UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FAKULTA TĚLESNÉ VÝCHOVY A SPORTU

REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU A JEJICH NEUROFYZIOLOGICKÁ ÚLOHA

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:
Doc. MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D.

Vypracovala:
Pavlína Šedivcová

Praha, září 2012

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného ani stejného akademického titulu.

V Praze, dne

……

podpis diplomanta

Evidenční list

Souhlasím se zapůjčením své diplomové práce ke studijním účelům. Uživatel svým podpisem stvrzuje, že tuto diplomovou práci použil ke studiu a prohlašuje, že ji uvede mezi použitými prameny.

Jméno a příjmení:	Fakulta / katedra:	Datum vypůjčení:	Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu diplomové práce Doc. MUDr. Jakubovi Otáhalovi, Ph.D. za odborné vedení práce, za poskytnutí cenných rad a poznatků a za spolupráci při vyhodnocování výsledků experimentů. Ráda bych též poděkovala Mgr. Carole Brožíčkové za poskytnutí veškerých materiálů k experimentům. Oběma děkuji za trpělivost, kterou se mnou měli.

ABSTRAKT

Název práce

Reaktivní formy kyslíku a jejich neurofyziologická úloha

Cíl práce

V teoretické části diplomové práce přinést přehled o volných kyslíkových radikálech a ukázat jejich místo v organismu – účinky pozitivní a pro organismus nezbytné na jedné straně a zdroj závažných onemocnění na straně druhé. Dále se teoretická část zabývá problematikou obnovy rovnováhy mezi tvorbou volných radikálů a antioxidační ochranou organismu. Teoretická část se též zabývá látkou FeTTPS.

Experimentální část práce si stanovuje za cíl zjistit, zda aplikace FeTTPS ovlivňuje průtok krve mozkem při transcallosální stimulaci se vzrůstající frekvencí. Dále zjistit, zda aplikace této látky má vliv na sklon křivky a práh dráždivosti evokovaných potenciálů a na počet a dobu trvání následných výbojů (afterdischargů).

Metoda řešení

Výzkum probíhal v prostorách Fyziologického ústavu AV ČR. Experimenty byly prováděny na laboratorních albínských potkanech kmene Wistar. Potkanům byla provedena celková anestezie a do oblasti senzomotorické kůry byly epidurálně implantovány stimulační a snímací elektrody. Dále sonda Laser Doppler průtokoměru implantována na kontralaterální hemisféru.

Do první části experimentu bylo zařazeno 11 zvířat. Měřili a zjišťovali jsme vliv transcallosální stimulace na průtok krve mozkem před a po aplikaci FeTTPS.

Do druhé části experimentu bylo zařazeno 23 zvířat. Skupina obsahovala vzorek experimentální (aplikace FeTTPS) a kontrolní (aplikace fyziologického roztoku). Porovnávali jsme sklon křivky a práh dráždivosti evokovaných potenciálů a počet a dobu trvání následných výbojů (afterdischargů) před aplikací fyziologického roztoku a FeTTPS, 30 a 180 minut po aplikaci.

Výsledky

Při transcallosální stimulaci se zvyšující se frekvencí (3, 5, 10, 15Hz) dochází ke zvýšení průtoku krve mozkem. Rozdíl hodnot v průtoku krve mozkem před a po aplikaci FeTTPS není signifikantně významný.

Rozdíl hodnot prahu dráždivosti a sklonu křivky před a po aplikaci FeTTPS a fyziologického roztoku není signifikantně významný.

U experimentální skupiny se počet a doba trvání následných výbojů před a po aplikaci FeTTPS nemění. U kontrolní skupiny se počet a doba trvání následných výbojů před a po aplikaci fyziologického roztoku zvětšuje.

Závěr

Výsledná data ukazují, že aplikace FeTTPS snižuje počet a dobu trvání následných výbojů ve srovnání s aplikací fyziologického roztoku.

Klíčová slova

FeTTPS – evokované potenciály – průtok krve mozkem – následné výboje (afterdischargers) - antioxidanty

ABSTRACT

Name of the thesis

Reactive oxygen species and their neurophysiological role

Aim of the thesis

Aim of the theoretical part is to provide overview of reactive oxygen species (ROS) and show their place in organism – posstive and necessary effects for the organism on the one hand and source of serious diseases on the other hand. Futhermore, the theoretical part deals with the restoration balance between the production of free radicals and antioxidants protection. Theoretical part also deals with substance FeTTPS.

Aim of the experimental part is to determinate whether the application of FeTTPS affects cerebral blood flow during trancallosal stimulation with increasing frequency. Futhermore, to determinate whether the applicatication of this substance affects the slope of the curve and threshold of evoked potencials and number and duration of afterdischargers.

Research method

The research took place at the premises of Onstitue of Physiology, Academy of Sciences, Czech Republic. Experiments were carried out on laboratory albine Wistar rats. General anesthesia was performed to rats, stimulating and sensing electrodes were implated in epidural area of sensorimotoor cortex and Laser Doppler flow probe was implated into the contralateral hemisphere.

In the first part of experiment included 11 animals. We measured and investigated the influence of transcallosal stimulation on cerebral blood flow before and after application of FeTTPS. We compared the slope of the curve and threshold of evoked potentials and the number and duration of afterdischargers.

Results

Transcallosal stimulation with increasing frequency (3, 5, 10, 15Hz) increases cerebral blood flow. Difference in cerebral blood flow before and after application of FeTTPS is not statistically significant.

Differrence of threshold and slope of the curve of evoked potentials before and after application FeTTPS a salin eis not statistically significant.

Duration and number of afterdischarges of experimental group are same before and after application FeTTPS. Duration and number of artedischarges of control group increase before, 30 and 180 minutes after application FeTTPS.

Conclusion

Resulting data show that application FeTTPS reduces duration and number of afterdischarges compared with application of saline.

Key words

FeTTPS – evoked potentials – cerebral blood flow – afterdischargers - antioxidants

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....12
1 ÚVOD.....14
2 TEORETICKÁ ČÁST.....15
2.1 Co jsou to ROS.....15
2.2 Co patří mezi ROS.....15
2.2.1 Superoxid.....16
2.2.2 Peroxid vodíku.....17
2.2.3 Hydroxylový radikál.....17
2.3 Vznik ROS.....18
2.3.1 Neenzymové reakce.....19
2.3.2 Enzymové reakce.....19
2.4 Fyziologické účinky ROS.....20
2.4.1 Fagocytóza.....20
2.4.2 Signální molekuly.....21
2.5 Patologické účinky ROS.....21
2.5.1 Oxidační poškození lipidů = lipoperoxidace.....21
2.5.2 Oxidační poškození bílkovin a enzymů.....23
2.5.3 Poškození DNA.....23
2.5.4 Apoptóza.....23
2.5.5 Stárnutí – volně radikálová teorie stárnutí.....23
2.5.6 Reperfuzní poškození.....24
2.6 Ochrana před ROS – antioxidační systém.....25
2.6.1 Enzymové antioxidační systémy.....26
2.6.1.1 Superoxiddismutáza.....26
2.6.1.1.1 Cu, Zn-SOD (SOD1).....27
2.6.1.1.2 Mn-SOD (SOD2) a FeSOD.....27
2.6.1.2 Glutathionperoxidázy.....28
2.6.1.3 Glutathiontransferázy.....29
2.6.1.4 Kataláza.....29
2.6.1.5 Souhra antioxidačních systémů.....29
2.6.2 Neenzymové antioxidační systémy.....30
2.6.2.1 Transferin, feritin.....30

2.6.2.2 Ceruloplazmin, albumin……..31
2.6.2.3 Vitamin C (kyselina askorbová)……..31
2.6.2.4 Vitamin E (tokoferol)……..32
2.6.2.5 Beta – karoten a jiné karotenoidy……32
2.6.2.6 Ubichinon/ubichinol (koenzym Q)……..34
2.6.2.7 Melatonin……36
2.6.2.8 Flavonoidy……...37
2.6.2.9 Kyselina močová……37
2.6.2.10 Kyselina lipoová……..39
2.7 Reaktivní formy dusíku……..39
2.7.1 Oxid dusnatý……39
2.7.2 Petoxynitrit……41
2.8 FeTTPS……42
3 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY……43
3.1 Cíl práce……...43
3.2 Výzkumné otázky a stanovené hypotézy……...43
3.2.1 Výzkumné otázky……..43
3.2.2 Hypotézy……43
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST……44
4.1 Metodika a postup řešení……44
4.1.1 Metodologický princip……..44
4.1.2 Sledovaný soubor……..44
4.1.3 Chirurgická příprava sledovaného souboru……...44
4.1.4 Provedení experimentu……..45
4.1.5 Záznam a zpracování dat……...45
5 VÝSLEDKY……...47
5.1 Vliv aplikace transcallosální stimulace senzomotorické kůry se zvyšující se frekvencí na průtok krve mozkem před a po aplikaci FeTTPS……47
5.2 Vliv aplikace FeTTPS na sklon křivky a práh dráždivosti evokovaných potenciálů a počet a dobu trvání následných výbojů……51
6 DISKUZE……...56
7 ZÁVĚR……...59
SEZNAM LITERATURY……60
SEZNAM TABULEK……65

SEZNAM OBRÁZKŮ……...66
SEZNAM GRAFŮ…….67

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

7-NI – 7-nitroindazol

AD – následné výboje (afterdischargers)

AIDS – syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immunodeficiency Syndrome)

AO – antioxidanty

ATP – adenosintrifosfát

AVČR – Akademie věd České republiky

CBF – průtok krve mozkem (cerebral blood flow)

Cl^- - chlorid

CO_2 - oxid uhličitý

CoQ – koenzym Q

e^- - elektron

EEG - elektroencefalografie

EP – evokované potenciály

Fe^{2+} - ion železnatý

Fe^{3+} - ion železitý

FeTTPS – peroxynitrit decomposition catalyst

GC – guanylátcykláza

GSH – glutathin redukovaný

GSHPx – glutathion peroxidáza

GSNO - nitrosothiol

GSSG – glutathion oxidovaný

GST – glutathiontransferáza

Hb – hemoglobin

HClO – kyselina chlorná

H_2O - voda

H_2O_2 – peroxid vodíku

$HO_2^{\bullet}$ - hydroperoxyl

LDL – low density lipoprotein

LDF – Laser Doppler průtokoměr

MDA – malondialdehyd $HOC\text{-}CH_2\text{-}COH$

$NADP^+$ - nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

NADPH – redukovaná forma $NADP^+$

NADPH oxidáza – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát oxidáza

NO^+ - nitrosyl

$NO^\bullet$ - oxid dusnatý (nitric oxide)

$NO_2^\bullet$ - oxid dusičitý

O_2 – kyslík

$O_2^\bullet$ - superoxid

$^1O_2$ – singletový kyslík

O_3 – ozón

$OH^\bullet$ - hydroxylový radikál

OH^- - hydroxid

$OONO^-$ - peroxynitrit

p^+ - proton

P.U. – perfúzní jednotka (perfusion unit)

RNA – ribonukleová kyselina

RNS – reaktivní formy dusíku (reactive nitrogen species)

$RO^\bullet$ - alkoxyl

$ROO^\bullet$ - peroxyl

ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

SOD – superoxiddismutáza

VR – volné radikály

XO - xanthinoxidáza

1 ÚVOD

V posledních letech se věda zabývá zkoumáním reaktivních forem kyslíku, respektive zkoumáním volných radikálů. Radikály se v krvi vyskytovaly od pradávna, ale jen v takovém množství, že je přirozené regulační mechanismy dokázaly neutralizovat. Bylo zjištěno, že ROS působí na organismus nejen pozitivně, ale i negativně.

Původní teorie byla, že ROS jsou součástí chemických reakcí do té doby, než se zjistila nebezpečnost kyslíku vůči některým organismům. Přišlo se na to, že kyslík má univerzální vlastnosti a je se schopen oxidovat a redukovat na různé formy dalších látek.

Před 40 lety byl objeven enzym, který v organismu katalyzuje přeměnu superoxidu. Po objevení superoxiddismutázy probíhala řada nejrůznějších prací na základě objevů a účinků enzymu.

Časem byly objeveny různé antioxidanty. Antioxidanty jsou látky působící právě proti volným radikálům. V současné době se zkoumají různé možnosti, jak odstranit negativní vlivy radikálů formou nejrůznějších antioxidantů, některých vitamínů, atd. Jinými slovy, řada reaktivních sloučenin kyslíku má význam ve fyziologii a patogenezi.

Zájem o problematiku ROS se zvyšoval, když bylo prokázáno, že dokážou poškozovat proteiny, lipidy a nukleové kyseliny, tedy poškození DNA a genetické informace.

Cílem teoretické části této diplomové práce je seznámení s problematikou ROS – definovat ROS, popsat zástupce, cesty vzniku, fyziologické a patologické účinky na organismus, definovat antioxidační systém. Dále se teoretická část zabývá látkou FeTTPS, jejíž účinky jsou zkoumány v experimentální části.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Co jsou to ROS

Kyslíkové radikály jsou modifikované molekuly a sloučeniny kyslíku, které se podílejí na vzniku a rozvoji různých chorob i fyziologického stárnutí organismu. Důležitou úlohu hrají též při zánětu. Jedná se o molekuly, atomy nebo iony s jedním nebo s více nepárovými elektrony ve valenční sféře, které jsou schopny krátkodobé existence. Mají vysokou chemickou reaktivitu a iniciují řetězové reakce, kdy jeden radikál vytváří radikály další [31].

Při reakci může radikál předat svůj nepárový (tzv. redukující radikál) nebo přijmout elektron (tzv. oxidující radikál) nebo se sloučit s neradikálem. Ať proběhne kterákoliv z těchto reakcí, neradikál se stane radikálem. Naopak setkají-li se dva radikály navzájem, mohou zkombinovat své dva nepárové elektrony a vytvoří stabilní kovalentní vazbu [31].

Molekula kyslíku sice obsahuje dva nepárové elektrony, protože však mají oba shodný spin, je stabilní a nepůsobí hyperaktivně [31].

2.2 Co patří mezi ROS

Mezi reaktivní formy kyslíku patří volné radikály vytvořené z molekuly kyslíku, které obsahují nepárový elektron. Dále mezi ROS řadíme sloučeniny kyslíku, které sice nemají charakter radikálů, ale ty z nich mohou vznikat [28].

A) Volné radikály:
- *Superoxid* – $O_2^{\bullet -}$
- *Hydroxylový radikál* – $HO^{\bullet}$
- *Peroxyl* – $ROO^{\bullet}$
- *Alkoxyl* – $RO^{\bullet}$
- *Hydroperoxyl* – $HO_2^{\bullet}$

B) Látky, které nejsou volnými radikály:
- *Peroxid vodíku* – H_2O_2
- *Kyselina chlorná* – HClO
- *Ozon* – O_3
- *Singletový kyslík* – $^1O_2$

2.2.1 Superoxid

Jednoelektronovou redukcí kyslíku se vytváří superoxid, pro který se běžně používají synonymní názvy superoxidový anion (nese jeden záporný náboj) nebo superoxidový radikál (má též jeden nepárový elektron). Superoxid se může protonizovat na hydroperoxylový radikál. Jinou možností pro superoxid je přijetí dalšího elektronu a dvou protonů za vytvoření peroxidu vodíku. V přítomnosti dalšího elektronu a protonu se rozpadne na vodu a na hydroxylový radikál. Excitací elektronů v molekule kyslíku spojenou se změnou spinu jednoho z vnějších elektronů vzniká velmi reaktivní forma označovaná jako singletový kyslík [28].

