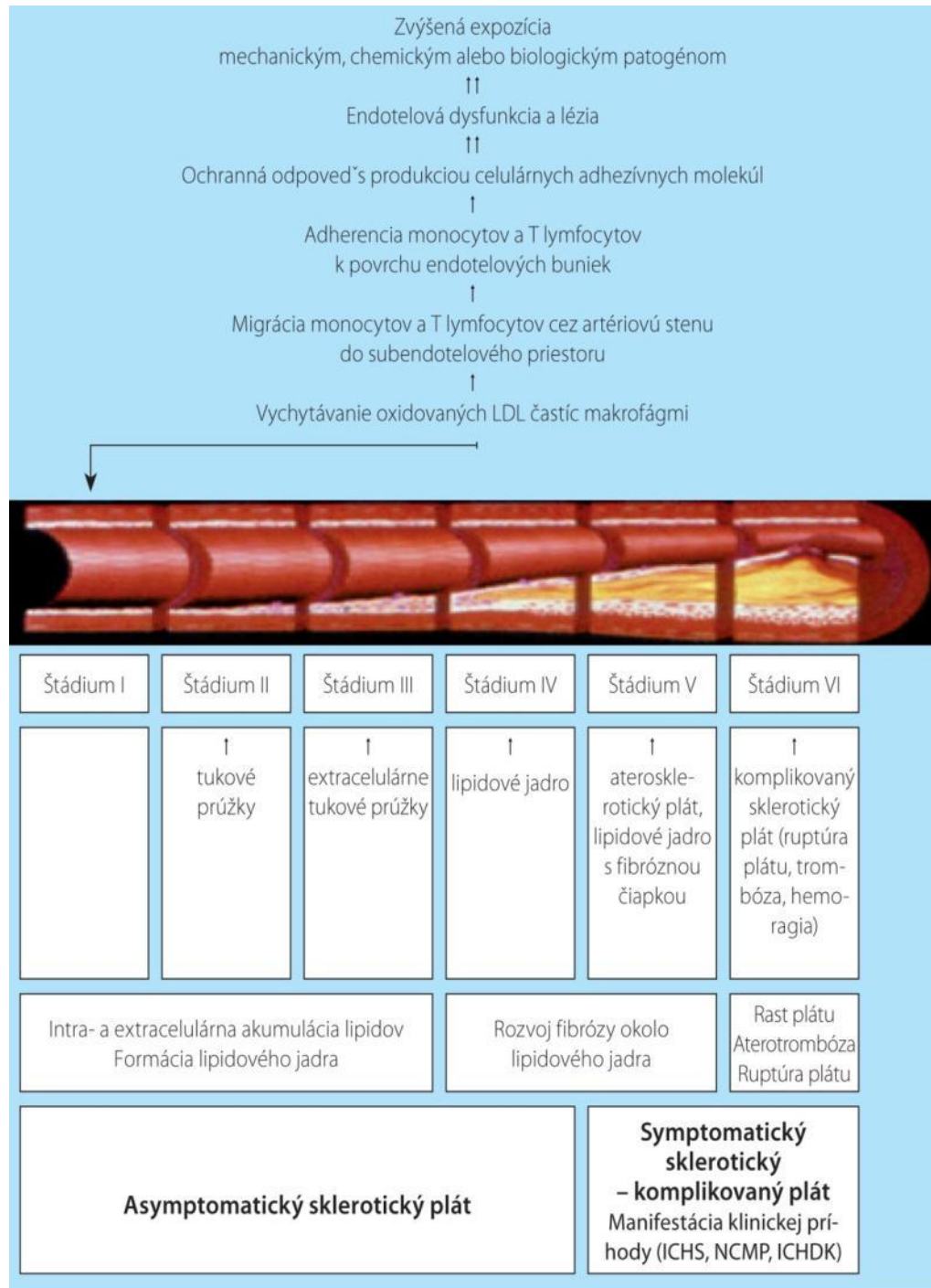
4. typ léze – Aterom obsahující lipidové jádro uložené v bazální části léze. Jádro je tvořeno z extracelulárně akumulovaných lipidů. Tepna se postupně uzavírá.
5. typ léze – Fibroaterom. Dochází k proliferaci a expresi hladkých svalových buněk, zvyšuje se syntéza kolagenních a elastických vláken. Nad lipidovým jádrem se tvoří vazivový kryt neboli čepička.
6. typ léze – Představuje komplikovanou lézi, kdy dochází k ulceracím a krvácení do plátu. Nekrotická hmota kalcifikuje a vzniká nástěnná trombóza (10, 11).

Obrázek 3: Konečné stádium aterosklerózy s trombózou tepny a její úplnou okluzí. (ilustrativní foto)



<http://www.solen.cz/pdfs/int/2003/05/15.pdf>

Obrázek 4: Stádia rozvoje aterosklerózy.



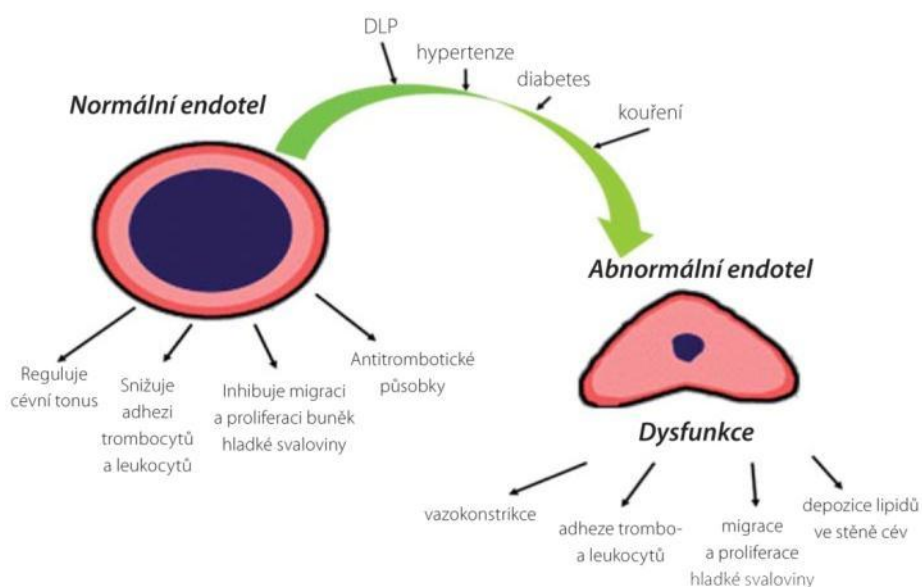
Autorem obrázku je MUDr. Ľubomíra Fábryová, PhD.
prezidentka Slovenské Asociace Aterosklerózy (www.saa.sk)

2.3.2 Endoteliální dysfunkce a úloha buněk v procesu aterosklerózy

Endoteliální dysfunkce je souborem prvotních změn, které předcházejí vlastnímu vzniku aterosklerotických lézí, ale provázejí i pozdní stádia pokročilé aterosklerózy. V rané fázi aterosklerózy nemusí mít endoteliální dysfunkce žádné příznaky. Později pak spolu podmiňuje vznik vazospasmu, ruptury aterosklerotického plátu a aterotrombózy.

Endotel je největším endokrinním orgánem lidského organismu, tvoří souvislou výstelku cév a podílí se na udržení napětí cévní stěny. Ovlivňuje také procesy koagulace, fibrinolýzy a reparační pochody. Rozvoj endoteliální dysfunkce je dán řadou faktorů. Většinu z nich známe a označujeme je jako rizikové faktory aterosklerózy (8).

Obrázek 5: Znaky endotelu a jeho dysfunkce (8).



Endotelové buňky

Endotelové buňky mají v procesu aterogeneze protizánětlivé a antikoagulační vlastnosti. Příkladem může být jejich schopnost syntézy oxidu dusnatého (NO). Ten účinkuje jako silný inhibitor agregace trombocytů na buňkách endotelu a redukuje kumulaci zánětlivých buněk v intimě cév. NO snižuje expresi genů pro molekuly ICAM-1, VCAM-1, P-selektin a MCP-1. Tyto adhezivní molekuly a selektin přitahují buňky zánětu a urychlují jejich migraci do subendotelu cév. Je známo, že některé rizikové faktory aterosklerózy vedou k redukcii tvorby NO (8).

Zánětlivé buňky

LDL částice jsou schopné pasivně difundovat do cévního endotelu. Pokud je jejich koncentrace vyšší, zvyšuje se tím i difuze. Jsou vysoce aterogenní. Akumulace lipidů (hlavně jejich oxidovaných forem) vede k aktivaci buněk endotelu, které následně produkují chemokiny, selektivní a adhezivní molekuly. Dále dochází k chemoatrakci, migraci a aktivaci leukocytů na místo zánětu. Monocyty, které se dostanou do intimy cév se diferencují na makrofágy pod vlivem chemokinů jako je např. M-CSF. Tyto chemokiny syntetizují scavengerové receptory, které umožňují makrofágům pohltit oxidované lipidy a přeměnit je na pěnové buňky. Takto aktivované makrofágy rychle podléhají apoptóze a tím se z nich uvolňují lipidy (8).

Obrázek 6: Makrofág.



Buňky hladké svaloviny cév (VSMCs)

VSMCs se nacházejí v medii cév a regulují cévní tonus. Při ateroskleróze jsou tyto buňky ovlivněny různými cytokiny, které produkují buňky endotelu a makrofágy. VSMCs putují z medie cév do intimy a mění se i jejich fenotyp. Tím se redukuje jejich obsah kontraktilních proteinů. VSMCs produkují různé růstové faktory VEGF, PDGF, které urychlují jejich proliferaci v místě poškození. Dále vytváří glykosoaminoglykany, elastin a izoformy kolagenu 1. a 3., které zajišťují reparaci cév a formování fibrózní čepičky aterosklerotické léze. Fibrózní kryt neboli čepička odděluje vysoce trombogenní jádro od trombocytů a proteinů koagulace, které cirkulují v krvi. Jelikož jsou VSMCs schopné syntézy fibrózní čepičky, můžeme je považovat za ochranné buňky v procesu aterosklerózy (12).

Vulnerabilita a ruptura aterosklerotického plátu

Rozvoj ruptury aterosklerotického plátu nastává několika níže uvedenými mechanismy.

Aktivované T buňky produkují cytokiny, které inhibují VSMCs a dochází k poškození syntézy kolagenu. Makrofágy produkují cytokiny jako je IL-1 β a TNF- α , které mají cytotoxický vliv na VSMCs. Dále makrofágy produkují metaloproteinázy degradující proteiny fibrózní čepičky.