Obrázek 1 *Lewisowa elektronová konfigurace superoxidu. Šest valenčních elektronů kyslíku je vyznačeno černou barvou; jeden elektronový pár je mezi nimi sdílen; jeden nepárový elektron, který celé látce dává záporný náboj, je vyznačen červeně [52].*

Vznik superoxidu: $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$

Protonizace superoxidu na hydroperoxylový radikál: $O_2 + p^+ (H^+) \rightarrow HO_2^{\bullet}$

Vytvoření peroxidu:

$$O_2^{\bullet -} + e^- + 2p^+ (2H^+) \rightarrow H_2O_2$$

$$H_2O_2 + e^- + 2p^+ (2H^+) \rightarrow H^+ + OH^- (H_2O) + OH^{\bullet}$$

Zvláštností superoxidu (podobně i peroxidu vodíku) je schopnost dismutovat, tj. vykazovat jak oxidační, tak redukční vlastnosti při vzájemné reakci [28]:

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Tato reakce probíhá i spontánně, v organismu je urychlována enzymem superoxiddismutasou. Peroxid vodíku pak může spolu se superoxidem v přítomnosti iontů Fe^{2+} nebo Cu^{2+} vytvářet už zmíněný hydroxylový radikál, vysoce reaktivní formu vytvářející např. lipoperoxidy. Klasická Haberova-Weissova reakce, kde katalyzátorem je Fe^{2+} , vypadá takto [28]:

$$O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$$

2.2.2 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku je relativně stabilní, proniká v tělních tekutinách i na značnou vzdálenost.V přítomnosti dvoumocného železa vytváří vysoce toxický hydroxylový radikál (Fentonova reakce) [37]:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+}$$

Obrázek 2 *Peroxid vodíku [40].*

2.2.3 Hydroxylový radikál

Hydroxylový radikál je velmi silné oxidační činidlo schopné oxidovat báze v nukleových kyselinách, aminokyseliny, cukry i nenasycené mastné kyseliny v lipidech. Trojmocné železo vznikající při reakci může být redukováno superoxidem, čímž se kruh pro další průběh uzavírá. Hydroxylový radikál reaguje s celou řadou biologických struktur (sacharidy, aminokyseliny, fosfolipidy, nukleotidy a organické kyseliny), kdy jim odnímá vodík – důsledkem je oxidační poškození [37].

Příkladem odnětí vodíku je reakce hydroxylového radikálu s lecitinem (významný membránový fosfolipid). Touto reakcí vzniká lipidový radikál, který spouští další radikálové reakce s výsledným poškozením membrán [37].

Tento kyslíkový radikál je také schopen adiční reakce s aromatickými kruhy purinových a pyrimidinových zásad, jež jsou součástí DNA a RNA [37].

Všechny výše uvedené látky poškozují biomolekuly tím, že jim odejmou elektron, biomolekula pak v tomto místě rychle podléhá peroxidaci (oxidaci) a stává se sama volným radikálem. Toto poškození biomolekul pokračuje tak dlouho, dokud se nepotkají dva volné radikály nebo oxidace není zastavena antioxidační látkou („scavengerem“ volných radikálů). Je však třeba uvést, že i metabolity volných radikálů mohou být nebezpečné [31].

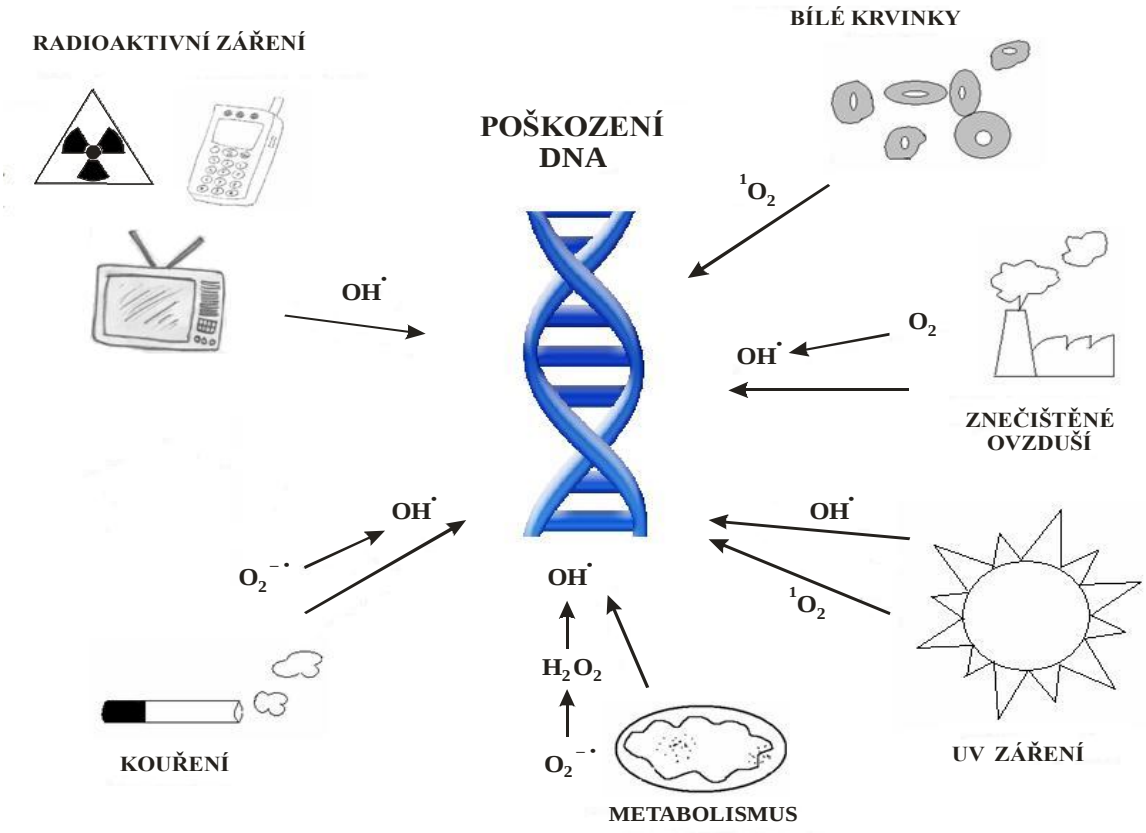
Typické buněčné komponenty, které jsou poškozovány:

- Lipidy
- Proteiny
- Nukleové kyseliny (DNA) [31]

2.3 Vznik ROS

- Oxidace: ztráta elektronu
- Redukce: získání elektronu
- Homolytické štěpení kovalentní vazby: nutno dodat velké množství energie
- Vznik radikálů může být iniciací radikálové reakce, reakce se pak propaguje do okolí až dokud nenarazí na další radikál – terminace
- Vznik působením ionizujícího záření nebo ostatními fyzikálními a chemickými mechanismy
- Vznik fyziologicky nebo patologicky při metabolických procesech

V organismu vznikají reaktivní formy kyslíku dvěma způsoby – při neenzymových a enzymových reakcích.



Obrázek 3 *Vznik ROS enzymovou a neenzymovou cestou [45].*

2.3.1 Neenzymové reakce

Neenzymovou cestou vznikají ROS především účinkem vysokoenergetického záření (radiolýzou). Přijatá energie záření rozštěpí kovalentní vazbu v molekule vody ve tkáních za vzniku hydrogenového radikálu ($H^{\bullet}$) a hydroxylového radikálu ($OH^{\bullet}$) [31].

Nemalá množství volných radikálů kyslíku vznikají v ovzduší ve smogu a z výfukových plynů, nebo z cigaretového kouře (jedna vykouřená cigareta se rovná 10^{17} volných radikálů. I takto vzniklé ROS jsou pro život významné, i když v negativním smyslu [28].

2.3.2 Enzymové reakce

K enzymovým reakcím patří oxidoredukční pochody v mitochondriích (dýchací řetězec), redoxní reakce katecholaminů, hydrochinonů, hemoglobinu, xanthinu, reakce při syntéze leukotrienů, prostaglandinů a další. Vznikají i při biotransformaci některých toxických látek jako je tertrachlormetan [31].

Nejbohatším zdrojem ROS je dýchací řetězec v mitochondriích, kde vzniká nejprve singletový kyslík a následně peroxid vodíku. Superoxid vzniká v důsledku redukce jedním elektronem. Vzniklý superoxid je dále transformován na stabilnější peroxid vodíku pomocí enzymu superoxiddismutázy [56].

V dýchacím řetězci probíhá základní čtyřelektronová redukce molekulárního kyslíku na 2 molekuly vody:

- Přijetí 1. elektronu: $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$
- Přijetí 2. elektronu: $O_2^{\bullet -} + e^- \rightarrow H_2O_2$
- Přijetí 3. elektronu: $H_2O_2 + e^- \rightarrow H_2O + HO^{\bullet}$
- Přijetí 4. elektronu: $HO^{\bullet} + e^- \rightarrow H_2O$
- Tato reakce probíhá v aktivním centru cytochromdiázy v mitochondriích

Dalším zdrojem je oxidační vzplanutí. Je to děj, při kterém fygocytující buňky likvidují cizorodé částice. Efekt reaktivních forem kyslíku je zde velmi žádoucí [28].

Mezi extramitochondriální buněčné zdroje ROS patří endoplazmatické retikulum. Hladké endoplazmatické retikulum obsahuje izoenzymy cytochromu P-450. Tyto izoenzymy jsou schopny redukovat molekulární kyslík na superoxid a peroxid vodíku [56].

Existují též enzymy, které produkují superoxid jako vedlejší produkt. Je to xanthinoxidáza (XO), ta se vytvoří z xanthindehydrogenasy při nedostatku kyslíku v tkáních (při hypoxii vzniklé hypoperfúzí, tj. při tkáňové ischemii - např. akutní infarkt myokardu. Tato konverze se děje účinkem proteolytických enzymů. Po obnovení dodávky kyslíku (rychlá reperfúze) dostane xanthinoxidáza potřebný materiál (kyslík) a oxiduje hypoxanthin na xanthin za vzniku superoxidových iontů, které poškozují tkáň (reperfuzní paradox) [31]:

$$\text{Hypoxanthin} + H_2O + 2O_2 \rightarrow \text{xanthin} + 2O_2^{\bullet -} + 2H^+$$

Tvorba ROS účinkem xanthioxidázy je hlavní příčinou reperfúzního poškození myokardu (vedoucího k rozšíření ischemického ložiska a ke vzniku nejrůznějších arytmií), mozku, ledvin a dalších orgánů a tkání [31].

2.4 Fyziologické účinky ROS

2.4.1 Fagocytóza

Volné kyslíkové radikály iniciují četné biochemické reakce a ovlivňují jejich rychlost a směr. Jejich fyziologická úloha spočívá především v mikrobicidním účinku na fagocytované mikroby [30]. Fagocytóza je proces, při kterém dochází k odstranění zbytků mrtvých buněk nebo pohlcení a usmrcení bakterií. Fáze fagocytózy, kde dojde ke tvorbě reaktivních sloučenin kyslíku, se nazývá oxidační vzplanutí. Mezi enzymy podílející se na vzniku kyslíkových radikálů při oxidačním vzplanutí patří NADPH – oxidáza a myeloperoxidáza [56].

Nejprve vzniká superoxid účinkem granulocytární NADPH – oxidázy:

$$2O_2 + NADPH \rightarrow O_2^{\bullet -} + NADP^+ + H^+$$

Dismutací superoxidu vznikne peroxid vodíku a ten následně oxiduje chloridové anionty na kyselinu chlornou:

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HClO + OH^-$$

Kyselina chlorná má silné oxidační vlastnosti, využívá se k „zabíjení“ bakterií. Štípek a kol. (2002) uvádí, že může být dalším zdrojem $HO^{\bullet}$ po reakci se superoxidem [45].

$$HClO + O_2^{\bullet -} \rightarrow HO^{\bullet}\ Cl^- + O_2$$

2.4.2 Signální molekuly

ROS se mohou chovat jako signální molekuly. Signální molekuly jsou schopné přenášet signál z buňky do buňky za účelem přijímání nových informací mezi sebou. Ovlivňují tím aktivitu enzymů a další pochody v buňce. Nejdřív dochází k přijetí informací do buněk z okolního prostředí v podobě primárních poslů. Mezi primární posly patří neurotransmitery, hormony, cytokiny a další. Pomocí speciálních enzymů zvaných buněčné transdukční cesty se pak informace dostane k cíli a k pochodům buňky [56].

2.5 Patologické účinky ROS

Volné kyslíkové radikály, kromě výše uvedené nezastupitelné fyziologické úlohy, mají účinek škodlivý – mohou působit proti vlastním tkáním tím, že poškozují nejrůznější struktury na subcelulární i celulární úrovni. Důsledkem je celá řada poruch v organismu [31].

2.5.1 Oxidační poškození lipidů – lipoperoxidace

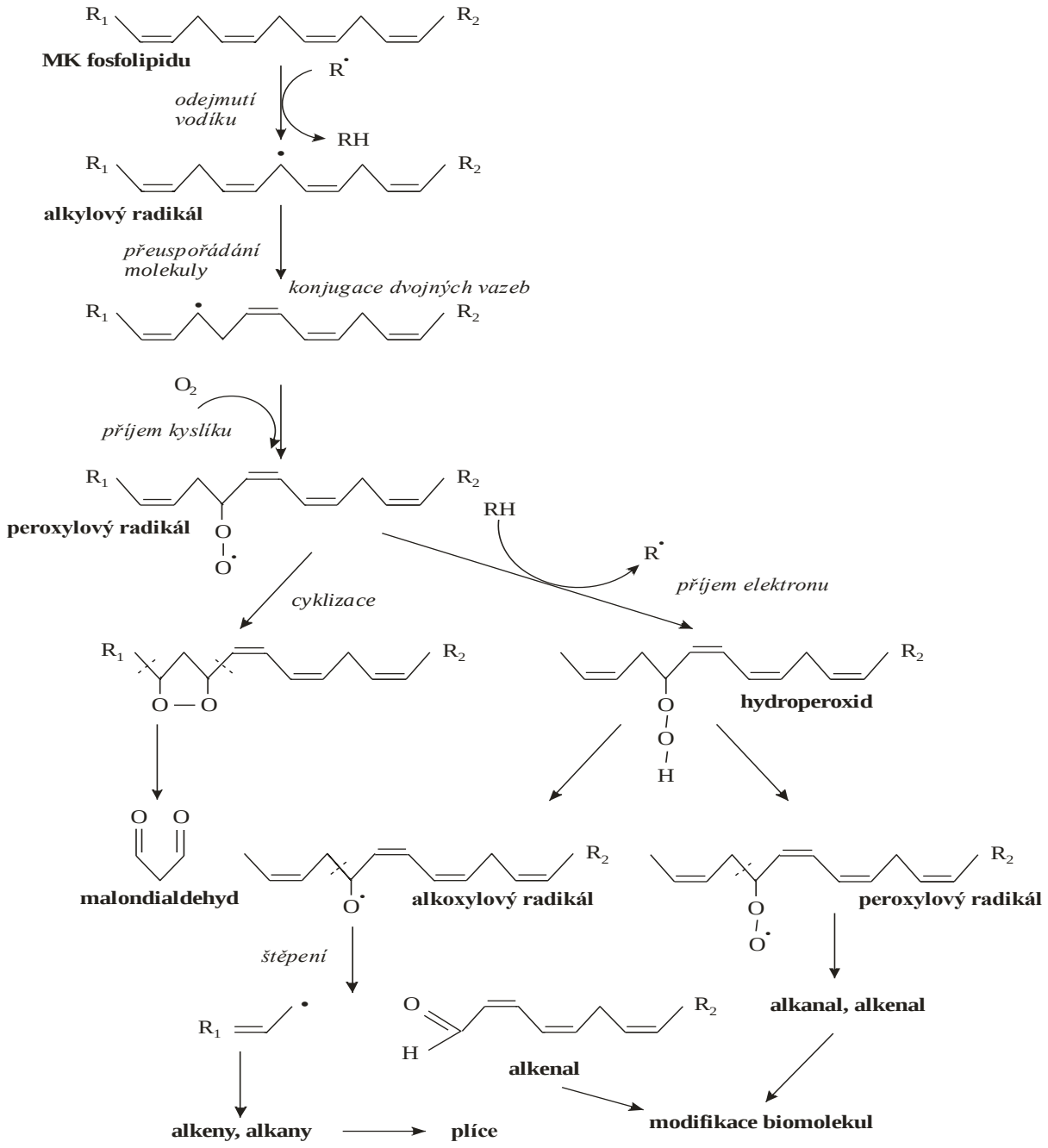
Lipidy jsou poškozovány v procesu lipoperoxidace. Je to proces, při kterém jsou polynenasycené mastné kyseliny lipidů poškozovány působením volných radikálů a kyslíku za vzniku hydroperoxidů [45].

Takové změny nejintenzivněji vyvolávají hydroperoxylový a hydroxylový radikál, méně superoxid. Nejcitlivějším terčem je fosfolipidová dvojvrstva všech biologických membrán (hlavně v endotelu cév) a v nich především místa dvojných vazeb nenasycených mastných kyselin, a to kyseliny linolové a linolenové. Membrány postižené lipoperoxidací vykazují změnu permeability, a tím se zásadně ovlivní buněčný metabolismus a dojde k porušení homeostázy buňky [28].

Vedlejším produktem této reakce je malondialdehyd $HOC\text{-}CH_2\text{-}COH$. Jeho stanovení slouží jako míra velikosti lipoperoxidace. Už vzniklé peroxidy se likvidují

především glutathionperoxidasou. Viditelným projevem oxidačního poškození je také vytváření pigmentů na stařeckých skvrnách [28].

Jak již bylo výše uvedeno, lipoperoxidy přímo poškozují endotel cév. Dále zvyšují příjem oxidovaných LDL částic buňkami endotelu, hladké svaloviny cév i makrofágů (acetyl – LDL receptory), blokují syntézu prostacyklinu v cévní stěně, zvyšují agreabilitu trombocytů a mají řadu dalších proaterogenních účinků [31].



Obrázek 4 *Schéma peroxidace lipidů [45].*

2.5.2 Oxidační poškození bílkovin a enzymů

Především jde o napadání SH – skupin, které v enzymech, ale stejně v hemoglobinu, poškozuje jejich metabolické funkce. Do téže kategorie škod patří oxidační modifikace bílkovin pojiva – kolagenu a elastinu. Zvyšuje se u nich stupeň příčného zesíťování. Důsledkem oxidace je také urychlená syntéza methemoglobinu [28].

2.5.3 Poškození DNA

Volné radikály, především hydroxylový radikál, mohou výrazně změnit strukturu DNA a RNA. Ukazuje se, že reakcí hydroxylového radikálu s DNA vznikají různé produkty se změněnou strukturou a porušenými vazbami. Tím dochází ke štěpení řetězce DNA a modifikaci bazí. Výsledkem je například mutace způsobena špatným pořadím párování bází. Jedná se například o záměnu párů AT za GC a naopak [56].

Z makromolekul mohou být dále poškozeny polysacharidy a glykosaminoglykany. Ale též látky nízkomolekulární, jako jsou polyfenoly, katecholaminy, thioly, tokoferol a askorbát (obě posledně jmenované látky jsou „sebevrazi“, jež se vystavují oxidaci a tím chrání buněčné struktury). Substrátem reaktivních forem kyslíku je také cholesterol [28].

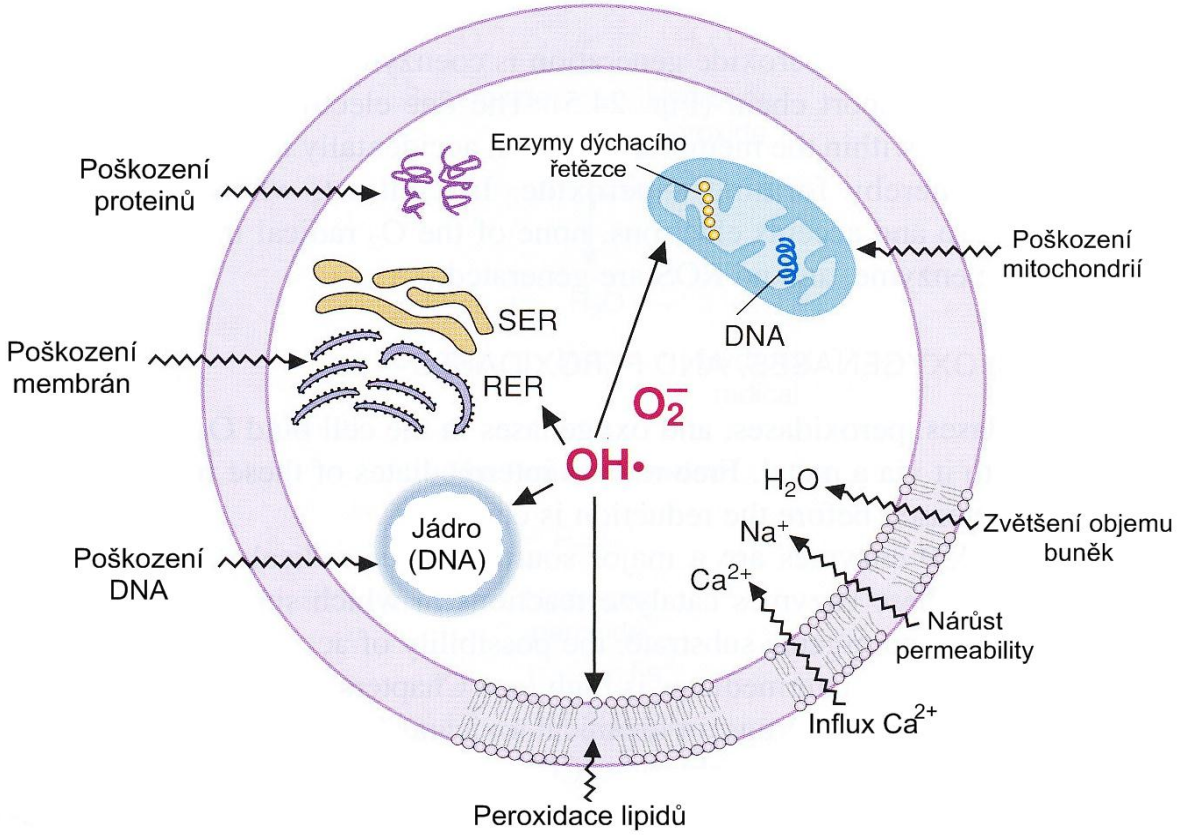
2.5.4 Apoptóza

Reaktivní sloučeniny mohou vést k buněčné smrti, která probíhá dvěma způsoby: Nekróza a apoptóza. K apoptóze neboli programové buněčné smrti dochází v důsledku aktivace sebevražedných mechanismů buňky. ROS indukují apoptózu v různých buněčných systémech, např. progresivní ztráta T-lymfocytů u infekce virem imunodeficience (AIDS) nebo reperfúzní poškození myokardu u ischemie [45].

2.5.5 Stárnutí – volně radikálová teorie stárnutí

Z více než 300 teorií multifaktoriálního procesu stárnutí patří tato teorie k nejdůležitějším. Ve stáří klesá antioxidační obrana, zvyšuje se poškozování lipidů, proteinů, DNA aj. Současně klesá i schopnost opravy poškozených biomolekul a zrychluje se zkracování telomérů. Intracelulárně stoupají vápník, modifikované LDL, produkty lipoperoxidace, aldehydy, homocystein, ferritin aj. Zvláště nebezpečně může účinkovat peroxid vodíku. To vše je příčinou mnoha onemocnění, mnohé z nich se projeví až ve stáří. Stárnutí podobně jako oxidační stres, záněty, infekce a

hyperglykémie působí endoteliální dysfunkci. Redukovaný glutathion je obsažen ve vyšších koncentracích v kvasnicích a kromě antioxidační aktivity váže těžké kovy, má antiapoptotickou schopnost a detoxikuje např. formaldehyd. Chrání tedy buňky před stárnutím. Dlouhověcí lidé mají vysoké aktivity superoxiddismutázy a hladiny vitaminu E [18].



Obrázek 5 *Radikálové poškození buněk [45].*

2.5.6 Reperfuzní poškození

Bylo prokázáno, že při obnovení dodávky kyslíku do ischemické tkáně (reperfúze) dojde paradoxně k poškození tkáně (reperfúzní paradox). Při výkladu tohoto fenoménu nutno vyjít z patochemie zánětlivé reakce a z aktivace retikuloendotelu při ní. Základem je pravděpodobně přeměna xanthindehydrogenázy na xanthinoxidázu při ischemii endotelu příslušné tkáně. Xanthinoxidáza (na rozdíl od xanthindehydrogenázy) katalyzuje za přítomnosti molekulového kyslíku vznik volných kyslíkových radikálů (při oxidaci xypoxanthinu na kyselinu močovou) [31].

Vzhledem k tomu, že endotelové buňky obsahují podstatně více xanthindehydrogenázy než buňky tkáňové, volné kyslíkové radikály se v endotelové

buňce dostávají též do cirkulace mikrokapilární sítě, kde ihned aktivují přítomné neutrofily, které se prostřednictvím adhezivních molekul navážou pomocí příslušné ligandy na tkáňovou buňku. Z takto navázaného a aktivovaného leukocytu se uvolní další volné kyslíkové radikály (oxidanty) a proteinázy, které způsobí poškození reperfundované tkáně [31].

Předpokládá se, že tento mechanismus představuje aktivaci retikuloendotelového systému, která vede k zachycení a usmrcení cirkulujících mikroorganismů v mikrokapilární síti jako obrana vůči pronikání infekce do tkání. Proteolytická přeměna xanthindehydrogenázy na xanthinoxidázu působením cytokinů je transdukčním signálem a vytvořené superoxidové radikály působí jako druhý poslíček (second messenger) [31].

U intoxikace alkoholem je množství kyslíku spotřebováváno na oxidaci alkoholu, takže dochází k relativní hypoxii, později pak k reperfúzi a známým zdravotním potížím (kocovina) [19].

2.6 Ochrana před ROS – antioxidační systém

Vzestup koncentrace kyslíku v zemské atmosféře způsobený před 2,5 miliardami let fotosyntetickou aktivitou sinic musel způsobit stres, který mohly přežít jen druhy, u nichž se vyvinuly mechanismy chránící je před vysoce reaktivním prvkem (hlavně před jeho metabolity). Organismus používá tří možných typů ochrany [57].

a) mechanismy zabraňující tvorbě nových radikálů
b) mechanismy odstraňující již vytvořené radikály. Tyto molekuly bývají označovány jako scavengers (vychytávače), které volný radikál zachytí a přemění na neradikálovou formu. Dále trapers (lapače), které zachytí volný radikál a přemění na stabilní formu. Poslední quenchers (zhášeče), které molekulu zachytí a zhasí reaktivitu.
c) na antioxidační ochraně se podílí též obecné reparační mechanismy poškozených molekul. Do této skupiny patří ochranné mechanismy, které odstraní molekuly poškozené radikály [56].

Protože volné radikály odebírají molekulám elektron, a působí tedy oxidačně, všechny látky, které jejich působení brání, jsou označovány jako antioxidanty [42].

Pro zamezení negativního působení ROS je důležité, aby byl vůči nim vyvinut obranný imunitní mechanismus. Jeho součástí je antioxidační systém, který se může rozdělit do dvou skupin na základě konkrétních funkcí antioxidantů, na enzymatické a neenzymatické antioxidační systémy [45].

Antioxidační systém		
Enzymatický	**Neenzymatický**	
superoxiddismutáza	transferin	bilirubin
glutathionperoxidáza	feritin	selen
glutathiontransferáza	ceruloplazmin	glutathion
kataláza	vitamin C, E, A	kyselina lipoová
	alfa tokoferol	kyselina močová
	koenzym Q	flavonoidy
	karotenoidy	

Tabulka 1 *Přehled a rozdělení antioxidačního systému [45].*

2.6.1 Enzymové antioxidační systémy

Mezi enzymy podílející se na antioxidační ochraně organismu patří: superoxiddismutáza, glutathionperoxidáza, glutathiontransferáza a kataláza [56].

2.6.1.1 Superoxiddismutáza

Superoxiddismutáza se nachází v každé buňce lidského organismu. Enzym je fylogeneticky stejně starý jako problém přeměny redukční atmosféry země na oxidační [51]. Katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku, který je následně odstraňován katalázou nebo peroxidázou [56].

$$2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Je samozřejmé, že i vzniklý peroxid vodíku musí být účinně odstraňován. Zde se uplatňují navazující reakce katalyzované katalázou a peroxidázami [42].

Podle přítomnosti kofaktoru dělíme SOD do několika skupin. Kofaktorem je pokaždé atom kovu [44].

SOD	Výskyt u organismů	Subbuněčná lokalizace u člověka
Cu, Zn-SOD	téměř všichni aerobní eukaryoti, některé bakterie	cytosol, jádro, snad peroxizómy
Mn-SOD	mnohé bakterie, většina aerobních eukaryotů	mitochondrie, někdy též v cytosolu
Fe-SOD	mnohé bakterie, některé vyšší rostliny	u člověka není přítomna

Tabulka 2 *Klasifikace superoxiddismutázy [29].*

2.6.1.1.1 Cu, Zn – SOD (SOD1)

Je stabilní enzym nacházející se v cytosolu a mezimembránovém prostoru mitochondrií [9]. Přenos elektronu z jedné molekuly superoxidu na druhou obstarává atom mědi. Cu(II) se redukuje na Cu(I) a pak zase oxiduje. Zn(II) má stabilizační funkci, katalýzy se neúčastní. Gen pro tuto SOD se nachází na 21. chromozomu [57].

$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
$\text{Enzym-Cu}^{2+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow \text{Enzym-Cu}^{+} + O_2$ $\text{Enzym-Cu}^{2+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow \text{Enzym-Cu}^{2+} + H_2O_2$

Tabulka 3 *Reakce superoxiddismutázy [29].*

2.6.1.1.2 Mn-SOD (SOD2) a Fe-SOD

Patří mezi vývojově a strukturně do druhé rodiny superoxiddismutáz. Obě se vyskytují u prokaryot. Mn-SOD je enzymem mitochondriální matrix. Prokaryotická Fe-SOD nebyla nalezena v živočišných buňkách. Nejsou tak stabilní jako Cu,Zn-SOD [57].