Aterosklerotický plát se může uvolnit dvojím způsobem. Častěji dochází k ruptuře fibrózní čepičky, nežli k erozi endotelových buněk pokrývajících čepičku. Následně dochází k aktivaci trombocytů a spouští se tak koagulační kaskáda. Tak vzniká nasedající trombus, který se může uvolnit do krevního řečiště a vyvolat ischemii (13).

2.4 Rizikové faktory

Rizikové faktory, které se podílejí na vzniku aterosklerózy rozdělujeme na neovlivnitelné a ovlivnitelné. Jsou výsledkem interakce životního stylu jedince s jeho genetickou výbavou (2).

Proces vzniku aterosklerózy je ve většině případů zapříčiněn akumulací těchto rizikových faktorů.

Neovlivnitelné rizikové faktory

Věk

Riziko stoupá se zvyšujícím se věkem. U mužů je tomu po 45. roce a u žen po 55. roce života (resp. po menopauze). Věk je považován za velký rizikový faktor aterosklerózy. Hlavní příčinou zvyšování rizika věku je postupná akumulace jiných rizikových faktorů (3, 4).

Dědičnost

V genezi aterosklerózy hraje důležitou roli polygenní predispozice. Geny kódující transportní proteiny lipidů, jejich receptory a enzymy účastníci se tvorby lipidů jsou vysoce polymorfni a často u svých nositelů prokazatelně ovlivňují koncentraci lipidů v krvi. Důležité jsou dědičně podmíněné změny receptorů LDL a apolipoproteinů, mutace destičkových a koagulačních funkcí u trombofilních stavů, genové polymorfismy ACE, reninu, endotelinu, NO syntázy, atd.

Geneticky jsou také kódovány rozměry koronárních tepen, funkce endotelu, funkce hladké svaloviny cév, molekulární mechanismy růstu a remodelaci (cytokiny, růstové faktory, adhezivní molekuly, apoptóza) a řada dalších (4).

Rodinná anamnéza (RA)

Zde je zvýšené riziko pro jedince, pokud jeho rodinná anamnéza obsahuje předčasnou manifestaci aterosklerózy. U mužů ve věku nižším než 55 let a u žen nižším než 65 let, nebo u příbuzného 1. stupně (tj. rodiče, sourozenci, děti).

Několik prospektivních studií prokázalo, že rodinná anamnéza představuje nezávislý rizikový faktor. Relativní riziko vzniku ICHS, je při pozitivní RA dvakrát až dvanáctkrát vyšší.

Významnou roli z hlediska familiárního rizika mají genetické predispozice a životní styl rodiny (rodinné prostředí, stravování, kouření v domácnosti). Z tohoto pohledu tedy víme, že hlavními nositeli familiárního rizika jsou sourozenci (4).

Pohlaví

Muži mají obecně větší riziko než ženy. U mužů dosahuje riziko klinické významnosti již ve věku 40 – 50 let, u žen je tomu až po menopauze (4).

Ovlivnitelné rizikové faktory

Kouření cigaret

Patří k nejdůležitějším rizikovým faktorům. Kouření se samo o sobě podílí na vzniku jiných rizikových faktorů aterosklerózy např. hypertenze. Zplodiny kouře výrazně poškozují endotel nejen u aktivních, ale i u pasivních kuřáků (3, 14).

Dyslipoproteinemie (DLP)

Dyslipoproteinemie je skupina metabolických onemocnění, která je charakterizovaná změnou koncentrace lipoproteinů v krvi. Jedná se o onemocnění hromadného výskytu, které zvyšuje riziko kardiovaskulárních chorob, především aterosklerózy. Na rozvoji DLP se podílejí faktory genetické a vlivy zevního prostředí.

Rozdělujeme izolovanou hypercholesterolemii (zvýšení LDL-cholesterolu), izolovanou hypertriacylglyceridemii a kombinovanou hyperlipidemii (4).

Hodnoty dyslipidémie jsou: celkový cholesterol ≥ 5 mmol/l, LDL ≥ 3 mmol/l, HDL ≤ 1 mmol/l a triglyceridy $\geq 1,7$ mmol/l. U pacientů s diabetem či metabolickým syndromem jsou tyto hodnoty ještě přísnější.

Terapie DLP zahrnuje hypolipidemika jako statiny, fibráty, pryskyřice, ezetimib či niacin s intervencí režimových opatření. Léčba je dlouhodobá a celoživotní. Úspěšná léčba DLP snižuje riziko kardiovaskulárních příhod, ale nemůže je eliminovat, jelikož proces aterosklerózy je komplexní děj (3).

Arteriální hypertenze (AH)

Arteriální hypertenze představuje základní rizikový faktor aterosklerózy a je také nejčastějším chronickým onemocněním v průmyslově vyspělých zemích. Její prevalence je mezi 30 – 40 % a narůstá ve vyšších věkových skupinách. Na základě metaanalýzy populačních studií byla prokázána jednoznačná závislost kardiovaskulární morbidity a mortality na hodnotě krevního tlaku. Příkladem uvádím výsledek z Framinghamské studie. Tato velká epidemiologická studie zjistila, že riziko úmrtí na ICHS se zvyšuje následovně: vezmeme-li relativní riziko systolického krevního tlaku (STK) jako 1, zvýší se u osoby s STK nad 180 mm Hg 5,56 krát (4).

WHO definuje AH jako opakované zvýšení krevního tlaku nad hodnotu 140/90 mm Hg, a to alespoň u 2 ze 3 měření při dvou různých návštěvách lékaře. Klasifikovat lze AH do čtyř skupin dle vývojových stádií (3).

Za normální hodnoty krevního tlaku se považuje systolický tlak do 140 mm Hg a diastolický v hodnotách do 90 mm Hg v běžné populaci. U osob s diabetem, renálním postižením či s mikroalbuminurií by měli být cílové hodnoty krevního tlaku nižší než 130/80 mm Hg (4).

Bylo dokázáno, že vysoký krevní tlak přímo poškozují cévní endotel a jiné orgány. Přesný mechanismus jakým působí hypertenze na formaci a případnou rupturu aterosklerotického plátu neznáme. Jednou z možností je ovlivnění stability plátu, která je funkcí interakce cholesterolového obsahu plátu, síly fibrózního krytu a střížných sil

působících na cévní stěnu. Hodnota systolického krevního tlaku je zodpovědná za působící příčné síly a ovlivňuje tedy stabilitu plátu (15).

Diabetes mellitus, porušená glukózová tolerance, metabolický syndrom

Mezi nemocnými diabetem jsou aterosklerotické komplikace vůdčí příčinou morbidity a mortality. ICHS se u diabetiků vyskytuje 2-3 krát častěji. Klinické projevy aterosklerózy se u diabetiků projevují dříve. Nemocní s diabetem mají obvykle další rizikové faktory jako je hypercholesterolémie, hypertenze a obezita. Diabetes mellitus je komplexní metabolické onemocnění provázené poruchou fibrinolytické aktivity, zvýšené hladiny fibrinogenu a poruchou glykosylace tkáňových proteinů. Data z velkých studií však nepotvrdila, že na výskytu KVO má u diabetiků vliv přísná kontrola glykemie. Akcelerace aterosklerózy u diabetiků je výrazně ovlivněna odstraněním dalších rizikových faktorů aterosklerózy (4, 15).

Jako metabolický syndrom se označuje soubor více uvedených rizikových faktorů: porucha lačné glykemie či inzulínová rezistence, arteriální hypertenze, abdominální obezita, hypercholesterolémie a triglyceridémie. Nemocní s MS mají vysoké riziko aterosklerózy (4).

Obezita

Obezita se stává nejčastější metabolickou nemocí v rozvinutých zemích a postupně i v rozvíjejících se zemích světa. Její prevalence stoupá ve všech věkových skupinách u obou pohlaví. Především obezita centrálního typu (abdominální) je často součástí metabolického syndromu a vede k akceleraci aterosklerózy.

Redukce hmotnosti je základem v léčbě a prevenci všech KVO a komplikací aterosklerózy (3, 4).

Nedostatek tělesné aktivity

Nedostatek tělesné aktivity má nepříznivý vliv na celkový zdravotní stav a zvyšuje riziko vzniku aterosklerózy (3).

3 MYŠÍ MODELY ATEROSKLERÓZY

Obrázek 7 – Myší model aterosklerózy (ilustrativní foto).



<http://jaxmice.jax.org>

Ateroskleróza je komplexní, chronické onemocnění, které se u člověka vyvíjí po několik let. Z těchto důvodů se výzkum aterosklerózy *in vivo* v posledních desetiletích soustřeďuje na zvířecí modely aterosklerózy. U zvířat dokážeme lépe sledovat průběh tohoto onemocnění a hodnotit ho v kratším časovém horizontu (16).

Do nedávné doby se výzkum aterosklerózy zaměřoval na větší zvířata, jako jsou prasata, primáti a králíci. Tyto velké modely zaznamenaly velké přínosy (17).

Postupem času se myš stala převládajícím druhem ve studiu aterosklerózy. Její výhodou je malá velikost a možnost genetické modifikace. Myši jsou velice odolné vůči ateroskleróze. Výjimkou je myší kmen C57BL/J6. První model aterosklerózy za použití tohoto kmene byl založen na stravě (Wisslerova laboratoř na počátku 1960). Strava obsahovala 30% tuku, 5% cholesterolu a 2% cholové kyseliny. Tato strava byla pro myši vysoce toxická a to v důsledku vysokého obsahu kyseliny cholové. U myši docházelo k častému rozvoji zánětu, ztrácely na váze a trpěly zejména respiračními infekcemi.

Úpravu složení stravy později provedl Paigen. Stravu s obsahem 15% tuku, 1.25% cholesterolu a 0.5% kyseliny cholové nazýváme Paigenovou stravou. I tento model měl své nevýhody, aterosklerotické léze byly velmi malé a strava stále zánětlivá, což přinášelo potíže. Aterosklerotické léze se u těchto myši nacházely v oblasti aortálního kmene.

Zajímavé je, že oproti lidské rase mají samice myši generalizovanější aterosklerotické léze než samci. Paigen a kol. vyvinuli nejen speciálně upravenou stravu, ale svými poznatky o kvantifikaci lézí v aortálním kmeni významně přispěli do výzkumu aterosklerotického procesu (18).

Později vyvinul Hayek a kol. více fyziologickou stravu pro navození hyperlipidémie u myši. Mluvíme o tzn. “western type diet“, která obsahuje 21% tuku, 0.15 % cholesterolu a neobsahuje kyselinu cholovou. Dnes se široce používá u geneticky modifikovaných myších modelů, jelikož se její složení podobá složení lidské stravy (19).

3.1 Transgenní myší modely

Transgenní myší modely vznikly úpravou exprese genů, které jsou zapojeny do některých z kroků, které ovlivňují metabolismus lipidů.