Strukturní příbuznost Mn-SOD a Fe-SOD a odlišnost fylogeneticky mladší Cu,Zn-SOD je jedním z dokladů symbiotického původu mitochondrií v eukaryotické buňce [57].

Chybění aktivity SOD má pro postižený organismus závažné následky. To svědčí o významu tohoto enzymu. U člověka vede deficit Cu, Zn-SOD k těžkému postižení motorických neuronů v mozkové kůře a míše. Onemocnění se dědí autosomálně dominantně a je známo pod názvem amyotrofická laterální skleróza [42].

Snížená aktivita SOD u některých onemocnění může následkem nedostatečného odstraňování superoxidu poškozovat organismus působením ROS. Nižší aktivita SOD

byla popsána u hemodialyzovaných nemocných. Pokles aktivity tohoto enzymu ve stáří je součástí celkového oslabení antioxidační ochrany [42].

Zvýšená aktivita Cu,Zn-SOD ve tkáních doprovází četná onemocnění z volných radikálů. Zvýšená tvorba superoxidu stimuluje syntézu enzymu. Tak je tomu například u nemocných se sklerotickým postižením cév, revmatoidní artritidou, Alzheimerovou chorobou, u diabetiků, nemocných s hyperlipoproteinnémií aj. Mn-SOD stoupá v séru pacientů po infarktu myokardu. Její zvýšení v séru alkoholiků svědčí o oxidačním stresu u těchto osob [41].

Gen řídící tvorbu Cu,Zn-SOD se nachází na 21. chromozomu. Potvrdil se předpoklad, že u nemocných s trisomií 21. chromozomu (Downův syndrom) bude aktivita SOD v erytrocytech asi o 50% vyšší než u zdravých osob. Analogicky se poloviční aktivita enzymu nachází u dětí s monosomií 21.chromozomu. onemocnění je doprovázeno poruchami vývoje skeletu a srdečními vadami [42].

2.6.1.2 Glutathionperoxidázy

Jak bylo uvedeno výše, superoxidu se organismus zbavuje dismutací na peroxid vodíku v reakci katalyzované superoxiddismutázou. Peroxid vodíku je však sám toxický a může jakožto relativně stabilní a přitom elektroneutrální látka volně difundovat buněčnými membránami do různých kompartmentů. Reakcí se superoxidem (Haber – Weissova reakce) nebo s atomem přechodného kovu (Fe, Cu, Ni, Cd, Ti aj. – Fentonova reakce) může navíc poskytnout daleko nebezpečnější radikál hydroxylový. Snahou organismu je zbavit se přebytku peroxidu vodíku [43].

K tomuto účelu se vyvinuly dva systémy:

• kataláza, která štěpí peroxid vodíku na vodu a kyslík

• peroxidázy, které rovněž redukují peroxid vodíku, současně se však oxidují na jiný substrát [42].

Glutathionperoxidáza je enzym, který katalyzuje redukci peroxidu vodíku na vodu. Současně dochází k oxidaci cysteinu obsaženého v glutathionu (GSH).

$$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSG$$

Aby docházelo k plynulému odstraňování peroxidu vodíku, musí být přítomna glutathionreduktáza, která redukuje glutathion zpět do redukované formy pomocí koenzymu NADPH [56].

$$GSSG + NADPH \rightarrow 2GSH + NADP+$$

2.6.1.3 Glutathiontransferázy

Celá rodina cytosolových enzymů zvaných glutathiontransferázy (GST) katalyzuje konjugační reakci, při které je sulfhydrylová skupina GSH navázána na elektrofilní organickou látku. Tímto způsobem jsou detoxikovány některé látky tělu cizí (xenobiotika). V posledních letech se ukázalo, že GST jsou významnou ochranou před následky peroxidace lipidů. Jejich substrátem je 4-hydroxynonenal, který je konjugací s GSH inaktivován a vyloučen z těla. GSH je tedy spotřebováván nejen při ochranných redukčních reakcích, ale též při odstraňování produktů peroxidace [57].

2.6.1.4 Kataláza

Kataláza je enzym, který štěpí peroxid vodíku na vodík a vodu. Jejím hlavním významem je ochrana organismu před větší koncentrací peroxidu vodíku. Největší aktivita v lidském těle se nachází v mitochondriích, peroxisomech hepatocytů a v cytoplazmě erytrocytů [57].

$$2H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$$

2.6.1.5 Souhra antioxidačních enzymů

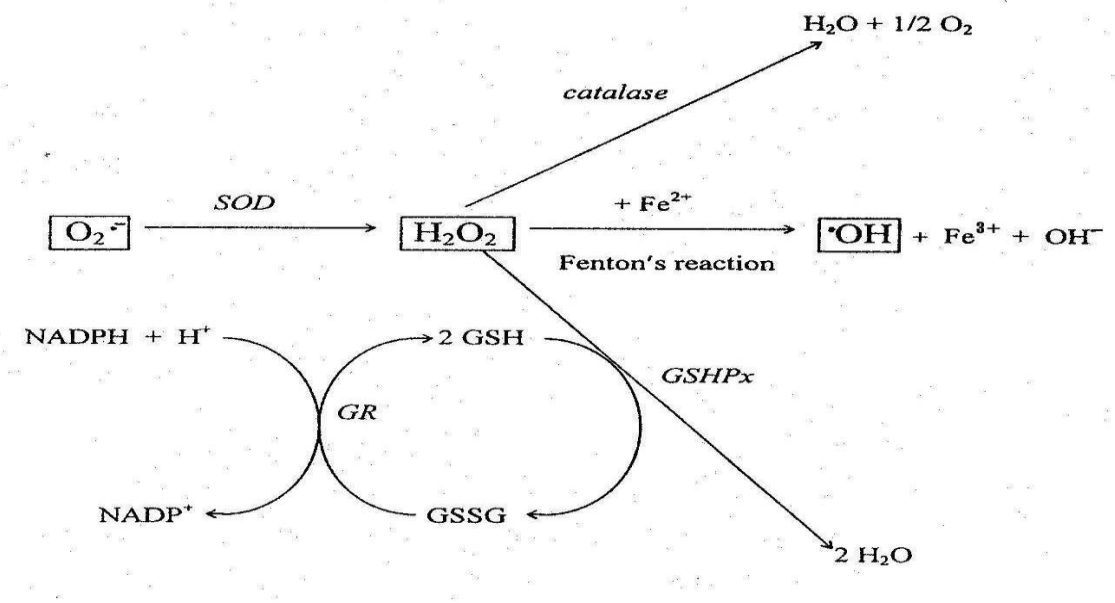
Činnost antioxidačních enzymů je navzájem propojena. SOD sice odstraňuje nejčastější volný radikál, superoxid, přeměňuje ho však na peroxid vodíku. Ten snadno difunduje membránami a má relativně dlouhý biologický poločas, může tedy sám způsobit oxidační poškození buněk. Navíc působením přechodných kovů, nejčastěji Fe^{2+} a Cu^{+} , může být peroxid vodíku v tzv. Fentonově reakci přeměněn na vysoce reaktivní hydroxylový radikál, k odstranění peroxidu vodíku slouží další enzymy, především kataláza a GSHPx [42].

Zvláště nepříznivá je kombinace snížené aktivity GSHPX a zvýšené aktivity SOD, kdy je nedostatečně odstraňován peroxid vodíku, který vzniká ve zvýšené míře a může poškodit buňky. Tento stav byl pozorován například u dialyzovaných diabetiků a u kuřáků. Ani u nemocných s Downovým syndromem není zvýšení aktivity SOD provázeno zvýšením aktivity navazujících antioxidačních systémů a projeví se nepříznivě [42].

Fentonově reakci brání i skutečnost, že přechodné kovy se v organismu nenacházejí ve volné formě, ale vázané na bílkoviny, které se tak rovněž řadí k antioxidantům [42].

Důležitá je nejen souhra antioxidačních systémů navzájem, ale i jejich neoddělitelný vztah k neenzymovým intracelulárním antioxidantům. K normální funkci

GSHPx je třeba dostatek redukovaného glutathionu, dále aktivita glutathionreduktázy a přítomnost redukované formy NADPH. Nedostatek glutathionu i NADPH bývá např. u diabetiků, což je jedna z příčin oxidačního stresu u těchto nemocných [42].



Obrázek 6 *Enzymové antioxidační systémy [39].*

2.6.2 Neenzymové antioxidační systémy

Hraje podobnou roli jako enzymatický oxidační systém. Eliminuje volné ROS jejich přeměnou na méně toxické produkty. Do neenzymatické skupiny antioxidačního systému můžeme začlenit vysokomolekulární a nízkomolekulární endogenní antioxidanty. Mezi hlavní představitele vysokomolekulárních antioxidantů patří transferin, feritin, ceruloplazmin, albumin. Glutathion, škála vitamínů (vitamin A, C a E), flavonoidy, karotenoidy, koenzym Q, melatonin a další látky jsou součástí nízkomolekulárních endogenních antioxidantů. Kromě dalších látek mají významné zastoupení i stopové minerály (Fe, Cu, Zn, Se) [45].

2.6.2.1 Transferin, feritin

Transferin je plazmatická bílkovina, která váže a přenáší železo z míst absorpce do míst potřeby. Navázáním železa zabraňuje transferin vstupu železa do Fentonovy reakce a vzniku ROS [56].

Feritin je protein, který ukládá železo. Vyskytuje se v tkáních a malá část v krvi. V medicíně je velmi prospěšný při určování obsahu železa v organismu a je velkým přínosem pro diferenciální diagnostiku anémií [45].

2.6.2.2 Ceruplazmin, albumin

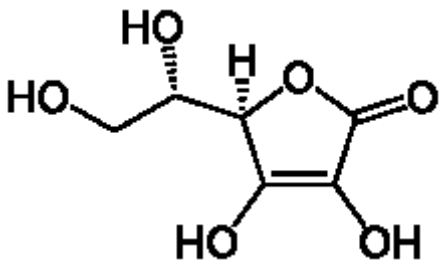
Ceruloplazmin je protein obsahující měď. Je schopen oxidovat dvojmocné železo na trojmocné, a tím uvolňovat železo z buněk, které je předáno transferinu [56].

Albumin je protein, který je schopen vázat řadu látek, mezi jinými ionty kovu. Váže Cu^{2+} iont, který reaguje s peroxidem vodíku a brání tak účinkům ROS [56].

2.6.2.3 Vitamin C (kyselina askorbová)

Nejvýznamnějším nízkomolekulárním redoxním systémem je kyselina L-askorbová a její oxidované deriváty. Názvem vitamin C se označuje celý reversibilní oxidačně – redukční systém. Askorbát je nutný kofaktor enzymů při syntéze kolagenu a při přeměně dopaminu na noradrenalin. Kromě toho je důležitým redukčním činidlem. Redukuje Fe(III) na Fe(II) a Cu(I) na Cu(II). Umožňuje tak vstřebávání železa ze střeva [29].

Antioxidační účinek askorbátu spočívá v tom, že redukuje anorganické i organické radikály, jako $O_2^{\bullet-}$, $HO_2\bullet$, $HO\bullet$, hydrofilní $RO_2\bullet$, $NO_2\bullet$, a reaguje s $^1O_2$ a HClO. Askorbát regeneruje tokoferylový radikál (oxidovaná forma vitaminu E) na redukovanou formu – vitamin E, čímž zabezpečuje ochranu vitaminu E a lipidů membrán před oxidací. Při těchto reakcích ztratí elektron a změní se na semidehdyroaskorbát neboli askorbylový radikál, který je mnohem méně reaktivní než vyjmenované radikály. Regeneruje se speciální dehydrogenázou za účasti NADH zpět na askorbát nebo dizmutuje na askorbát a dehydroaskorbát. Dehydroaskorbátreduktáza za účasti GSH regeneruje dehydroaskorbát na askorbát. Avšak GSH je intracelulární antioxidant, a tak se při oxidačním stresu askorbylové radikály mohou hromadit v extracelulární tekutině a ničit biomolekuly [57].



Obrázek 7 *Chemická struktura vitaminu C [62].*

2.6.2.4 Vitamin E (tokoferol)

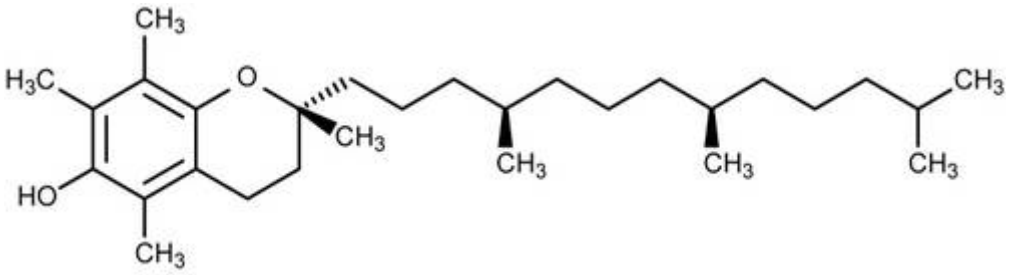
Pod název vitamin E zahrnujeme skupinu osmi izomerů tokoferolu, z nichž biologicky nejúčinnější je α-tokoferol. Vedlejší izoprenový řetězec způsobuje nerozpustnost vitaminu E ve vodě, a tudíž jeho lipofilní charakter. Vitamin E je typický membránový antioxidant, uplatňuje se v antioxidační ochraně lipidů biologických membrán a lipoproteinových částic plazmy [42].

Vitamin E pomáhá předcházet ateroskleróze (zesílením stěn arterií vzhledem k nánosům tuků a minerálů). Krev obsahuje nosiče pro látky typu cholesterolu a mastných kyselin, které jsou označovány jako lipoproteiny. Jeden z nich, LDL, zvyšuje riziko arteriosklerózy, pokud je oxidován volnými radikály. Vitamin E pravděpodobně snižuje riziko kardiovaskulárních nemocí tím, že chrání LDL proti oxidaci [4].

Při peroxidaci lipidů přeměňuje alkylperoxylové radikály LOO• na hydroperoxidy, se kterými si poradí GPx. Zneškodní tak peroxylové radikály mastných kyselin dříve, než mohou atakovat sousední „zdravé“ lipidy. Tokoferol se přitom mění na tokoferylový radikál [57].

Tokoferolový radikál je redukován ve spolupráci s vitaminem C [45].

Tokoferolový radikál jen inaktivní forma vitaminu E, tzn. že ztrácí svou antioxidační aktivitu. A protože molekul vitaminu E je v lipoproteinové částici jen omezený počet, je nesmírně důležité zajistit zpětnou redukci, tj. vlastně regeneraci vitaminu E. K tomu slouží obvykle kyselina askorbová, která se mění na askorbylový radikál. Protože vitamin E je lipofilní a kyselina askorbová hydrofilní, probíhá tato reakce na rozhraní dvou fází – lipidové v buněčné membráně nebo částici lipoproteinu a vodné v okolní cytoplazmě či krevní plazmě [42].



Obrázek 8 *Vitamin E [63].*

2.6.2.5 Beta-karoten a jiné karotenoidy

Karotenoidy jsou významnými lipofilními barvivy mnoha druhů ovoce a zeleniny. Vyskytují se ve všech fotosyntetizujících rostlinných pletivech, kde jsou přítomny jako

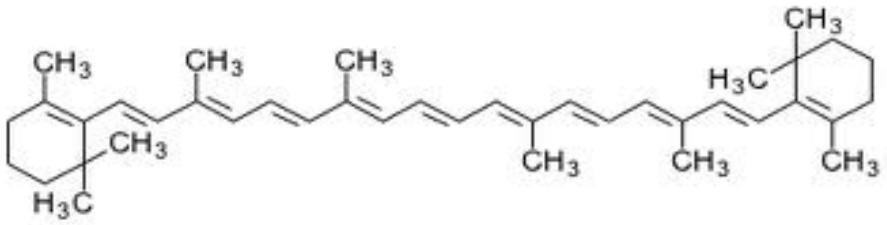
fotochemicky aktivní složky chromoplastů. Jejich přítomnost v zelených částech rostlin bývá často maskována chlorofylem. Sekundárně se karotenoidy vyskytují také v potravinách živočišného původu. Živočichové však nejsou schopni syntetizovat karotenoidy, pouze přeměňují potravou získané rostlinné pigmenty na látky odlišné struktury nebo je skladují jako takové [29].

Karotenoidy se svou strukturou řadí mezi terpeny (izoprenové sloučeniny). Mají lipofilní charakter, proto jsou nutné pro jejich vstřebání v tenkém střevě žlučové kyseliny a vůbec neporušená absorpce lipidů. Nejdůležitějšími karotenoidy jsou β-karoten, α-karoten, lykopen, lutein a zeaxantin [42].

Nejrozšířenější (v mrkvi zastoupen asi 85% ze všech karotenoidů) je β-karoten. Je také největším zdrojem vitaminu A, který z něho štěpením v organismu vzniká. Vitamin A (retinol) se v sítnici mění na retinal, který je důležitý pro vidění. β-karoten tvoří asi 90% všech karotenoidů lidské plazmy a jeho koncentrace při normální stravě s obsahem zeleniny odráží schopnost tenkého střeva absorbovat lipidy [42].

β-karoten hraje důležitou úlohu v antioxidační ochraně. Velice účinně zháší singletový kyslík a je schopen likvidovat i volné radikály. Ještě účinnějším karotenidem je lykopen, obsažený zejména v rajčatech, zatímco antioxidační schopnosti Vitaminu A jsou zanedbatelné. β-karoten kromě antioxidačního účinku působí jako inhibitor lipoxydázy a 3-hydroxy-3-metylglutarykoenzym A reduktázy, klíčového enzymu biosyntézy cholesterolu. Ukazuje se, že β-karoten pozitivně ovlivňuje mezibuněčnou komunikaci působením na specifické komunikační kanály. Tímto způsobem může bránit karcinogenezi [42].

Na základě četných epidemiologických studií lze předpokládat, že β-karoten může mít významnou úlohu v prevenci zhoubných nádorů [42].



Obrázek 9 *Beta-karoten [59].*

2.6.2.6 Ubichinon/ubichinol (koenzym Q)

Ubichinon (koenzym Q, CoQ) je ve skutečnosti celá rodina benzochinonů, lišících se délkou lipofilního izoprenového řetězce. U savců je nejrozšířenější koenzym Q10 s deseti pětiuhlíkovými izoprenovými jednotkami [57].

Koenzym Q10 je nezastupitelný v procesu buněčného dýchání v tzv. dýchacím řetězci. Při přenášení elektronů a vodíkových atomů, získaných při spalování živin, skrz vnitřní membránu mitochondrií, je získávána energie pro živé děje v buňce. Tato energie se ukládá do molekuly ATP. jako mobilní přenašeč elektronů mezi dalšími součástmi membrány funguje právě koenzym Q10. Zvláště důležitou roli hraje koenzym Q10 ve svalových buňkách, které potřebují mnoho energie. Naprosto klíčový je pro srdeční svalovinu, která získává 60 – 80% energie z ATP. Snížení obsahu koenzymu Q10 o 5% v myokardu může vést k poruše funkce srdce. Při 25% nedostatku koenzymu Q10 v organizmu je již značně snížena výkonnost i odolnost. Deficit tohoto koenzymu vyšší než 75% není slučitelný se životem [61].

Standardní koenzym Q10 se označuje jako ubichinon. Ubichinol je aktivní formou koenzymu Q10, což znamená, že na jeho aktivaci již nejsou potřebné další enzymy. Je označován také jako bioaktivní neoxidovaná (redukovaná) forma koenzymu Q10 na rozdíl od ubichinonu, která je formou oxidovanou [3].

Ubichinol se lépe vstřebává, protože se v organismu nemusí přeměňovat, tělo ho může rychleji a efektivněji využít. Což je důležité s postupujícím věkem, protože schopnost lidského těla přeměnit koenzym Q10 na účinnou formu se snižuje s věkem nebo také v souvislosti se zhoršujícím zdravotním stavem [3].

Koenzym Q je v přírodě obsažen ve všem, co dýchá, neboť pro tento proces zabezpečuje energii. Rostliny jsou vybaveny schopností tento enzym tvořit. Mikroorganismy, které jej rovněž potřebují k zajištění svých životních pochodů, jej získávají z půdy, z rostlin a z ostatních živých organismů. Lze shrnout, že koenzym Q je postupně předáván v celém potravinovém řetězci, na jehož konci je člověk [61].

Koenzym Q se dostává do buněk určitých orgánů v daleko vyšší koncentraci než do buněk orgánů jiných. Závisí to na jejich energetické potřebě. Nejvíce se jej tedy dostává do buněk srdce a jater [61].

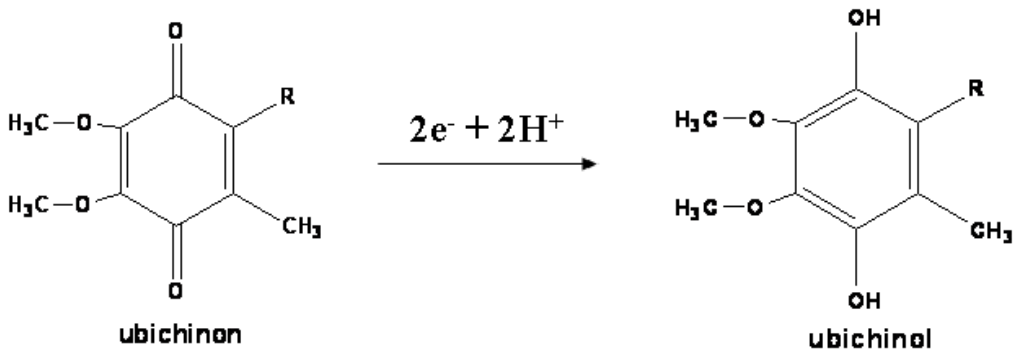
Dosud je známo 10 rozdílných forem koenzymu Q, označovaných Q1 – 10, které jsou rozdílně zastoupeny v živých organismech různého stupně fylogenetického vývoje [61]:

- mikroorganismy → Q1 – Q6

- kvasinky → Q6, Q7
- bakterie → Q8, Q9, Q10
- rostliny → Q9, Q10
- houby → Q7, Q8, Q9, Q10
- bezobratlí → Q9, Q10
- obratlovci → Q10

V lidském organismu byl zjištěn výhradně koenzym Q10. Prvním, kdo Q10 izoloval z lidského srdce, byl dr. Karl Folkers: „Vzhledem k různosti koenzymů Q fungujících u vývojově nižších druhů než je člověk, bylo třeba zjistit, který koenzym potřebuje lidské srdce, aby jej bylo možno léčebně využít.“ Přestože lidské buňky obsahují výhradně koenzym Q10, lidský organismus je schopen využít i ostatní koenzymy Q přiváděné v potravě: v játrech jsou postranní řetězce odděleny od základních molekul koenzymu a následně jsou utvořeny nové molekuly Q10. Zejména u starších lidí však tento chemický proces nemusí fungovat. Takže ti jedinci, kteří konzumují málo masa, mohou trpět nedostatkem koenzym Q10 [61].

Koenzym Q10 je vitamin, přestože se z klasické definice vitaminu jako látky důležité pro život, již musí organismus přijímat v potravě a není schopen ji sám syntetizovat, vymyká. Avšak schopnost syntézy Q10 se s věkem snižuje a ve stáří zaniká [61].



Obrázek 10 *Přechod ubichinonu na ubichinol prostřednictvím elektronů (probíhá jako dva jednoelektronové pochody, meziproduktem je semichinonový radikál) [45].*

2.6.2.7 Melatonin

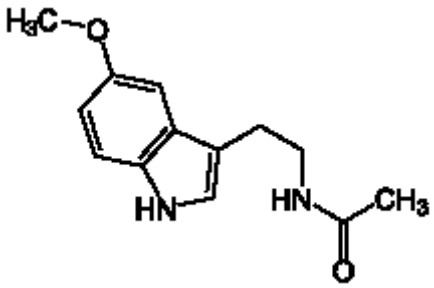
Melatonin, chemicky 5-methoxy-N-acetyltryptamin, je látka tělu vlastní. Vyskytuje se u řady organismů včetně savců. Jeho hladiny jsou silně závislé na střídání světla a tmy. Je důležitý pro udržení biorytmu (vnitřních hodin) a pravidelnosti spánku. V noci je hladina melatoninu v krvi výrazně zvýšená. Melatonin se též u savců podílí na regulaci celoročního rytmu, tedy střídání období léta a zimy [2].

Hlavní místo, kde se tento hormon tvoří je u člověka epifýza. Aktivita epifýzy je ovlivněna hypothalamem, který zprostředkovává informace o tom, kolik denního světla dopadá na sítnici. Denní světlo a sluneční svit tedy ovlivňuje náš spánek. Má rovněž velmi výraznou antioxidační aktivitu. Z tohoto důvodu je u pracovníků na nočních směnách možný zvýšený výskyt rakoviny, protože tento ochranný efekt je zeslaben. Je to jeden z nejdůležitějších regulátorů spánku. Se zvyšujícím se věkem klesá schopnost jeho tvorby a to je považováno za jeden z důvodů nespavosti u osob ve vyšším věku [2].

Podání melatoninu ve večerních hodinách může způsobit předběhnutí biologických hodin, podání v pozdních večerních hodinách a brzkých ranních hodinách pravděpodobně zpoždění hodin. Tohoto účinku se užívá k rychlé resynchronizaci vnitřních hodin s novým vnějším časem při letech přes časová pásma. Pravidelné podávání melatoninu jednou za 24 hodin k večeru může též synchronizovat volný chod biologických hodin savců žijících ve stálé tmě či slepých lidí s 24 hodinovým dnem. Melatonin podávaný před usnutím může zkrátit dobu usínání a případně snížit fragmentaci spánku, tj. zlepšit jeho kvalitu [22].

Laboratorní i klinická pozorování ukazují, že melatonin má rozsáhlé účinky na velké množství fyziologických funkcí. Ovlivňuje oběh krve, krevní tlak, tělesnou teplotu, metabolismus cukrů, tuků i bílkovin. Ovlivňuje produkci pohlavních hormonů, imunologické reakce organismu, průběh stárnutí, chování i psychologické reakce. Na základě některých laboratorních nálezů začal být melatonin prezentován ve vědeckém i bulvárním tisku jako téměř zázračný hormon ovlivňující stárnutí, nádorová onemocnění a imunitu [50].

Studie, které ukazovaly na to, že melatonin má onkostatické účinky vyvolané jak jeho vlivem na složitou činnost imunitního systému, tak jeho přímou inhibicí buněčného dělení, vyvolaly zájem desítek laboratoří a klinik. Teprve později se zjistilo, že nejdůležitější je jeho antioxidační působení. Tento hormon je považován za nejúčinnějšího zametače škodlivých kyslíkových radikálů. Je schopen stimulovat antioxidační enzymy a redukovat oxidační stres [50].



Obrázek 11 *Melatonin [33].*

2.6.2.8 Flavonoidy

V dnešní době je známo asi 4 000 flavonoidů působících jako významné antioxidanty. Skupina různorodých zástupců má ve své struktuře několik fenolových skupin, jenž zabraňují peroxidaci lipidů atakují volné radikály. Podílí se na obnově vitaminu E a C, působí protizánětlivě. Také jsou schopné vázat přechodné kovy a tak zabraňovat jejich přeměně na volné radikály. Mezi flavonoidy patří např. rutin, který je součástí léku Ascorutin. Ten je běžně podáván lidem s cévními problémy. Vysoký obsah flavonoidů se nachází v červeném víně, zeleném čaji a v borůvkách. Příjmem flavonoidů docílíme odstranění tuků z krve a tedy snížení rizika srdečního onemocnění [45].

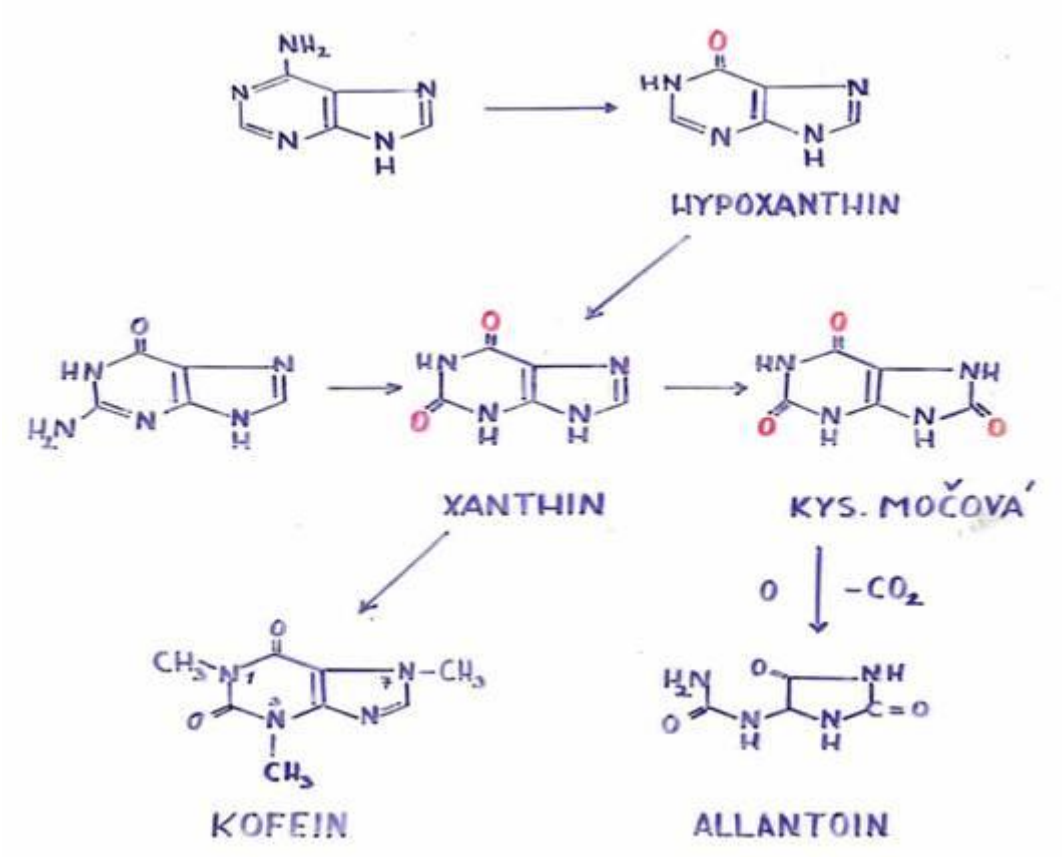
2.6.2.9 Kyselina močová

Kyselina močová je u člověka a primátů konečný katabolit purinových bází. Její úlohu v organismu však již delší dobu nechápeme jen jako čistě odpadní produkt, má totiž významnou úlohu v antioxidační ochraně organismu. Pro její význam svědčí i aktivní tubulární resorpce kyseliny močové, která zajišťuje vstřebání asi 90% množství profiltrovaného v glomerulech [42].