Apolipoprotein B (APO-B) je důležitým proteinem pro částice VLDL a LDL. Jako ligand je zodpovědný za jejich přestup do tkání. Dalo by se předpokládat, že zvýšené hladiny APO-B povedou k akceleraci aterosklerózy. Výzkum u transgenních myši, však tuto myšlenku nepotvrdil. Pouze pokud byly myši krmeny speciálně upravenou stravou bohatou na tuky a cholesterol, došlo k rozvoji aterosklerózy. Léze měly jednoduchou strukturu tvořenou převážně makrofágy a pěnovými buňkami (16, 20).

Apolipoprotein E (APO-E) je exprimován na povrchu nejrůznějších krevních lipidů a je nezbytný pro katabolismus lipoproteinů. APO-E transgenní myši mají spontánní průběh aterosklerózy, který je při výzkumu urychlován podáváním speciálně upravené stravy. V aterosklerotických lézích již můžeme pozorovat bohatost pěnových buněk a formaci fibrózní čepičky nad lézí (16).

3.2 LDL – receptor deficitní myší model (LDLR-KO)

Obrázek 8: LDL – receptor deficitní myší model (ilustrativní foto).



<http://jaxmice.jax.org>

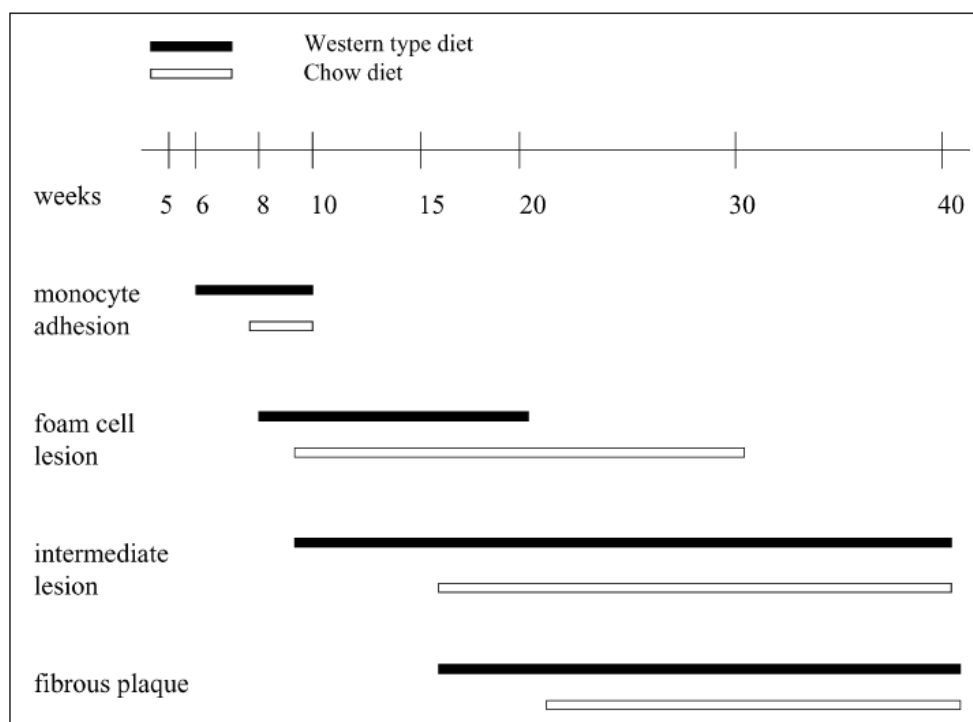
LDLR-KO myší model byl poprvé vytvořen v roce 1993 Ishibashim a kol. (21). Při krmení těchto myší běžnou stravou nedochází ke spontánnímu rozvoji aterosklerózy. Ten musí být podpořen stravou bohatou na tuky, na kterou model velmi dobře reaguje. Pokud jsou tedy LDLR-KO myši krmeny Paigen či western stravou dochází u nich k rozvoji velkých aterosklerotických lézí a nárůstu hladiny plasmatického cholesterolu. Hypercholesterolemie u LDLR-KO myší navozená upravenou stravou se velice podobá lidské familiární hypercholesterolemii typu III. (22, 23).

3.3 APO E – deficitní myší model (APOE-KO)

APOE-KO myší model byl vytvořen v roce 1992. Je charakterizován samovolným rozvojem aterosklerózy s výraznou hypercholesterolémií. Aterosklerotické léze u APO-E deficitních myší jsou velice podobné jako u člověka. Tyto myši reagují, obdobně jako člověk, na western stravu. Pokud jsou krmeny touto stravou, zvyšuje se tvorba a velikost jejich aterosklerotických lézí. APO-E deficitní myši, které přijímaly western stravu 5 týdnů, měly 3-4 krát větší léze než ty samé myši krmené stravou s nízkým obsahem tuků (viz obrázek č. 9). Rozvoj aterosklerózy je u nich vyšší než u LDL - receptor deficitních myší (22, 23).

Experimentálně se APOE-KO myší model využívá k identifikaci genů a rolí různých typů buněk účastnících se aterogeneze a k identifikaci vlivu rizikových faktorů aterosklerózy. Nutno též zmínit, že se jedná o široce využívaný myší model ve výzkumu léčiv z hlediska farmakologie a možností nové terapie aterosklerózy (23).

Obrázek 9: Diagram aterosklerotických změn v čase u APO-E deficitního myšího modelu v závislosti na typu přijímané stravy (23).



Překlad:

Western type diet - Western strava (bohatá na tuky)

Chow diet – běžná strava

weeks – týdny

monocyte adhesion – adheze monocytů

foam cell lesion – léze pěnových buněk

intermediate lesion – intermediální léze

fibrous plaque – fibrózní plak

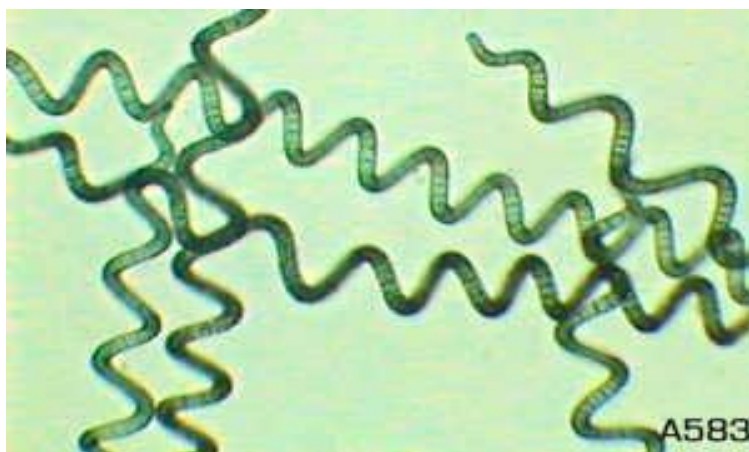
3.4 Další myší modely

Dále jsou ve výzkumu aterosklerózy používány tzn. dvojitě deficitní myší modely. Příkladem je APO-E a LDL-receptor deficitní myší model, který charakterizuje rozvoj těžké hypercholesterolémie a aterosklerózy (22). Rozvoj aterosklerózy je spontánní, vyšší než u předchozích myších modelů a není založen na použití vysoce tukové stravy. Díky tomu je využíván pro studium látek, které mají anti-aterogenní efekt a jsou podávány myším s běžnou stravou (24).

4 SPIRULINA PLATENSIS

Spirulina se taxonomicky řadí mezi *Bakteria* (bakterie), oddělení *Cyanobacteriae* (Sinice), třída *Cyanophyceae*, řád *Oscillatoriales*, rod *Arthrospira* (Spirulina) (25).

Obrázek 10 – Spirulina platensis (ilustrativní foto).



<http://www.sciento.co.uk/catalog/item/247/>

Spirulina platensis je modrozelená řasa, díky obsahu pigmentu chlorofylu a fykokyaninu. Je to jednobuněčná řasa vyskytující se v teplých klimatických oblastech. Její název je odvozen od latinského slova *helix* (spirála) a poukazuje na uspořádání, které je patrné z obrázku č. 10. I když se jedná o jednobuněčnou řasu, její struktura je relativně velká (0,5 mm) (26).

Spirulina a jiné modrozelené řasy obsahují proteiny, esenciální mastné kyseliny, polysacharidy, antioxidanty, vitamíny a minerální látky a používají se jako zdroj výživy. V potravinářství se využívá zejména *Spirulina platensis*. Užívá se jako potravinový doplněk a je též označována za jeden z nejbohatších a nejkompaktnějších zdrojů výživy na světě (27).

Pozitivní vliv *Spiruliny* na aterosklerózu je předmětem mnoha studií. Bylo prokázáno, že *Spirulina* vykazuje hypolipidemické účinky a snižuje krevní tlak (28). Mechanismus hypolipidemického účinku však nebyl plně vysvětlen.

Nagakoa S. a kol., zjistili, že *Spirulina* inhibuje střevní absorpci cholesterolu a žlučových kyselin, díky obsahu C-fykokyaninu (C-PC) (29). Dále bylo prokázáno, že

fykokyanin inhibuje pankreatickou lipázu. Tím dochází ke snížení cholesterolu a triacylglyceridů v krvi (30).

C-fykokyanin je barevný pigment strukturálně podobný bilirubinu. Má silné antioxidační (31) a protizánětlivé (32) vlastnosti, díky nimž je schopen vychytávat volné radikály. Některé studie aplikovaly jeho účinky při studiu aterosklerózy a zjistili, že C-fykokyanin má preventivní účinky na rozvoj aterosklerózy (33).

Vědci z Taiwanu publikovali výsledky studie s C-fykokyaninem. Předmětem studie bylo prokázat protizánětlivé účinky C-PC. Výsledky prokázaly, že C-PC inhibuje prozánětlivé cytokiny, produkci oxidu dusnatého (NO) a prostaglandinu E2 (PGE-2) potlačením produkce eNOS a COX-2 (34).

Mezi obsahové látky *Spiruliny platensis* patří i selen (Se), který je pro organismus velmi dobře získatelný, jelikož je vázán na organické sloučenině. Selen je důležitým esenciálním stopovým prvkem, který pomáhá při prevenci mnoha onemocnění. Jeho nedostatek v potravě může vést k mnoha chorobám a patologickým stavům jako jsou kardiovaskulární choroby, revmatoidní artritida, šedý zákal a anémie. Je také složkou mnoha selen-dependentních enzymů, jako je glutation-peroxidáza. Obsah Se ve *Spirulině platensis* není velký. Tento fakt však vzbudil zájem vědců, kteří se zaměřili na produkci *Spiruliny* s vyšším obsahem selenu. To se podařilo docílit pomocí speciálního růstového média obohaceného o selen. Vzniklá *Spirulina* obohacená o Se dává nové možnosti komerčního využití organicky vázaného selenu.

Jeromé Riss a kol. publikovali studii, která demonstruje protektivní účinky *Spiruliny* na kardiovaskulární systém. Tato studie byla provedena na křečcích, jež trpěly hypercholesterolémií. Zvířata byla krmena stravou obohacenou o *Spirulinu* a C-fykokyanin s různým obsahem Se. Plasmatický cholesterol byl nižší u skupiny, která dostávala *Spirulinu* obohacenou o selen. K ovlivnění hladin HDL-cholesterolu nedošlo. Další změny byly pozorovány také v aterosklerotických lézích v aortě. Léze se po podávání *Spiruliny* signifikantně zmenšily. Výsledky dokazují, že chronická konzumace *Spiruliny* snižuje množství oxidativních faktorů a upravuje lipidový metabolismus, čímž pomáhá při prevenci aterosklerózy (35).

Jiná studie byla provedena na tzn. New Zealand White králíčním modelu. Tato zvířata trpěla hypercholesterolémií indukovanou vysoko tukovou stravou obsahující 0.5 % cholesterolu. Suplementace *Spirulinou* prokázala zmenšení intimálních

lézí v aortě. Došlo ke snížení celkového cholesterolu, triglyceridů, LDL cholesterolu a ke zvýšení HDL-cholesterolu (36).

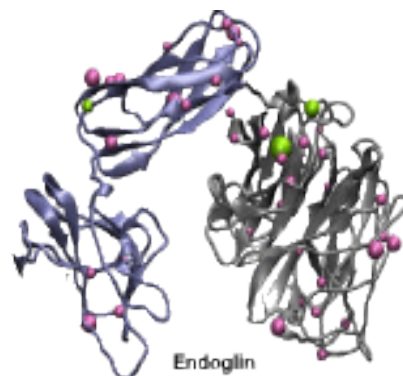
Spirulina platensis obsahuje též mukopolysacharidy (glykosaminoglykany), které se řadí mezi heteropolysacharidy. Spirulan vápenatý (Ca-SP) je specifickým polysacharidem, který byl izolován z horkého vodního extraktu Spiruliny platensis. Jedná se o sulfátový polysacharid, u kterého byla zkoumána jeho biologická aktivita. Bylo zjištěno, že Ca-SP inhibuje trombin aktivací heparinového kofaktoru II. a inhibuje proliferaci zánětlivých buněk. Tím může zpomalit proces buněčné proliferace v endotelu cév. Na základě těchto poznatků, lze říci, že Ca-SP pomáhá předcházet vzniku aterosklerózy a může také podpořit její léčení (37).

Nejnovější studie s modrozelenou řasou Spirulina platensis neprokázaly přesný mechanismus pozitivních účinků na organismus. Ten zejména spočívá v bohatosti a rozmanitosti jejich obsahových látek, které mají blahodárné účinky na zdraví člověka. Díky tomu je Spirulina platensis užívána ve formě tablet, tobolek či prášku jako potravinový doplněk pro zdraví a aktivní život (27, 35).

5 ENDOGLIN

Endoglin (označován jako molekula CD 105) je integrální membránový glykoprotein. Jeho struktura se skládá z velké extracelulární domény, hydrofobní transmembránové domény a krátké cytosolové domény viz obrázek č. 11 (38). Jedná se o vysoce glykosylovaný protein o hmotnosti 180-kDa. Endoglin se vyskytuje ve dvou isoformách, dlouhá isoforma L-endoglin a krátká isoforma S-endoglin. Obě tyto isoformy byly popsány v lidské a myší tkáni (38, 39, 40). Lidské isoformy endoglinu se liší svými cytoplasmatickými konci, které obsahují různý počet aminokyselin. L-endoglin je dominantně exprimující isoforma (41).

Obrázek 11: Modelová struktura endoglinu.



[http://www.uscnk.com/directory/Endoglin\(ENG-CD105\)-0980.htm](http://www.uscnk.com/directory/Endoglin(ENG-CD105)-0980.htm)

Strukturálně se endoglin řadí k rodině proteinů zona pellucida (ZP), jelikož obsahuje zona pellucida doménu o 260 aminokyselinových zbytků ve své extracelulární doméně. Jeho cytosolová doména je fosforylována pomocí serin a treonin kinasy a zahrnuje TGF- β receptor typu I a II. Bylo dokázáno, že fosforylace endoglinu má vliv na jeho subcelulární lokalizaci a migraci (42).

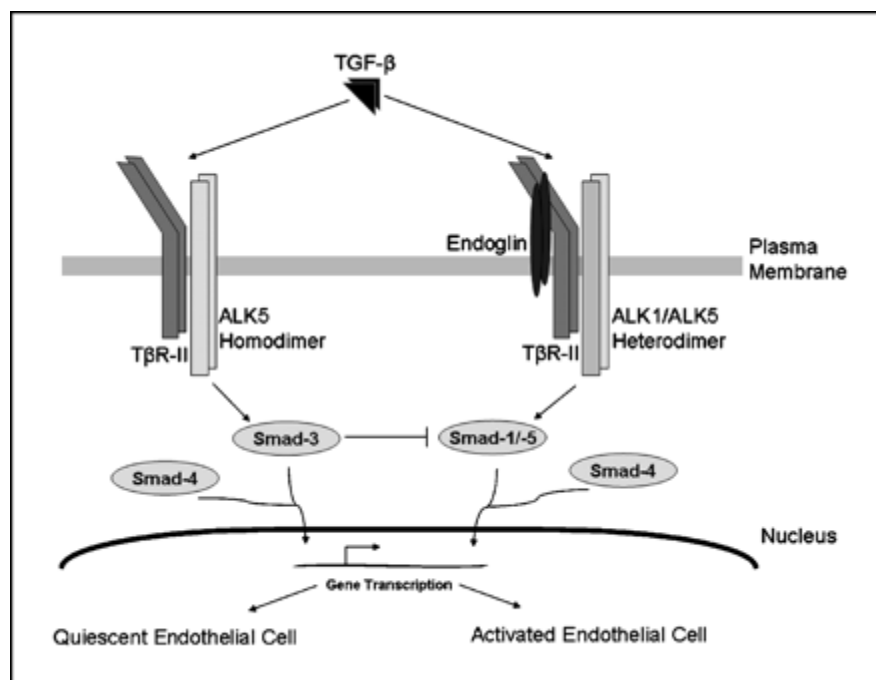
Exprese endoglinu hraje roli ve vývoji cév, angiogenezi a vaskulární homeostáze. Endoglin je slabě exprimován buňkami cévního endotelu. Oproti tomu, je jeho výrazná exprese pozorována například v průběhu aktivní angiogeneze, embryogeneze, v zánětlivé tkáni, při cévním poškození a v nádorové tkáni. Výrazná exprese byla také popsána v ischemii ledvin či srdce. Endoglin je v kardiovaskulárním systému exprimován i v řadě jiných typů buněk a jeho exprese je ovlivněna patologickými procesy (42). Výrazná exprese endoglinu je v hladkosvalových buňkách cévní stěny aterosklerotických plátů (43).

Endoglin je v souvislosti s vaskulární homeostázou spojován s onemocněním zvaným hereditární hemoragická teleangiektázie (HHT) známé též jako Oslerova-Renduova-Weberova nemoc. HHT je autozomálně-dominantně dědičné onemocnění, které postihuje 1 jedince z 8000 v celosvětové populaci (44). Rozlišujeme dvě genetické formy

HHT. HHT I. je charakterizována mutací genu pro endoglin. HHT II. je zapříčiněna jak mutací genu pro endoglin, tak mutací genu pro ALK-1. Pacienti trpící HHT mají rozšířené drobné krevní cévy (kapiláry a žilky) s méněcennou cévní stěnou. Nemoc se projevuje krvácením do sliznic různých orgánů (45, 46).

Endoglin je součástí proteinové komplexu TGF- β . TGF- β komplex zahrnuje 3 typy receptorů TGF- β 1, TGF- β 2 a endoglin. O TGF- β mluvíme jako o rodině multifunkčních cytokinů regulující extracelulární růst, diferenciaci, migraci, produkci extracelulární matrix a angiogenezi. Endoglin se v komplexu TGF- β váže na TGF- β receptor typu II. Poté dochází v jeho přítomnosti k fosforylaci ALK 1. ALK-1 aktivuje proteiny Smad-1/Smad-5 a ALK-5 fosforyluje Smad-2/Smad-3 proteiny. Při fosforylaci a indukci Smad proteinů dochází k jejich přesunu do buněčného jádra, kde nastává genová transkripce (47). Popis signalizační dráhy TGF- β vystihuje obrázek č. 12.

Obrázek 12: Signalizační dráha TGF- β (44).



Výzkum potvrdil jisté souvislosti mezi molekulou endoglinu a aterosklerózou a je předmětem dalších studií. Zvýšená exprese endoglinu byla nalezena v myších i lidských aterosklerotických plátech (48). Bylo prokázáno, že navozená hypercholesterolemie u myší zvýšila hladiny endoglinu v krvi a snížila jeho expresi v aortálních lézích. Můžeme usoudit, že inhibice endoglin - signální dráhy může být jeden z mechanismů zodpovědných za endoteliální dysfunkci. Sledování hladin endoglinu je považováno za zajímavý marker progresu aterosklerózy. Avšak přesný zdroj a role endoglinu v krvi zatím nebyla objasněna (49).

6 CÍL PRÁCE

Cílem této rigorózní práce bylo zjistit účinky *Spiruliny platensis* na expresi endoglinu a produkci kolagenu v aterosklerotických plátech na experimentálním zvířecím modelu, kterým byly APOE-deficientní myši. Dále byly sledovány parametry lipidového spektra v krvi. K hodnocení morfologických nálezů byly použity histologické, imunohistochemické a stereologické metody.

7 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

7.1 Zvířata a předepsaná dieta

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

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

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

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

7.2 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).