Kyselina močová vzniká v reakci katalyzované xantinoxidázou. Tento enzym katalyzuje přeměnu hypoxantinu na xantina pak až na kyselinu močovou. Enzym existuje i ve formě xantidehydrogenázy, pro kterou jako akceptor elektronů slouží koenzym NAD^+, za určitých okolností, např. při v ischemické tkáni, se mění na xantinoxidázu, která přenáší elektrony přímo na kyslík, a může tak katalyzovat vznik peroxidu vodíku či superoxidového radikálu. Tato reakce tedy dává vznik volným radikálům, na jejím konci je však kyselina močová, metabolit s významným antioxidačním účinkem [42].

Antioxidační působení kyseliny močové spočívá v přímé vazbě na volné radikály. Vzniklý urátový radikál je pak regenerován především kyselinou askorbovou. Důležitější je však schopnost kyseliny močové vázat ionty železa ve formě pevného chelátu. Tím brání produkci nebezpečného hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí, vazbou železa dále chrání kyselinu askorbovou před oxidací. Kyselina močová chrání před oxidací i α-tokoferol [42].

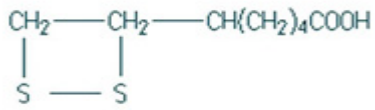
Kyselina močová tvoří 35 – 65% antioxidační kapacity plazmy. Její koncentrace stoupá po intenzivní tělesné námaze, v počáteční fázi diabetu, po kardiochirurgických operacích, v centrální nervové soustavě při mozkové ischemii, tzn. při stavech se zvýšenou zátěží volnými radikály. Člověk má vyšší hladinu v krvi než většina savců, kteří ji dále přeměňují urikázou na alantoin. Alantoin vzniká u člověka jen ve stopových množstvích jakožto výraz neenzymové destrukce kyseliny močové působením volných radikálů [42].



Obrázek 12 *Kyselina močová [34].*

2.6.2.10 Kyselina lipoová

K dalším nízkomolekulárním antioxidantům se řadí kyselina lipoová, která je široce rozšířeným koenzymem obsahujícím sulfidovou skupinu a vyskytuje se v prokaryotických i eukaryotických mikroorganismech, u rostlin i živočichů. Antioxidační aktivita kyseliny lipoové se projevuje několika způsoby. A to přímou reakcí s volnými radikály, vazbou přechodných kovů za současné tvorby chelátů, recyklaci jiných antioxidantů (tokoferylový radikál) a ovlivněním genové exprese. Kyselina lipoová reaguje s alkylperoxylovými radikály, askorbylovými radikály, tokoferylovými radikály a s kyselinou chlornou. Tokoferylový radikál regeneruje přímo nebo pomocí askorbátu [29].



Obrázek 13 *Kyselina lipoová [1].*

2.7 Reaktivní formy dusíku

2.7.1 Oxid dusnatý

Přestože je oxid dusnatý $NO^{\bullet}$ (nitric oxide) velmi jednoduchá molekula, syntezuje se v těla poměrně složitým enzymovým mechanismem. Teprve v 80. letech byla objevena a nyní studována jeho funkce v buněčné signalizaci. Oxid dusnatý a jeho metabolity jsou za určitých okolností prudce jedovatými látkami [29].

Protože součet elektronů dusíku (7 + 8 = 15) je lichý a do orbitalů se vejdou dvojice, oxid dusnatý musí být radikál. Přesto $NO^{\bullet}$ při svých koncentracích *in vivo* reaguje velmi pomalu s většinou biomolekul včetně kyslíku, neboť difuze oxidu dusnatého do krve a jeho inaktivace hemoglobinem je mnohem rychlejší než uvažované reakce. *In vivo* reaguje dostatečně rychle jen tranzitními kovy a radikály. Metabolity $NO^{\bullet}$ však jsou velmi reaktivní [57].

Molekula $NO^{\bullet}$ si získala pověst vysoce reaktivní a toxické molekuly na základě dvou pozorování *in vitro:*

A) Ve vysoké koncentraci oxid dusnatý rychle reaguje s kyslíkem na oxid dusičitý ($NO_2^{\bullet}$) a posléze na dusitan:

$$2NO^{\bullet} + O_2 \rightarrow 2NO_2^{\bullet}$$

B) Další zkušenost říká, že $NO^{\bullet}$ má krátký poločas v pokusech s perfuzí orgánů. Je pravda, že nasyceném vodném roztoku, tedy v koncentraci asi 2 mmol . l^{-1}, má poločas kratší než 1s. Avšak fyziologické koncentrace $NO^{\bullet}$, dosažené konstitutivními syntézami se pohybují v nmol . l^{-1} a poločas oxidu dusnatého v reakci s kyslíkem se prodlužuje s ředěním $NO^{\bullet}$ tak, že by se *in vivo* pohyboval kolem 70 hodin. Nízká koncentrace oxidu dusnatého *in vivo* postačuje k jeho regulačním funkcím a přitom neškodí [29].

Je nutno uvést, že přes poměrně malou příležitost k reakci *in vivo* má $NO^{\bullet}$ i v nízké fyziologické koncentraci biologický poločas pouze několik sekund. Příčinou však není interakce s biomolekulami, ale skutečnost, že je pohotově a průběžně vychytáván v erytrocytech. Pohotově totiž reaguje se železem oxyhemoglobinu. Vzniká methemoglobin a nitrát a jde o jeden z nějúčinnějších způsobů inaktivace $NO^{\bullet}$ a o jednu z podmínek jeho regulační funkce *in vivo*:

$$Hb\text{-}Fe(II)\text{-}O_2 + NO^{\bullet} \rightarrow Hb\text{-}Fe(II)\text{-}OONO \rightarrow Hb\text{-}Fe(III) + NO_3^-$$

Oxid dusnatý se stejně pohotově navazuje na hemové železo enzymu guanylátcyklázy (GC), což je podstata stimulace syntézy cGMP, vedoucí k relaxaci hladkého svalstva cév (vazodilataci), a mechanismu dalších regulací:

$$GC\text{-}hem\text{-}Fe(II) + NO^{\bullet} \rightarrow GC\text{-}hem\text{-}Fe(II)\text{-}NO$$

In vivo v přítomnosti akceptorů elektronů (NO_2^-, tranzitních kovů) se oxid dusnatý snadno slučuje s fenoly (tyrozinem), thioly (cysteinem, GSH, albuminem) a se sekundárními aminy:

$$NO^{\bullet} + GSH \rightarrow RSNO + H^+ + e^-$$

Glutathion (GSH) se snadno metabolizuje na radikál $GS^{\bullet}$ a ten s $NO^{\bullet}$ dává nitrosothiol (GSNO):

$$GS^{\bullet} + NO^{\bullet} \rightarrow GSNO$$

Reakcí se sulfhydrylovými skupinami (-SH) cysteinu, glutathionu, albuminu a dalších látek tak oxid dusnatý tvoří o něco stálejší nitrosothioly (nebolithionitrity), tyto látky s biologickým poločasem kolem 40 minut jsou zřejmě transportní formou $NO^{\bullet}$.

Mohou totiž předávat nitrosyl NO^+ jiným molekulám a tak sloužit jako přenašeče biologicky aktivního oxidu dusnatého [57].

2.7.2 Peroxynitrit

Patologicky je nejvýznamnější reakce $NO^\bullet$ se superoxidem, kdy vzniká toxický peroxynitrit:

$$NO^\bullet + O_2^{\bullet-} \rightarrow OONO^-$$

Fyziologické podmínky (pH = 7) nejsou pro vznik peroxynitritu výhodné vzhledem k nízké koncentraci $NO^\bullet$ a zejména superoxidu, avšak při intenzivní syntéze $NO^\bullet$ a $O_2^{\bullet-}$ (např. aktivovanými polymorfonukleáry) může koncentrace peroxynitritu dosáhnout významné mikromolekulární koncentrace. $NO^\bullet$ je jediná biologická molekula produkována v koncentraci postačující ke kompetici o superoxid se superoxiddismutázou. Peroxynitrit je oxidačním činidlem. Obecně se soudí, že za fyziologického pH se protonovaný peroxynitrit rozkládá na hydroxylový radikál a oxid dusičitý (také volný radikál):

$$OONO^- + H^+ \rightarrow HOONO \rightarrow HO^\bullet + NO_2^{\bullet-}$$

Peroxynitrit (spíše než $NO^\bullet$) je *in vivo* odpovědný za nitraci a hydroxylaci aminokyseliny tyrozinu. Přechodné kovy včetně kovů aktivních center superoxiddismutázy a myeloperoxidázy katalyzují jeho heterolytické štěpení na hydroxidový a nitroniový kation, kterému je připisována schopnost napadnout fenolové sloučeniny a *in vivo* v proteinech měnit například tyrozin na 3-nitrotyrozin:

$$HOONO \rightarrow NO_2^+ + OH^-$$

Lze však namítnout, že NO_2^+ se rychle slučuje s vodou na kyselinu dusičitou a za fyziologického pH má příliš krátký poločas, než aby mohl efektivně nitrovat biomolekuly. Existuje úvaha, že katalyzátorem nitrace je oxid uhličitý, který rychle reaguje s peroxynitritem za vzniku oxidujících a nitrujících meziproduktů včetně $NO_2^\bullet$ a $CO_3^{\bullet-}$. Kromě toho se tyto radikály ve vodném prostředí snadno přeměňují na dusitany (NO_2^-), dusičnany (NO_3^-), CO_2 a H_2O_2 [29].

2.8 FeTPPs

5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato iron (III) neboli FeTTPS patří spolu s 5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)porphyrinato iron (III) neboli FeTMPyP ke skupině katalyzátorů rozkladu peroxinitritu (peroxynitrite decomposition catalyst – PDCs) [60].

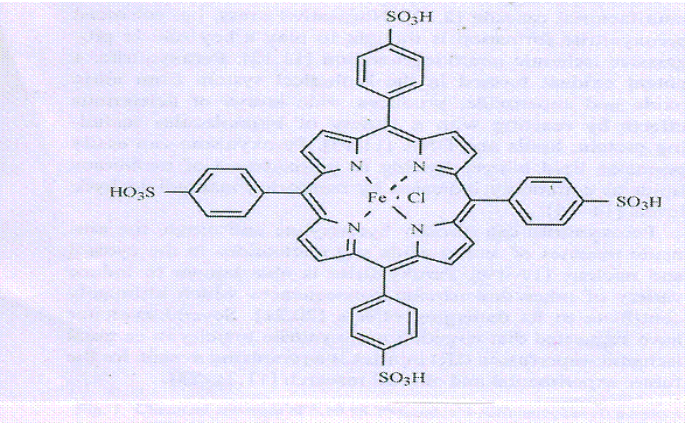
PDCs jsou účinnější než jiné látky, které redukují oxid dusnatý a superoxid, a tím i peroxynitrit. PDCs rozkládají peroxynitrit na oxid dusnatý a tím snižují rozklad na vysoce reaktivní meziprodukty jako je oxid dusičitý a hydroxylový radikál. Navíc k účinku rozkladu peroxynitritu, zmírňuje PDCs aktivitu superoxiddisutázy [60].

Kromě oxidačního účinku peroxynitritu se předpokládá, že regulaje některé fyziologické funkce. Peroxynitrit je uznáván jako cytotoxická látka a přispívá k patofyziologii mnoha nemocí. Zvýšená tvorba volných radikálů a peroxynitritu byla prokázána při poškození neuronů po mozkové ischemii. Peroxynitrit snadno proniká lipidovou dvouvrstvou, což vede její k peroxidaci. Sharma a kol. pozorovali signifikantní nárůst malondialdehydu (markeru peroxidace lipidů) po reperfúzi mozku u pískomilů. Výsledky byly v souladu s jejich předcházejícím experimentem, ve kterém došlo ke stejnému poklesu MDA po globální mozkové ischemii [46].

Thiyagarajan a kol.ve své studii v roce 2004 prokázali, že PDCs mají neuroprotektivní účinek při fokální mozkové ischemii u krys, to vyplývá ze signifikantního snížení edému a neurologického deficitu [60].

FeTTPS má protizánětlivé účinky a zmírňuje endoteliální dysfunkce [6].

El-Remessy a kol. ve své studii v roce 2010 prokázali, že aplikace FeTTPS diabetickým krysám nemění jejich hmotnost a hladinu cukru v krvi. Též prokázali, že FeTTPS zlepšuje vasorelaxaci postižených koronárních tepen u diabetických krys. Dále potvrdili, že FeTTPS obnovuje produkci oxidu dusnatého u diabetických krys [11].



Obrázek 14 *Chemická struktura FeTTPS*

3 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

3.1 Cíl práce

Cílem experimentální části diplomové práce je zjistit, zda se mění průtok krve mozkem po transcallosální stimulaci se zvyšující se frekvencí (3, 5, 10, 15Hz) a zda se mění odpověď po aplikaci FeTTPS. Dále zjistit, jestli je rozdíl ve sklonu křivky a prahu dráždivosti evokovaných potenciálů a jestli je rozdíl v počtu a době trvání následných výbojů (afterdischargů) před a po aplikaci FeTTPS.

3.2 Výzkumné otázky a stanovené hypotézy

3.2.1 Výzkumné otázky

a) Jaký vliv má aplikace FeTTPS na průtok krve mozkem?
b) K jakým změnám průtoku krve dochází po transcallosální stimulaci se zvyšující se frekvencí a jaké změny nastanou po aplikaci FeTTPS?
c) Jaký vliv má aplikace FeTTPS na sklon křivky a na práh dráždivosti evokovaných potenciálů a na počet a dobu trvání následných výbojů (afterdischargů)?

3.2.2 Hypotézy

a) Aplikace FeTTPS snižuje průtok krve mozkem.
b) Transcallosální stimulace senzorické kůry zvyšuje průtok krve mozkem.
c) Zvyšující se průtok krve mozkem po transcallosální stimulaci bude mít po aplikace FeTTPS tendenci ke snížení.
d) Sklon křivky a práh dráždivosti evokovaných potenciálů budou stejné před i po aplikaci FeTTPS.
e) Počet a doba trvání následných výbojů (afterdischargů) budou stejné před i po aplikaci FeTTPS.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Metodika a postup řešení

4.1.1 Metodologický princip

Diplomová práce je zpracována formou analyticko-experimentální studie v prostorách Fyziologického ústavu AVČR. Je rozdělena na část teoretickou a část praktickou.

V teoretické části je zpracována problematika reaktivních forem kyslíku – jednotliví zástupci, jejich vznik, fyziologické a patologické účinky, principy a zástupci antioxidačního systému. Dále jsou zde popsány reaktivní formy dusíku a FeTTPs (peroxynitrit dekomposition catalyst, 5, 10, 15, 20-tetrakis porphyrinato iron III).

V praktické části je zkoumán vliv aplikace FeTTPs na průtok krve mozkem, sklon křivky a práh dráždivosti evokovaných potenciálů, vliv na počet a dobu trvání následných výbojů (AD).

4.1.2 Sledovaný soubor

Do výzkumu bylo zařazeno celkem 34 mláďat laboratorních potkanů. Experimenty byly prováděny na Wistar albínských potkanech vážících 250 – 350g. Zvířata byla po celou dobu experimentu v kontrolovaném prostředí (teplota 22°C, vlhkost 50 – 60%, světlo od 6:00 do 18:00) s volným přístupem k jídlu a pití.

4.1.3 Chirurgická příprava sledovaného souboru

Potkanům byla provedena celková anestezie pomocí uretanu v množství 1,2g/kg, anestetikum bylo aplikováno intraperitoneálně.

Byla provedena kožní incize, která byla vedena sagitálně v mediální linii na lebce potkana. V okolí řezu se odstranily přebytečné měkké tkáně, očistila se kostní tkáň a pomocí elektrokoagulátoru se zastavilo krvácení z drobných cév.

Do lebky bylo vyvrtáno 6 otvorů, do kterých se epidurálně umístily elektrody. V oblasti nad pravou senzomotorickou kůrou byl 2mm od sebe epidurálně implantován jeden pár stimulačních elektrod. Nad obě hemisféry byly implantovány 4 snímací elektrody pro snímání evokovaných potenciálů. Nad levou hemisférou byla implantována první a druhá snímací elektroda. Nad pravou hemisférou třetí a čtvrtá snímací elektroda. Dále zemnící a referenční elektroda.

Takto připravená zvířata byla umístěna do stereotaktického rámu a na speciální podložku. Ta udržovala teplotu zvířete na 37°C. Teplota byla kontrolována pomocí rektálního teploměru. Sonda LDF byla extrakraniální přiložena na kontralaterální hemisféru od stimulačních elektrod [49].

4.1.4 Provedení experimentu

V první části experimentu byly monitorovány změny regionálního průtoku v průběhu transcallosální stimulace se vzrůstající frekvencí (3, 5, 10, 15 Hz) na 11 potkanech. Potkani byly před aplikací FeTTPs připojeni na stimulátor, který vytvářel bifázické impulzy o délce 0,5ms. Mezi každou změnou frekvence byla pauza o délce 3 minut. Následovala pauza o délce 10 minut a celý proces se vzrůstající frekvencí se opakoval. Poté se aplikoval 20mg/kg FeTTPS rozpuštěný v 1ml fyziologického roztoku. 30 minut po aplikaci FeTTPS následovala třetí stimulace se vzrůstající frekvencí, dále 10 minutová pauza a čtvrtá stimulace. Výsledky prvního a druhého měření (před aplikací FeTTPS) a výsledky třetího a čtvrtého měření (po aplikaci FeTTPS) se zprůměrovaly a byly zaneseny do grafu. Po skončení experimentu byla zvířata předávkována anestetikem.

V druhé části experimentu byly zjišťovány změny sklonu křivky a změny prahu dráždivosti evokovaných potenciálů před a po aplikaci FeTTPS (20mg/kg v 1ml fyziologického roztoku). A dále změny počtu a doby trvání následných výbojů (afterdischargerů). EP a AD byly změřeny před aplikací FeTTPS, 30 minut a 180 minut po aplikaci. Do této části experimentu bylo zařazeno 23 potkanů. První (experimentální) skupině potkanů (n=12) bylo aplikováno FeTTPS (20mg/kg FeTTPS rozpuštěno v 1ml fyziologického roztoku). Druhé (kontrolní) skupině (n=11) byl aplikován fyziologický roztok. Výsledky byly zprůměrovány, porovnány a zaneseny do grafu. Po skončení experimentu byla zvířata předávkována anestetikem.

4.1.5 Záznam a zpracování dat

Den po chirurgické přípravě byla zvířata umístěna do plexisklového boxu o rozměrech 18x28x35cm s přívodem a odvodem vzduchu. Box zamezoval rotaci zvířete, které bylo napojeno na záznamový systém. Změny regionálního mozkového krevního průtoku byly monitorovány během transcallosální stimulace s narůstající frekvencí. Stimulátor (A-M Systems, Australia) vytvářel stimulační bifázické pulzy o délce 0,5ms. Během měření byla snímána mozková aktivita pomocí EEG ze čtyř snímacích elektrod.

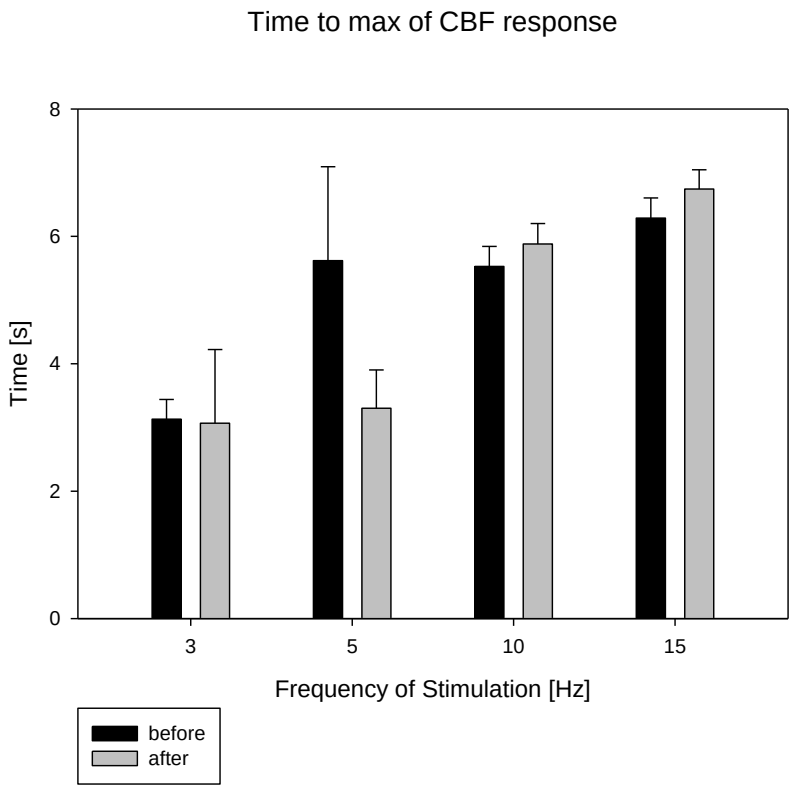
Signály byly digitalizovány na 16bitovém převodníku (TDT, USA) se vzorkovací frekvencí 2kHz. Tento přístroj obsahuje dva signálové procesory, které umožňují úpravu signálu za reálného času. Proto byl signál EEG filtrován pásmovou propustí v rozsahu 2 – 500Hz. Záznamy byly prohlíženy v programu Matlab (Mathworks, USA). Pro statistické porovnání dat byl použit t-test. Pro srovnání lineárních regresí vstupně výstupních křivek byla použita analýza kovariace (ANOVA) [49].

5 VÝSLEDKY

5.1 Vliv transcallosální stimulace senzomotorické kůry se zvyšující se frekvencí na průtok krve mozkem před a po aplikaci FeTTPS

Hodnocený parametr byla změna průtoku krve mozkem reagující na zvyšující se frekvenci transcallosální stimulace senzomotorické kůry. Průtok byl měřen LDF na kontralaterální hemisféře. Z grafu 1 vyplývá, že před aplikací FeTTPS při transcallosální stimulaci dochází ke zvyšování průtoku krve mozkem při všech frekvencích (3, 5, 10, 15 Hz). To potvrzuje naši druhou hypotézu.

A dále z grafu vyplývá, že po aplikaci FeTTPS také dochází ke zvyšování průtoku krve mozkem při všech frekvencích, hodnoty se liší nepatrně od hodnot před aplikací FeTTPS. Rozdíl hodnot před a po aplikaci FeTTPS průtoku krve mozkem není signifikantně významný (Tabulka 4). Což neodpovídá předpokládané hypotéze.

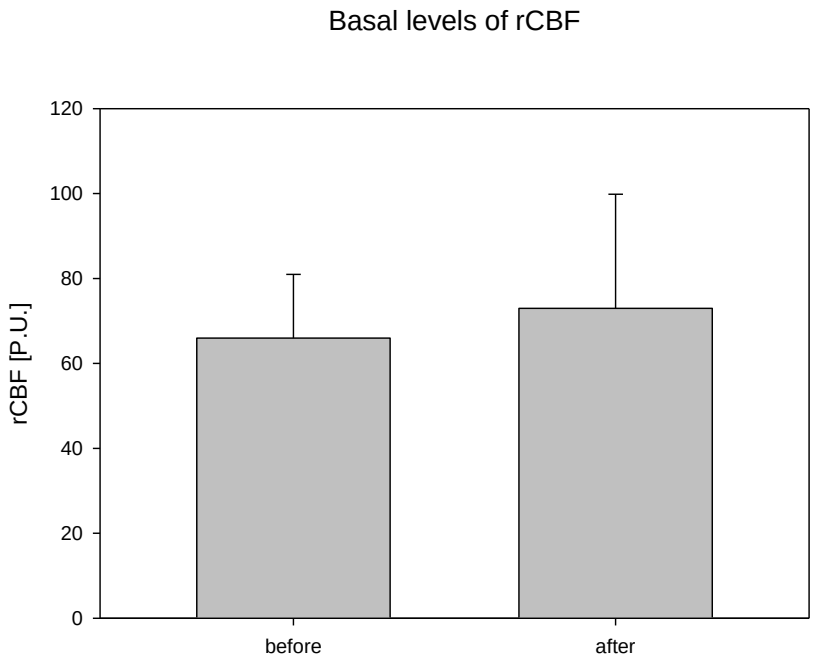


Graf 1 *Změny času v odpovědi průtoku krve mozkem při transcallosální stimulaci se zvyšující se frekvencí před a po aplikaci FeTTPS*

	before	after	before - after
frequency [Hz]	time to max [s]	time to max [s]	
3	3,130	3,067	0,063
5	5,620	3,302	2,318
10	5,528	5,882	-0,354
15	6,287	6,743	-0,456

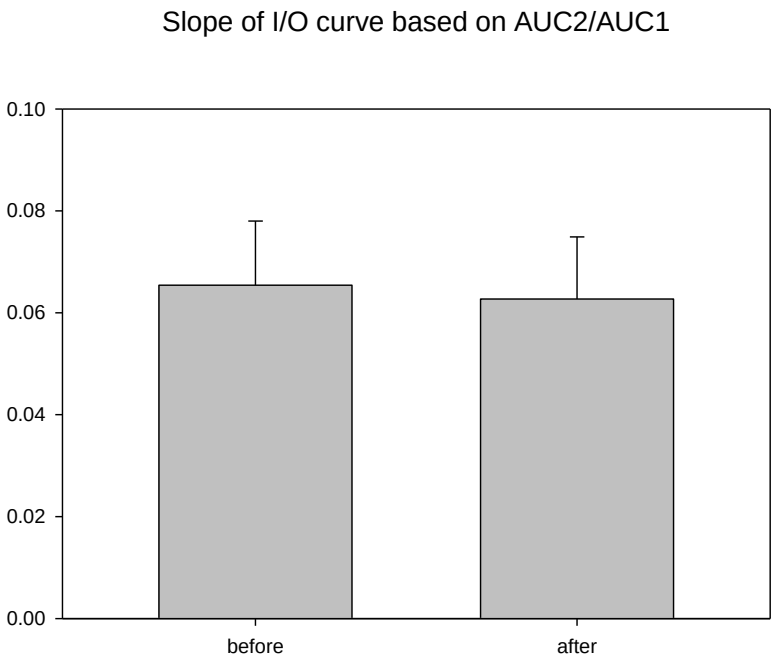
Tabulka 4 *Rozdíl time to max před a po aplikaci FeTTPS při transcallosální stimulaci se zvyšující se frekvencí (3, 5, 10, 15Hz)*

Graf 2 znázorňuje bazální průtok krve mozkem v perfúzních jednotkách před a po aplikaci FeTTPS. Rozdíl v hodnotách není signifikantně významný.

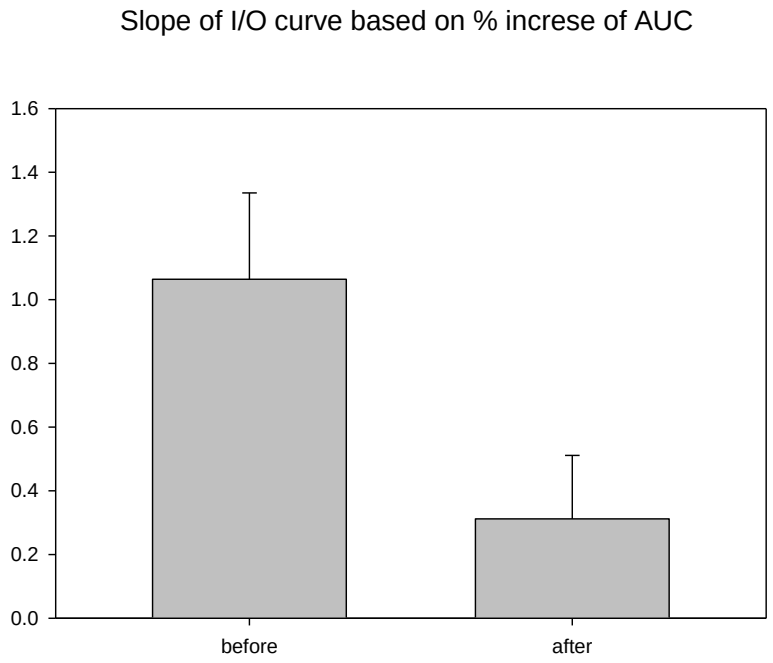


Graf 2 *Bazální průtok krve mozkem v perfúzních jednotkách před a po aplikaci FeTTPS*

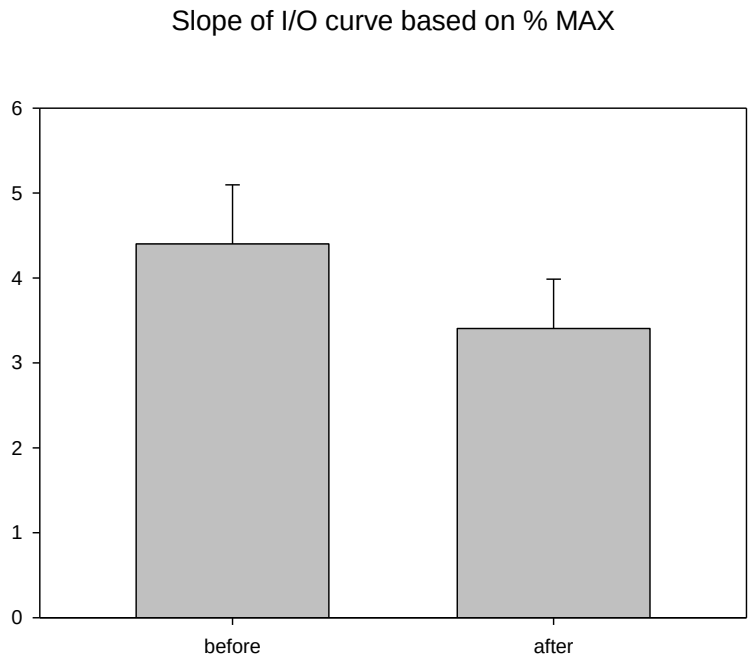
Graf 3 znázorňuje sklon vstupní a výstupní křivky na základě podílu AUC2/AUC1. AUC2 je obsah plochy pod křivkou průtoku krve mozkem při stimulaci. AUC1 je obsah plochy při bazálním průtoku krve mozkem. Rozdíl hodnot před a po aplikaci FeTTPS není signifikantně významný.