7.3 Histologické barvení zelený trichrom – detekce kolagenu

Barvení na kolagen – zelený trichrom – goldner

Příprava roztoku

GOLDNER I:

a) Ponceau R	1g	
Koncentrovaná kys.octová	1ml	20ml
Dest.voda	100ml	
		+
b) Oranž G	1g	
Koncentrovaná kys.octová	1ml	10ml
Dest.voda	100ml	
		+
c) Fuchsin S	1ml	
Koncentrovaná kys.octová	1ml	10ml
Dest.voda	100ml	
		+
d) Destilovaná voda		40ml
(Poznámka : Fuchsin S = rubín S)		

GOLDNER II:

1% vodní roztok kys.fosfowolframové

GOLDNER III:

Světlá zeleň	1,5g
Kys.octová ledová	2ml
Destilovaná voda	100ml

Postup:

- | | | |
|----------------------------------|-----|--------|
| 1. Destilovaná voda | | oplach |
| 2. Hematoxylin Gill + dest.voda | 1:3 | 1m |
| 3. Tekoucí voda – modráni | | 1m |
| 4. Goldner I | | 10m |
| 5. Destilovaná voda | | oplach |
| 6. Goldner II | | 10m |
| 7. Destilovaná voda | | oplach |
| 8. Goldner III | | 5m |
| 9. Destilovaná voda + kys.octová | | oplach |
| 10. 96% alkohol | | oplach |
| 11. Aceton/xylen | | 3m |
| 12. Xylen/aceton | | 3m |
| 13. Xylen | | 2m |
| 14. Xylen | | 2m |
| 15. Xylen | | 2m |
| 16. Montování sklíček | | |

Výsledek barvení:

Kolagenní vazivo	zeleně
Jádra	modře
Svalovina	cihlově červeně
Erytrocyty	oranžově
Hyalinní vazivo	červeně

7.4 Imunohistochemie

Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a v části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm na zmrazovacím mikrotomu. Řezy byly přeneseny na sklíčka, která byla předem upravena v roztoku želatiny. Řezy se nechaly oschnout (60 minut) a pak se na 15 minut vložily do roztoku acetonu uchovávaného v -20°C . Poté se řezy nechaly usušit (15 minut) a znovu se vložily na 15 minut do acetonu. Tímto procesem došlo k fixaci řezů a jejich lepší adhezi na podložní sklíčko. Dále se řezy promyly v roztoku PBS (2x5 minut). Před inkubací řezů s primární protilátkou bylo nutné ještě zablockovat nespecifická vazebná místa, proto se řezy na 30 minut ponořily do roztoku 10% goat séra v PBS (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Německo). V další fázi byly na sklíčka napipetovány roztoky anti-avidinu a anti-biotinu, které byly použity k zablokování reaktivity těchto látek v myší tkáni. Po oplachu v PBS se sklíčka 1 hodinu inkubovala s primární protilátkou Rat Anti-Mouse CD105 (endoglin) – zředění 1/100 (Pharmlingen USA) při pokojové teplotě. Po oplachu v PBS (2x5 minut) se aplikovalo 10 % zvířecí sérum v PBS (10 minut) a následně se řezy inkubovaly se sekundární protilátkou (30 minut) Goat Anti-Rat IgG (Vector Laboratories). Po inkubaci se řezy vložily do roztoku PBS (5 minut). Následovalo promytí v roztoku 3% H_2O_2 (15 minut) a promytí v PBS (2x5 minut). Dále byl na sklíčka nanesen avidin-biotinový komplex obsahující peroxidázový substrát (Vector Laboratories) (30 minut). Po oplachu v PBS (5 minut) se k vizualizaci navázaných protilátek použil diaminobenzidín (DAB substrát-chromogen roztok, DAKO, Carpinteria, USA). Na závěr byly řezy opláchnuty ve vodě a poté odvodněny v acetonu, aceton – xylenu (10:1) asi 3 minuty, aceton – xylenu (1:10) také 3 minuty, 3x v xylenu (po 2 minutách). Na závěr byla sklíčka zamontována do eukittu.

Použitá primární protilátka:

monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD105 (endoglin) – zředění 1/100 (Pharmlingen USA)

Použitá sekundární protilátka:

sekundární protilátka Goat Anti-Rat IgG (Vector Laboratories)

Pracovní postup:

1. oschnutí řezů (60 minut)
2. fixace v acetonu (-20°C; 15 minut)
3. sušení řezů (15 minut)
4. fixace v acetonu (15 minut)
5. promytí v PBS (2x5 minut)
6. aplikace 10% zvířecího séra v PBS (30 minut)
7. inkubace s avidinem D (15 minut)
8. promytí v PBS (5 minut)
9. inkubace s biotinem (15 minut)
10. promytí v PBS (oplach)
11. aplikace primární protilátky ředěné s BSA (inkubace 60 minut)
12. promytí v PBS (2x5 minut)
13. aplikace 10% zvířecího séra v PBS (15 minut)
14. aplikace sekundární protilátky (+ mouse sérum v PBS) (inkubace 30 minut)
15. promytí v PBS (5 minut)
16. promytí v 3% H₂O₂ (15 minut)
17. promytí v PBS (2x5 minut)
18. ABC komplex elite (30 minut)
19. oplach v PBS (5 minut)
20. inkubace s DAB (doba inkubace dle návodu)
21. oplach v destilované vodě
22. odvodnění řezů (aceton) (oplach)
23. odvodnění řezů (aceton-xylen 10:1) (3 minuty)
24. odvodnění řezů (aceton-xylen 1:10) (3 minuty)
25. odvodnění řezů (xylen) (3x2 minuty)
26. montování řezů do Eukittu

7.5 Kvantitativní analýza barvení kolagenu a exprese endoglinu

Plocha barvení kolagenu a exprese endoglinu byla kvantifikována pomocí stereologických metod (50). Nejprve se nakrájela série 50 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 5. řez, takže se hodnotilo pět řezů pro barvení kolagenu. Byla použita metoda bodové testovací mřížky, která se zvolila tak, abychom napočítali více než 100 průsečíků mezi body sítě a barvením kolagenu nebo expresí endoglinu na jednu cévu. Odhadovaná plocha aterosklerotické léze se vypočetla podle vzorce:

$$\text{est}A=a* P,$$

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

Fotodokumentace a digitalizace snímků z fluorescenčního mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (VitanaCorp., USA) za pomoci softwaru NIS elements verze 3.22 (LaboratoryImaging Prague, Česká republika). Stereologická analýza byla hodnocena softwarem PointGrid ELLIPSE (ViDiTo, Slovensko).

Statistická analýza

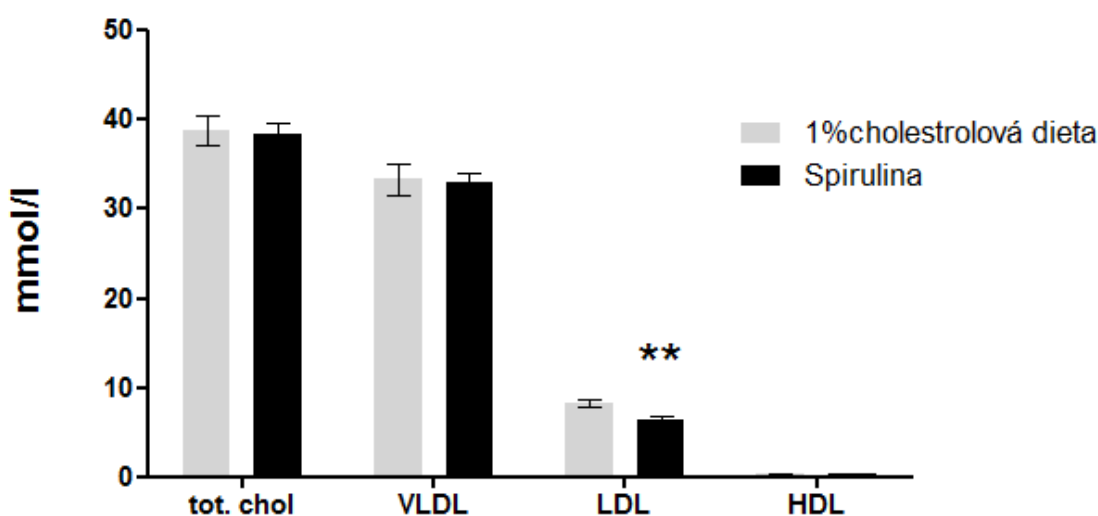
Všechny hodnoty v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba průměru) pro 8 zvířat v každé skupině. Ke vzájemnému porovnání parametrů u Spirulinové a kontrolní skupiny byl použit nepárový T test. Rozdíly mezi skupinami byly statisticky významné v případě, že $p \leq \alpha$, kde $\alpha=0,05$.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

8 VÝSLEDKY

8.1 Biochemická analýza

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

Graf 1: Lipidový profil u myši kontrolních a myši krměných Spirulinou platensis.

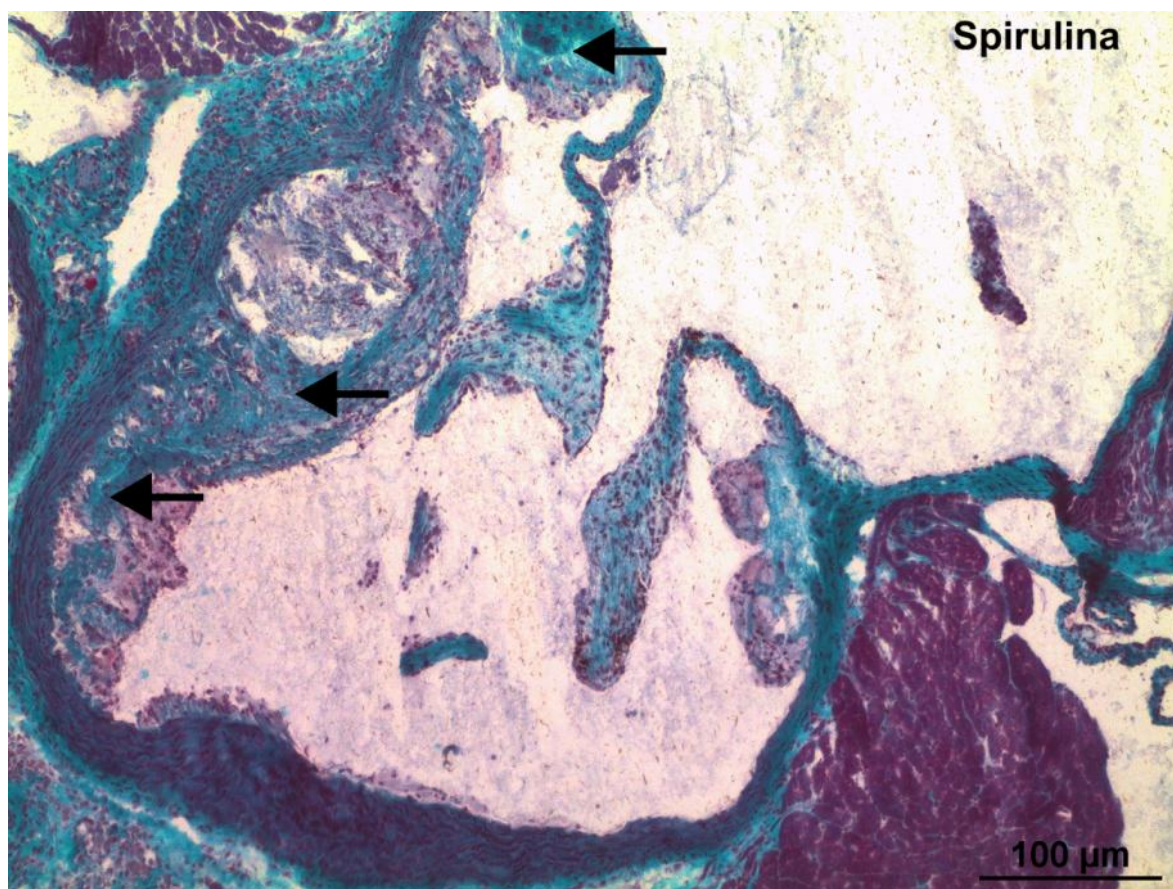
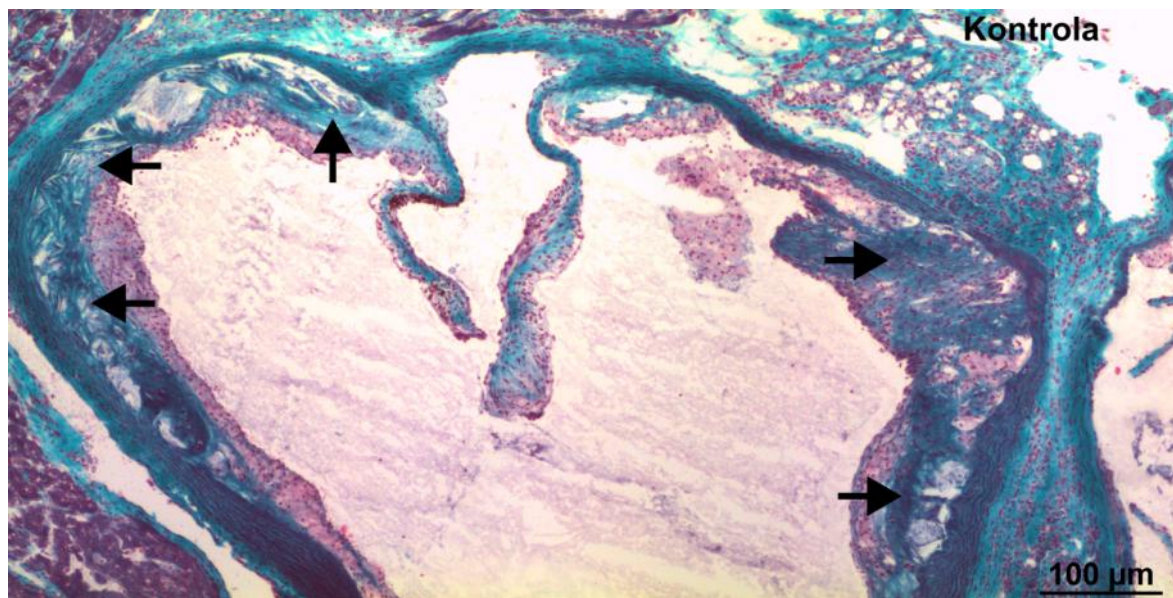


Osmítýdenní podávání Spiruliny nevedlo ke statisticky významnému poklesu hladin celkového cholesterolu. Snížena byla pouze hladina LDL cholesterolu po podávání Spiruliny (* $P \leq 0,01$).

8.2 Histologické barvení zeleným trichromem

U všech řezů v kontrolní i Spirulinou léčené skupině byla pozorována přítomnost aterosklerotických lézí (obr. 13, 14). Léze byly největší v oblasti aortálního sinu, ale pokračovaly také v oblasti aortálního oblouku. Aterosklerotické léze byly výrazně vyvinuty, přičemž u řady z nich byla již nalezena ateromová nekrotická jádra. Léze obsahovaly velké množství kolagenu (zelená barva), který byl přítomen také v medii cév. Podávání Spiruliny nevedlo k patrnému snížení plochy obarvené zeleným trichromem (obr. 14).

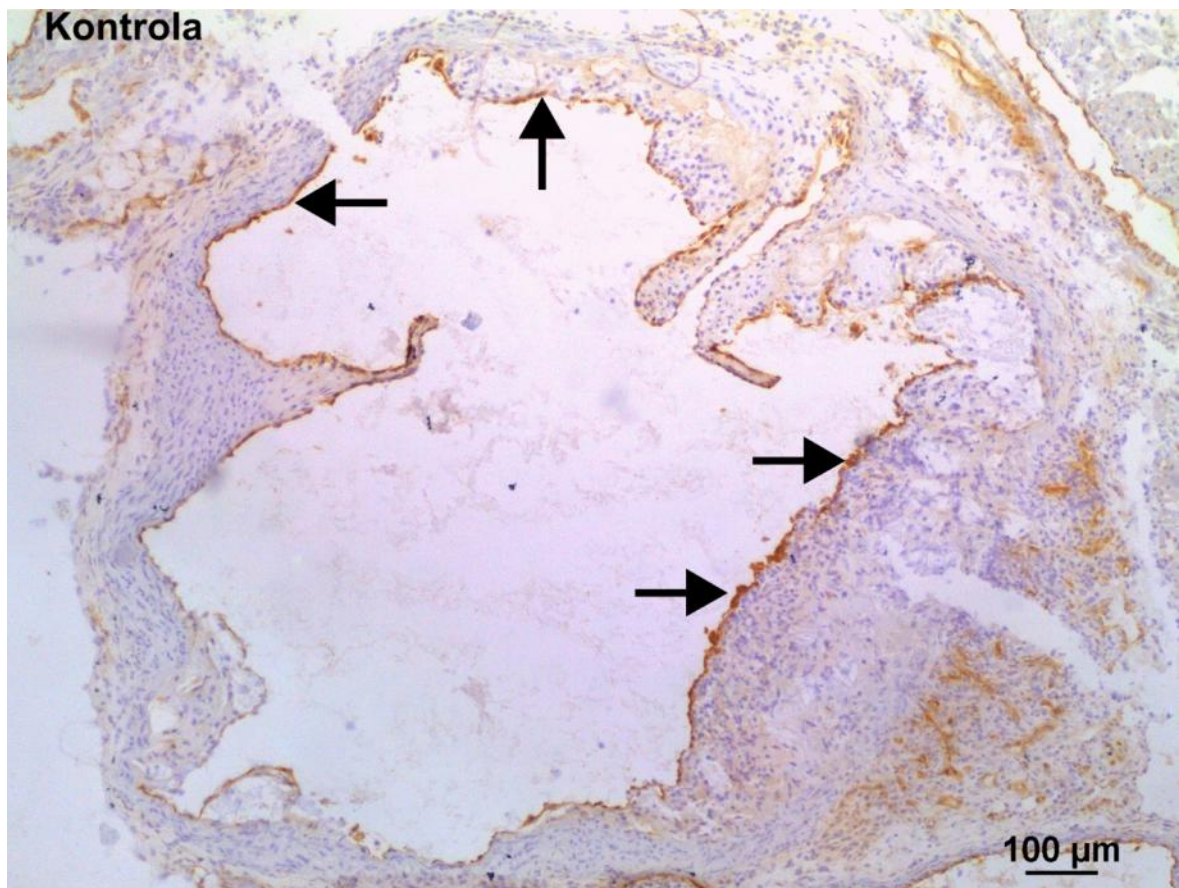
Obrázek 13, 14: Reprezentativní obrázky barvení zeleným trichromem u kontrolní skupiny a skupiny zvířat krmené Spirulinou. Šipky ukazují na přítomnost kolagenu v aterosklerotických lézích. Uprostřed cévy jsou vidět zbytky semilunárních chlopní. Obrázky neukazují rozdíl v intenzitě barvení mezi skupinami.



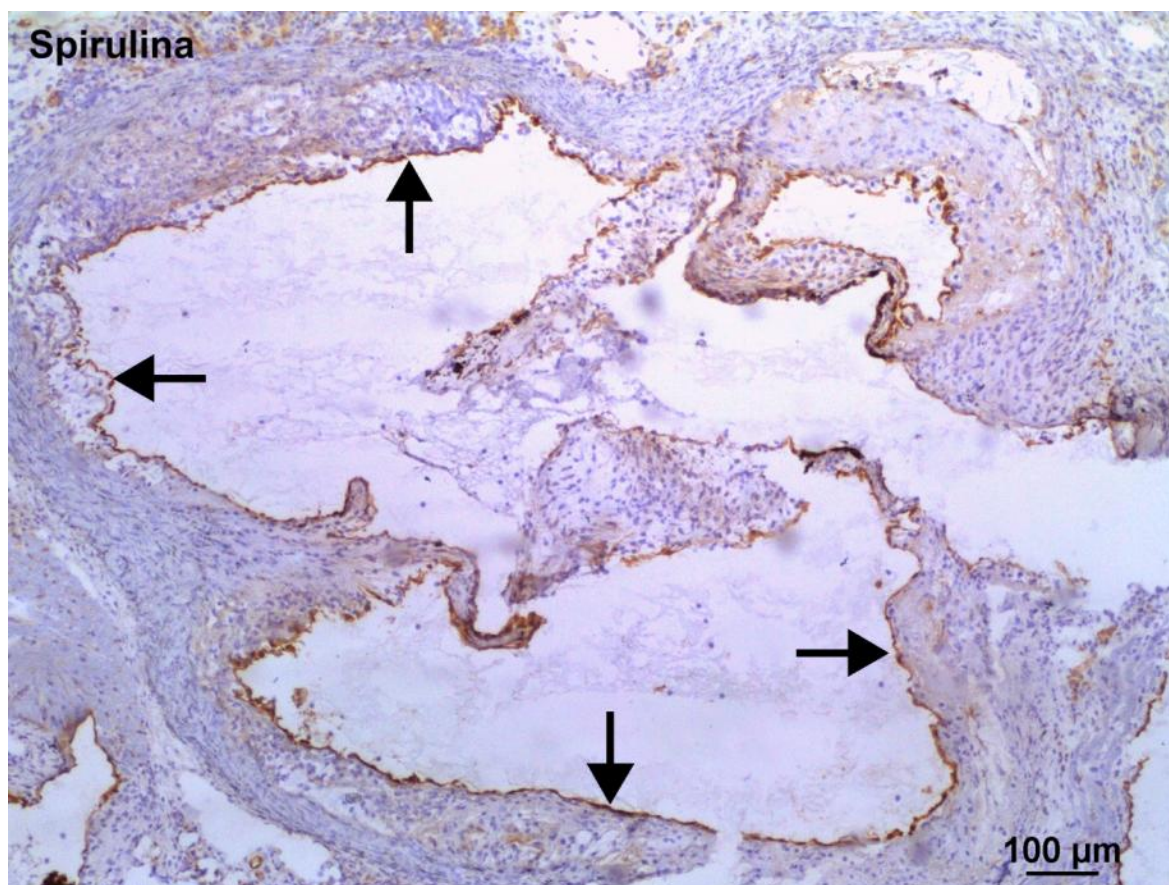
8.3 Imunohistochemické barvení endoglinu v oblasti aortálního sinu

Expres endoglinu byla pozorována u všech myší v experimentu. Expres byla pozorována téměř výlučně na cévním endotelu plátu, chlopní i mimo plát. Po prohlédnutí 40 řezů z každé skupiny, jsme nepozorovali významné rozdíly v barvení mezi oběma skupinami (obr. 15, 16).

Obrázek 15: *Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení endoglinu u kontrolní skupiny zvířat. Silná exprese je pozorována na cévním endotelu v oblasti kořene aorty (šipky).*



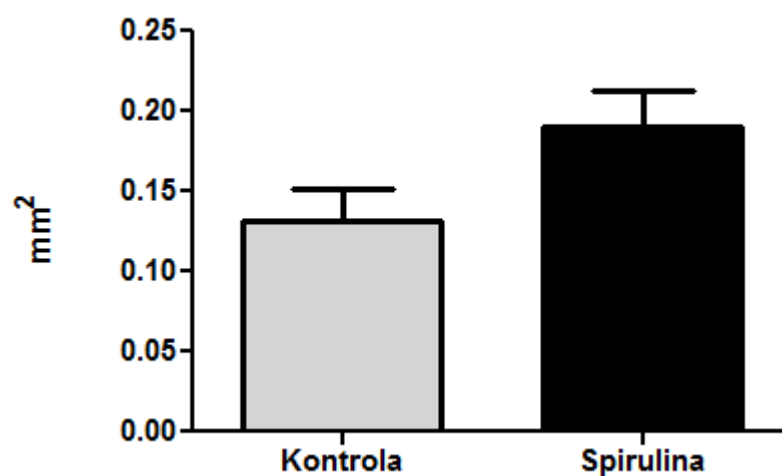
Obrázek 16: Reprezentativní obrázek imunohistochemického barvení endoglinu u zvířat, kterým byla podávána Spirulina. I zde je pozorována silná exprese na cévním endotelu v oblasti kořene aorty (šipky).



8.4 Kvantitativní analýza barvení kolagenu

Ke kvantifikaci byly použity stereologické metody. V každé skupině zvířat bylo hodnoceno pomocí bodové testovací mřížky 40 řezů. Výsledky neprokázaly vliv Spiruliny na množství kolagenu v aterosklerotických plátech $0,13 \pm 0,01$ ver. $0,19 \pm 0,02$ mm². Podávání Spiruliny signifikantně neovlivnilo plochu barvení kolagenu.

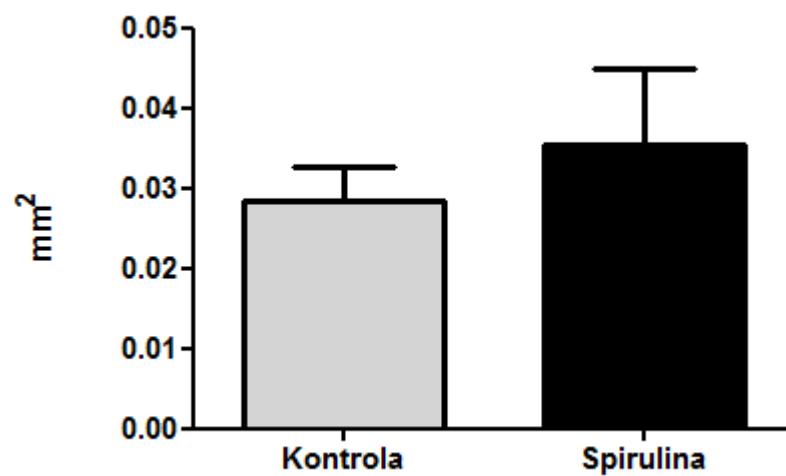
Graf 2: Kvantitativní analýza množství kolagenu v plátu.



8.5 Kvantitativní analýza exprese endoglinu

Ke kvantifikaci byly použity stereologické metody. V každé skupině zvířat bylo hodnoceno pomocí bodové testovací mřížky 40 řezů. Výsledky neprokázaly vliv Spiruliny na expresi endoglinu ve srovnání s kontrolní skupinou $0,02 \pm 0,01$ ver. $0,03 \pm 0,02$ mm^2 . Podávání Spiruliny signifikantně neovlivnilo expresi endoglinu v aortě.

Graf 3: Kvantitativní analýza exprese endoglinu.



9 DISKUZE

Ateroskleróza je difúzní proces, který začíná v časném dětství, postupně asymptomaticky progreduje a v dospělosti se klinicky manifestuje jako ICHS, ischemické poškození centrálního nervového systému a periferní cirkulace (51). Ateroskleróza je velmi rozšířené onemocnění, charakterizované chronickými zánětlivými změnami, postihující všechny věkové skupiny obyvatelstva. Klinické příznaky aterosklerózy se objevují až v pozdějších letech života a v současné době je ateroskleróza příčinou téměř 50 % všech úmrtí. Rozsáhlý výzkum v této oblasti odhalil řadu nových poznatků, přispívajících k pochopení dějů, ke kterým dochází během aterogenního procesu.

V současné době se k ovlivnění aterosklerózy používá řada substancí včetně těch, které jsou získávány přímo v přírodě.

Proto se tato diplomová práce také zaměřila na studium potenciálních účinků *Spiruliny platensis*, na aterogenezi u APOE-deficitního kmene myší. Hlavní důraz byl kladen na sledování exprese endoglinu a na množství kolagenu v aterosklerotických plátech.

Spirulina je volně plovoucí vláknitá řasa rostoucí v alkalických vodách. Díky své vysoké nutriční hodnotě se po staletí využívá jako potrava, a to zejména ve střední Africe. Dnes je užívána jako doplněk stravy po celém světě, což vzbuzuje velkou pozornost. Realizují se velké studie na hodnocení léčivých účinků *Spiruliny*. Tento výzkum se ubírá do mnoha oborů medicíny. Provádí se na celé řadě onemocnění včetně hypercholesterolemie, triglyceridémie, kardiovaskulárních onemocnění, zánětlivých chorob, rakoviny a virových infekcí. *Spirulina* má blahodárné účinky na kardiovaskulární systém v důsledku jejích hypolipidemických, antioxidačních a protizánětlivých účinků (52).

TGF- β 1 a endoglinová signální kaskáda hraje důležitou roli v procesu aterogeneze. Poslední data ukazují na možný protektivní vliv této kaskády v ateroskleróze v experimentech a také ukazují na možnosti sledování těchto markerů u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním (53). TGF- β 1 vykonává své účinky prostřednictvím receptorů, které se označují TGF- β RI, TGF- β RII. Kromě těchto dvou receptorů existuje také „pomocný“ TGF- β RIII, který se také nazývá endoglin (CD105) (54). V současnosti existuje celá řada prací popisující význam endoglinu v procesu aterogeneze (54). Dále byla

jeho úloha prokázána v hypertenzi a diabetes mellitus (55). Velmi recentní práce navíc naznačují, že endoglin by mohl být dobrým markerem účinnosti terapie statinů (56) a případně změn hladin cholesterolu (49). My jsme v této rigorózní práci chtěli objasnit, zda podávání potenciálně hypolipidemické substance (Spiruliny) povede ke změnám exprese endoglinu a případně ke změnám v morfologii plátu reprezentované množstvím kolagenu.

Podávání Spiruliny překvapivě vedlo pouze k poklesu hladin LDL cholesterolu. Celkový cholesterol ani další frakce změněny nebyly. Tento slabý hypolipidemický efekt lze přisuzovat nižší dávce Spiruliny, která byla v této pilotní studii zvolena. Přesto jsme v další fázi provedli imunohistochemickou a stereologickou analýzu exprese endoglinu. Výsledky této analýzy neukazovaly změny exprese endoglinu po podávání Spiruliny. Tyto výsledky byly později potvrzeny Western blot analýzou (Stráský, nepublikované výsledky). Tento výsledek je tedy zřejmě odrazem slabého efektu Spiruliny na hladiny cholesterolu, protože předchozí práce jasně ukázaly, že snižování hladin cholesterolu mění expresi endoglinu (49). Řada studií dále prokázala pozitivní vliv endoglinu na expresi eNOS (57) a množství kolagenu a stabilitu aterosklerotických plátů (58). Z tohoto důvodu jsme také sledovali akumulaci kolagenu v plátech. Ani zde ovšem nedošlo k ovlivnění množství kolagenu v plátech po podávání Spiruliny.

Výsledky této rigorózní práce tedy ukazují slabé hypolipidemické účinky Spiruliny platensis a zároveň žádný efekt na expresi endoglinu, či stabilitu aterosklerotických plátů. V dalších studiích musí být zjevně testovány vyšší dávky, které by mohly ukázat na benefit podávání Spiruliny v procesu aterogeneze.

10 ZÁVĚR

Cílem této rigorózní práce bylo zjistit účinky *Spiruliny platensis* na expresi endoglinu a produkci kolagenu v aterosklerotických plátech na experimentálním zvířecím modelu, kterým byly APOE-deficitní myši. K tomu byly sledovány parametry lipidového spektra v krvi, barvení na kolagen a exprese endoglinu v plátu.

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

Výsledky histologické analýzy barvení na kolagen neprokázaly změny množství kolagenu v aterosklerotických plátech po podávání *Spiruliny*.

Výsledky imunohistochemické analýzy neprokázaly změny exprese endoglinu u myši, kterým byla podávána *Spirulina platensis*.

Výsledky kvantitativní analýzy barvení na kolagen a exprese endoglinu neprokázaly vliv *Spiruliny* na množství kolagenu a expresi endoglinu.

Výsledky této rigorózní práce tedy ukazují slabé hypolipidemické účinky *Spiruliny platensis* a zároveň žádný efekt na expresi endoglinu, či stabilitu aterosklerotických plátů.

11 SEZNAM ZKRATEK

ABC	avidin – biotin komplex
ACE	angiotenzin konvertující enzym
AH	arteriální hypertenze
ALK1	activin receptor-like kinase 1
ALK5	activin receptor-like kinase 2
APO B	apolipoprotein B
APO E	apolipoprotein E
APOE-KO	apolipoprotein E deficitní myši model
BSA	bovinní sérový albumin
ca	karcinom
Ca-SP	spirulan vápenatý
CD 105	endoglin
CMP	cévní mozková příhoda
COX 2	cyklooxygenáza 2
C-PC	C-fykokyanin
DAB	diamonobenzidín
DLP	dyslipidémie
eNOS	endoteliální NO syntáza
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoproteins)
HHT	hereditární hemoragická teleangiektázie
ICAM-1	mezibuněčné adhezní molekuly-1 (inter-cellular adhesion molecules)
IgG	imunoglobulin G
ICHDK	ischemická choroba dolních končetin
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-1 β	interleukin-1 β
KVO	kardiovaskulární onemocnění
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins)
LDLR-KO	LDL-receptor deficitní myši model
MCP-1	monocytární chemotaktický protein - 1

M-CSF	faktor stimulující makrofágy (macrophage-colony stimulating factor)
MS	metabolický syndrom
NCPM	náhlá cévní mozková příhoda
NO	oxid dusnatý (nitric oxide)
OTC medium	zmrazovací médium
PBS	fosfátový pufr
PDGF	od destiček odvozený růstový faktor (platelet derived growth factor)
PGE 2	prostaglandin 2
RA	rodinná anamnéza
Se	selen
SEM	střední chyba průměru
Smad	protein regulující funkci TGF- β , fungující jako transkripční faktor
STK	systolický krevní tlak
TGF- β	transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α (tumor necrosis factor α)
TRF- β RI-III	receptory typu I-III pro TGF- β
VCAM-1	cévní adhezní molekula-1 (vascular cell adhesion molekule-1)
VEGF	endoteliální růstový faktor cév (vascular endothelial growth factor)
VLDL	lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (very low density lipoproteins)
VSMCs	buňky hladké svaloviny cév (vascular smooth muscle cells)
WHO	světová zdravotnická organizace (Word Health Organisation)

12 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Hradec J. a Býma S., *Doporučené postupy pro praktické lékaře – Prevence kardiovaskulárních onemocnění*, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2009, [s. 1], ISBN: 978-80-86998-32-9.
2. J. Hradec a S. Býma, *Doporučené postupy pro praktické lékaře - ICHS*, Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2007, [s. 1-3], ISBN: 80-86998-14-2.
3. Jiří Vlček, Daniela Fialová a kol., *Klinická farmacie I*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2010, [s. 108-125], ISBN: 978-80-247-3169-8.
4. Miloš Štejfa, *Kardiologie*, 3. vydání, Grada Publishing a.s., 2007, [s. 163-476], ISBN: 978-80-247-1385-4.
5. Ústav zdravotnických informací a statistiky Ministerstva zdravotnictví České Republiky, *Zdravotnická ročenka České Republiky 2004*, Praha 2005.
6. R. Rubin, D. S. Strayer et al., *Rubin's Pathology*, 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2008, [s. 73-114] ISBN: 978-07817-9516-6.
7. Ross R, Harker L., Hyperlipidemia and atherosclerosis, *Science* 1976, p. 1094-1100.
8. M. Vrablík, M Janotová a kol., Endoteliální dysfunkce – první stádium aterosklerózy, *Medicína pro praxi* 2011, 8(3): p. 119-122.
9. Fruchart JC, *Handbook of dyslipidemia and atherosclerosis*. Elsevier Science Limited, 2002.
10. M. Kalousová a kol., *Patobiochemie ve schématech*, Grada Publishing a.s., 2006, [s. 163-476], ISBN: 978-80-247-152-23.
11. Nejedlá M., *Interní ošetřovatelství*, Grada Publishing a.s., 2006, 1. Vydání, [s. 97-141], ISBN: 978-80-247-1148-6.
12. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91: p. 2844-2850.
13. Weissberg PL. Atherogenesis: current understanding of the cause of atheroma. *Heart*. 2000;83 (2): p. 247-252.

14. J. Mačák, J. Mačáková, *Patologie*, 1. Vydání, Grada Publishing a.s., 2004, [s. 171, 172], ISBN: 80-247-0785-3.
15. Vojáček J. Malý M. a kol. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*, 1. vydání, Grada Publishing a.s., 2004, [s. 33-43], ISBN: 80-247-0501-X.
16. A. Dauherty, Mouse Modelsof Atherosclerosis, *The American Journal of the Medical Sciences* 2002: 323 (1): p. 3-10.
17. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis. I., Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981;103: p. 181–90.
18. Paigen B, Holmes PA, Mitchell D, et al. Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. *Atherosclerosis* 1987;64: p. 215–21.
19. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setela K *et al.* Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E - deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; 71: p. 343-353.
20. Purcell-Huynh DA, Farese RV, et al. Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high-fat diet. *J Clin Invest* 1995; 95: p. 2246 –57.
21. 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; 92: p. 883-893.
22. Ishibashi S, Herz J, Maeda N, Goldstein JL, Brown MS. The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in "knockout" mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: p. 4431-4435.
23. Jawień J. Nastalek P. Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *Journal of physiology and pharmacology* 2004, 55, 3, p. 503-517.
24. Witting PK, Pettersson K, Ostlund-Lindqvist AM, Westerlund C, Eriksson AW, Stocker R. Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxydation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *FASEB J*, 1999; 13: p. 667-675.

25. Mišurcová, L. *Nové nutriční aspekty a využití mořských a sladkovodních řas ve výživě člověka*. Disertační práce, UTB, FT, 2008.
26. <http://www.naturalways.com/spirul1.htm> (11.7.2011)
27. <http://www.spirulina-mr.com> (11.7.2011)
28. Patricia V Torres-Duran et al., Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of mexican population: a preliminary report, *Lipids in Health and Disease* 2007, 6: p. 33.
29. Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H, Shibayama F, Morikawa K, Kanamaru Y, Otsuka A, Hirashi T, Kato T: A novel protein C-phycoyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J Nutr* 2005, 135: p. 2425-2430.
30. Li-Kun H, Dong-Xia L, Lan X, Xiao-Jie G, Yasumasa K, Isao S, Hiromichi O: Isolation of pancreatic lipase activity-inhibitory component of *Spirulina platensis* and it reduce postprandial triacylglycerolemia. *Yakugaku Zasshi* 2006, 126: p. 43-49.
31. Bhat, V. B.; Madyastha, K. M., C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 275 (1), p. 20-25.
32. Reddy, C. M.; Bhat, V. B.; Kiranmai, G.; Reddy, M. N.; Reddanna, P.; Madyastha, K. M. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 277 (3), p. 599-603.
33. Stocker, R.; McDonagh, A. F.; Glazer, A. N.; Ames, B. N. Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin. *Methods Enzymol.* 1990, 186, p. 301–309.
34. Cheong SH, Kim MY et al., *Spirulina* prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2010; 56 (1): p. 34-40.
35. Jérôme Riss et al., Phycobiliprotein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* Is Powerfully Responsible for Reducing Oxidative Stress and NADPH Oxidase Expression Induced by an Atherogenic Diet in Hamsters, *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, p. 7962–7967.

36. Sun Hee Gheong et al., Spirulina prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbit fed a high cholesterol diet, *J Nutr Sci Vitaminol*, 2010, 56, p. 34-40.
37. Toshiyuki Kaji et al., Repair of wounded monolayers of cultured bovine aortic endothelial cells is inhibited by calcium spirulan, a novel sulfated polysaccharide isolated from *Spirulina platensis*, *Life Sciences* Vol. 70, 16, 2002, p. 1841-1848.
38. Gougos A, Letarte M. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 1990, 265: p. 8361 – 8364.
39. Bellon T, Corbi A, Lastres P, Cales C, Cebrián M, Vera S, Cheifetz S, Massague J, Letarte M, Bernabeu C. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 23: 1993: p. 2340 –2345.
40. Pérez-Gómez E, Eleno N, López-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M, Bernabéu C, Quintanilla M. Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* 24: 2005: p. 4450 - 4461.
41. Gougos A, Letarte M. Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 141: 1988: p. 1934 –1940.
42. José M. López-Novoa and Carmelo Bernabeu, The physiological role of endoglin in the cardiovascular system, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: 2010: p. 959-974.
43. Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C, Vary CP. Endoglin, a TGF-receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 153: 2000: p. 323–335.
44. Nikolaos A. Dallas et al., Endoglin (CD105): A Marker of Tumor Vasculature and Potential Target for Therapy, *Clin Cancer Res* 2008: 14: p. 1931 – 1937.
45. Rius C, Smith JD, Almendro N, et al. Cloning of the promoter region of human endoglin, the target gene for hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Blood* 1998; 92: p. 4677-90.
46. Martin Vokurka, Jan Hugo a kol., *Velký lékařský slovník*, 6. vydání, Maxdorf, 2006, [s. 667], ISBN: 80-7345-105-0.

47. ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGF- β signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biochem*. 2007; 8: p. 857-869.
48. N. Pospisilova, V. Semecky, G. Jamborova, K. Pospechova, D. Solichova, C. Andrys, P. Zdansky and P. Nachtigal, Endoglin expression in hypercholesterolemia and after atorvastatin treatment in apoE-deficient mice. *J Pharm Pharmaceut Sci* 9 (3): 2006, p. 388-397.
49. Strasky Z, Vecerova L, Rathouska J, Cholesterol Effects on Endoglin and Its Downstream Pathways in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *Circ J*. 2011 Jun 24;75(7): p. 1747-55.
50. Nachtigal P., Semecky V., Kopecky M., Gojova A., Solichova D., Zdansky P. and Zadak Z. (2004) Application of stereological methods for the quantification of VCAM-1 and ICAM-1 expression in early stages of rabbit atherogenesis. *Pathol Res Pract* 200, p. 219-229.
51. Bjorkbacka H. (2008) Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 19, p. 548-549.
52. Deng R. and Chow T. J. (2010) Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae Spirulina. *Cardiovasc Ther* 28, p. 33-45.
53. Goumans M. J., Liu Z. and ten Dijke P. (2009) TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* 19, p. 116-127.
54. Lopez-Novoa J. M. and Bernabeu C. (2010) The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, p. 959-974.
55. Blazquez-Medela A. M., Garcia-Ortiz L., Gomez-Marcos M. A., Recio-Rodriguez J. I., Sanchez-Rodriguez A., Lopez-Novoa J. M. and Martinez-Salgado C. (2010) Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* 8, p. 86.
56. Rathouska J., Vecerova L., Strasky Z., Slanarova M., Brackova E., Mullerova Z., Andrys C., Micuda S. and Nachtigal P. (2011) Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacol Res* 64, p. 53-59.
57. Santibanez J. F., Letamendia A., Perez-Barriocanal F., Silvestri C., Saura M., Vary C. P., Lopez-Novoa J. M., Attisano L. and Bernabeu C. (2007) Endoglin increases eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol* 2010, p. 456-468.

58. Bot P. T., Hoefler I. E., Sluijter J. P., van Vliet P., Smits A. M., Lebrin F., Moll F., de Vries J. P., Doevendans P., Piek J. J., Pasterkamp G. and Goumans M. J. (2009) Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques. *Stroke* 40, p. 439-447.