Graf 3 *Sklon vstupní a výstupní křivky na základě podílu AUC2/AUC1 před a po aplikaci FeTTPS*



Graf 4 *Sklon vstupní a výstupní křivky na základě procentuálního zvýšení AUC před a po aplikaci FeTTPS*

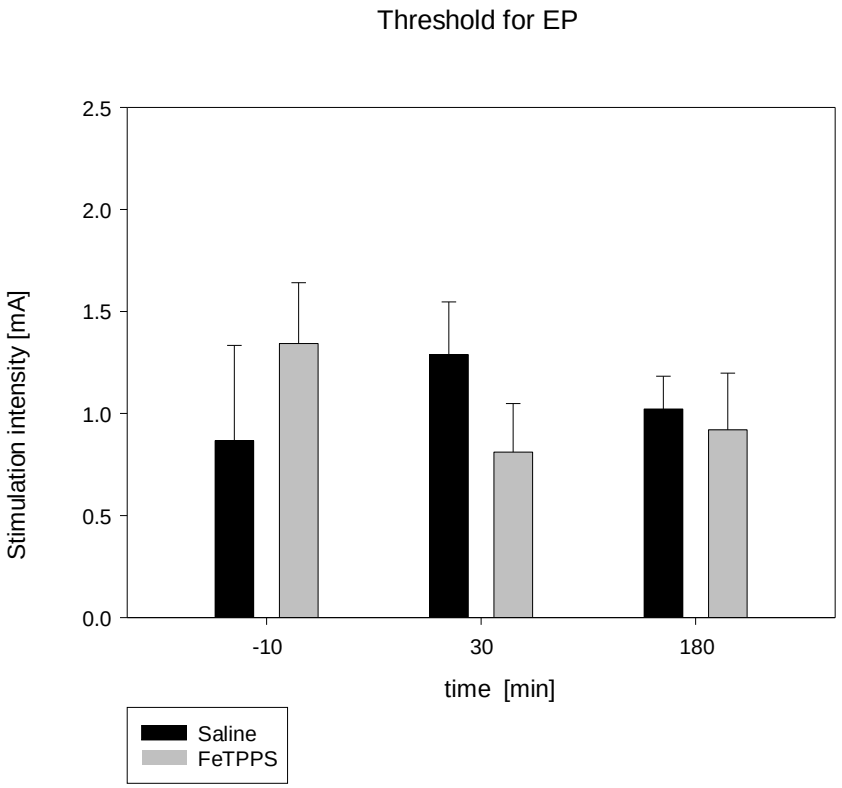


Graf 5 *Sklon vstupní a výstupní křivky na základě procentuálního maxima před a po aplikaci FeTTPS*

5.2 Vliv aplikace FeTTPS na sklon křivky a práh dráždivosti evokovaných potenciálů a na počet a dobu trvání následných výbojů (afterdischargů)

Pro zjištění účinku FeTTPS na sklon křivky a práh dráždivosti EP a počet a dobu trvání AD jsme u experimentální skupiny (12 zvířat) sledovali rozdíl hodnot před aplikací látky, 30 a 180 minut po aplikaci. U kontrolní skupiny (11 zvířat) jsme sledovali rozdíl hodnot před aplikací fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci.

Graf 6 a tabulka 5 ukazují práh dráždivosti EP u experimentální a kontrolní skupiny před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci. Rozdíl hodnot není signifikantně významný. To odpovídá naší hypotéze.

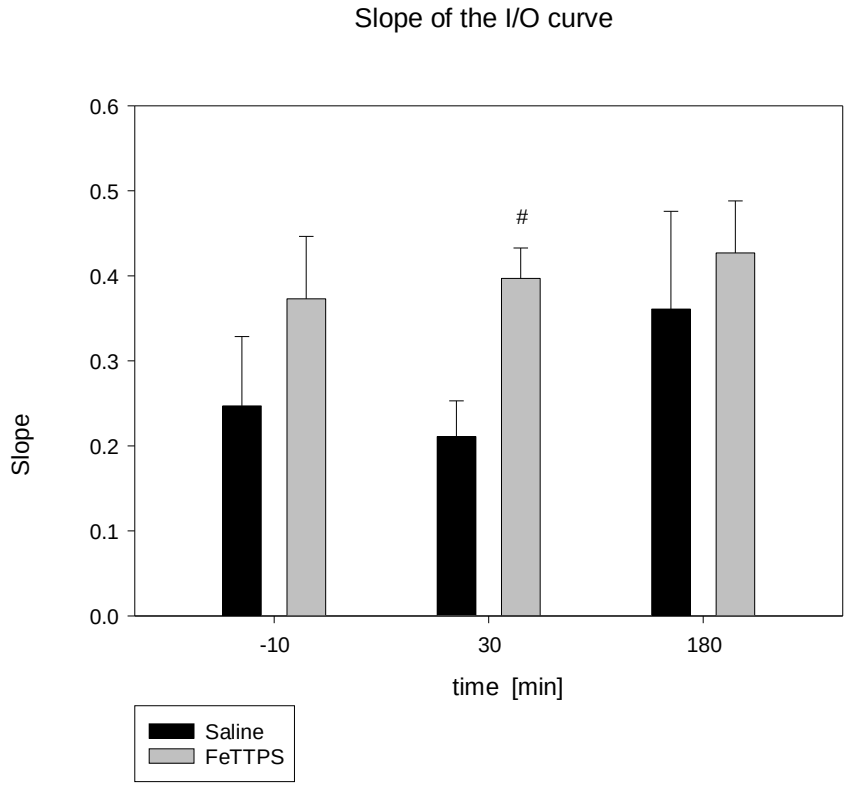


Graf 6 *Práh dráždivosti evokovaných potenciálů před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci*

	saline	FeTTPS	saline - FeTTPS
before	0,867	1,343	-0,476
30 min	1,289	0,811	0,478
180 min	1,022	0,920	0,102

Tabulka 5 *Rozdíl prahů dráždivosti EP (mA) před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 18é minut po aplikaci*

Graf 7 a tabulka 6 znázorňují sklon vstupní a výstupní křivky EP před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci. Signifikantní rozdíl nastává u 30 minuty po aplikaci látek.

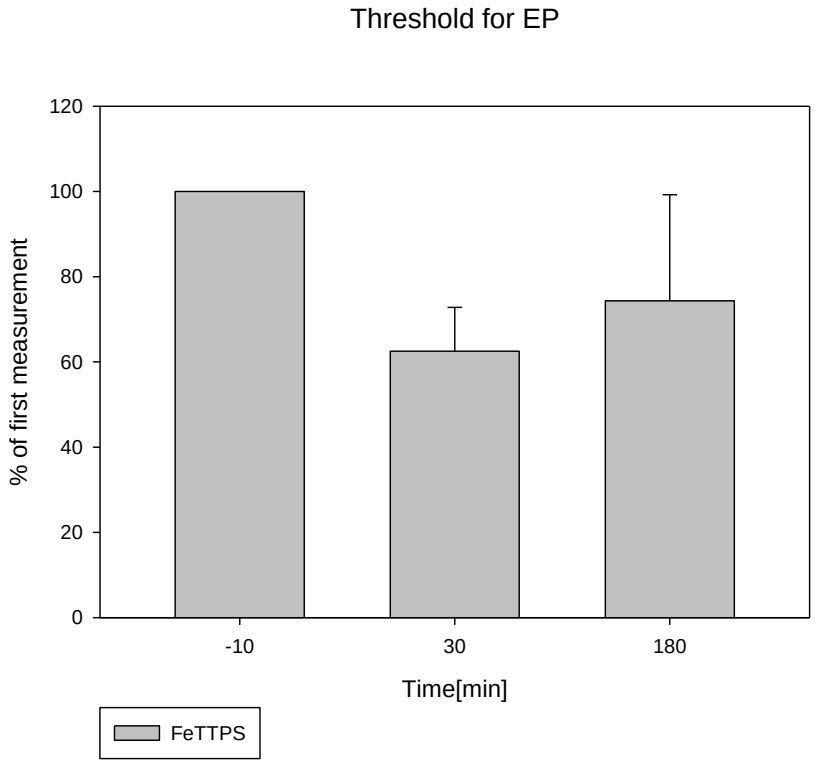


Graf 7 *Sklon vstupní a výstupní křivky EP před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci*

	saline	FeTTPS	saline - FeTTPS
before	0,247	0,373	-0,126
30 min	0,211	0,397	-0,186
180 min	0,361	0,427	-0,066

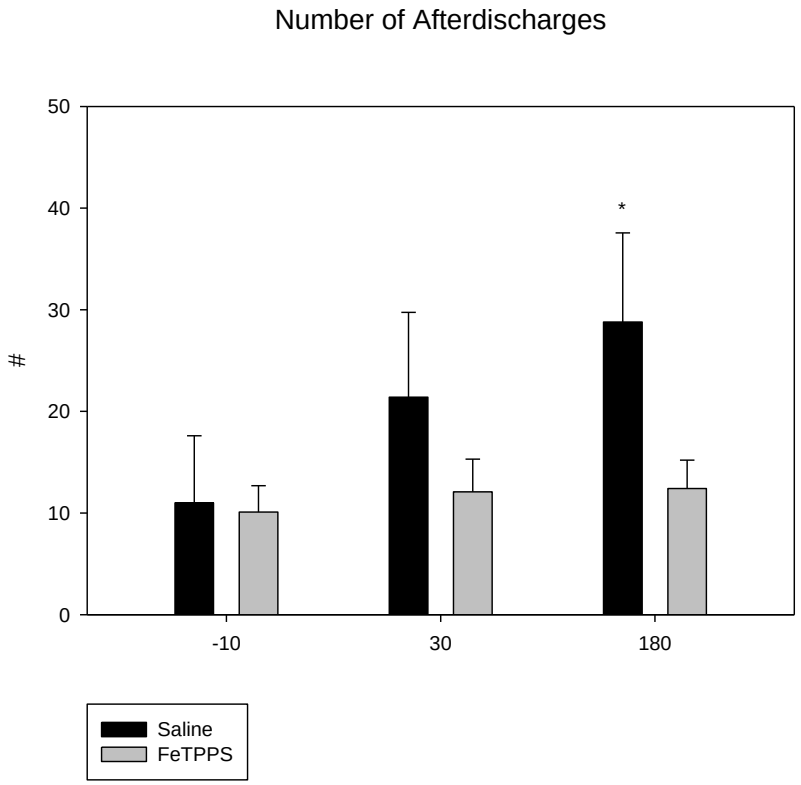
Tabulka 6 *Rozdíl ve sklonu vstupní a výstupní křivky EP před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci*

Graf 8 názorně ukazuje, že změny prahu dráždivosti evokovaných potenciálů mají po aplikaci FeTTPS klesající tendenci. Tato klesající tendence však není signifikantně významná.



Graf 8 *Změny prahu dráždivosti evokovaných potenciálů po aplikaci FeTTPS, procentuální srovnání před, 30 a 180 minut po aplikaci*

Graf 9 a tabulka 7 ukazují počet následných výbojů před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci. U kontrolní skupiny dochází po aplikaci fyziologického roztoku k nárůstu počtu následných výbojů po 30 i 180 minutách. U experimentální skupiny se počty následných výbojů po 30 a 180 minutách téměř nemění. To je v rozporu s naší poslední hypotézou, podle které jsme uvažovali, že počet následných výbojů u experimentální a kontrolní skupiny, měřené před aplikací fyziologického roztoku a FeTTPS, se bude rovnat.

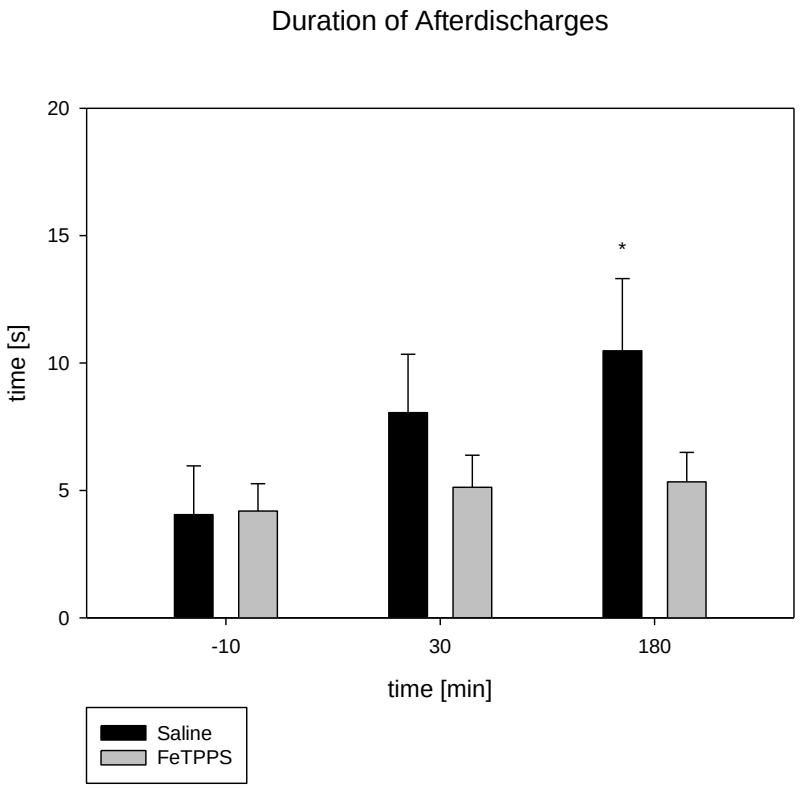


Graf 9 *Počet následných výbojů (afterdischarges) před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci*

	saline	FeTTPS	saline - FeTTPS
before	11,000	10,091	0,909
30 min	21,400	12,083	9,317
180 min	28,800	12,417	16,383

Tabulka 7 *Rozdíl v počtu následných výbojů před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci*

Graf 10 a tabulka 8 znázorňuje dobu trvání následných výbojů před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci. U kontrolní skupiny dochází po aplikaci fyziologického roztoku k prodloužení doby trvání po 30 i 180 minutách. U experimentální skupiny zůstává doba trvání po aplikaci FeTTPS téměř stejná. Což je v rozporu s naší hypotézou.



Graf 10 *Doba trvání následných výbojů (afterdischarges) před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci*

	saline	FeTTPS	saline - FeTTPS
before	4,052	4,192	-0,14
30 min	8,053	5,121	2,932
180 min	10,482	5,339	5,143

Tabulka 8 *Rozdíl v čase (v sekundách) následných výbojů před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci*

6 DISKUZE

První z cílů experimentální části diplomové práce bylo zjistit, k jakým změnám průtoku krve mozkem dochází při transcallosální stimulaci se zvyšující se frekvencí a k jakým změnám dochází po aplikaci FeTTPS. Základní úvahou byly dvě hypotézy:

• Transcallosální stimulace senzomotorické kůry se zvyšující se frekvencí zvyšuje průtok krve mozkem.

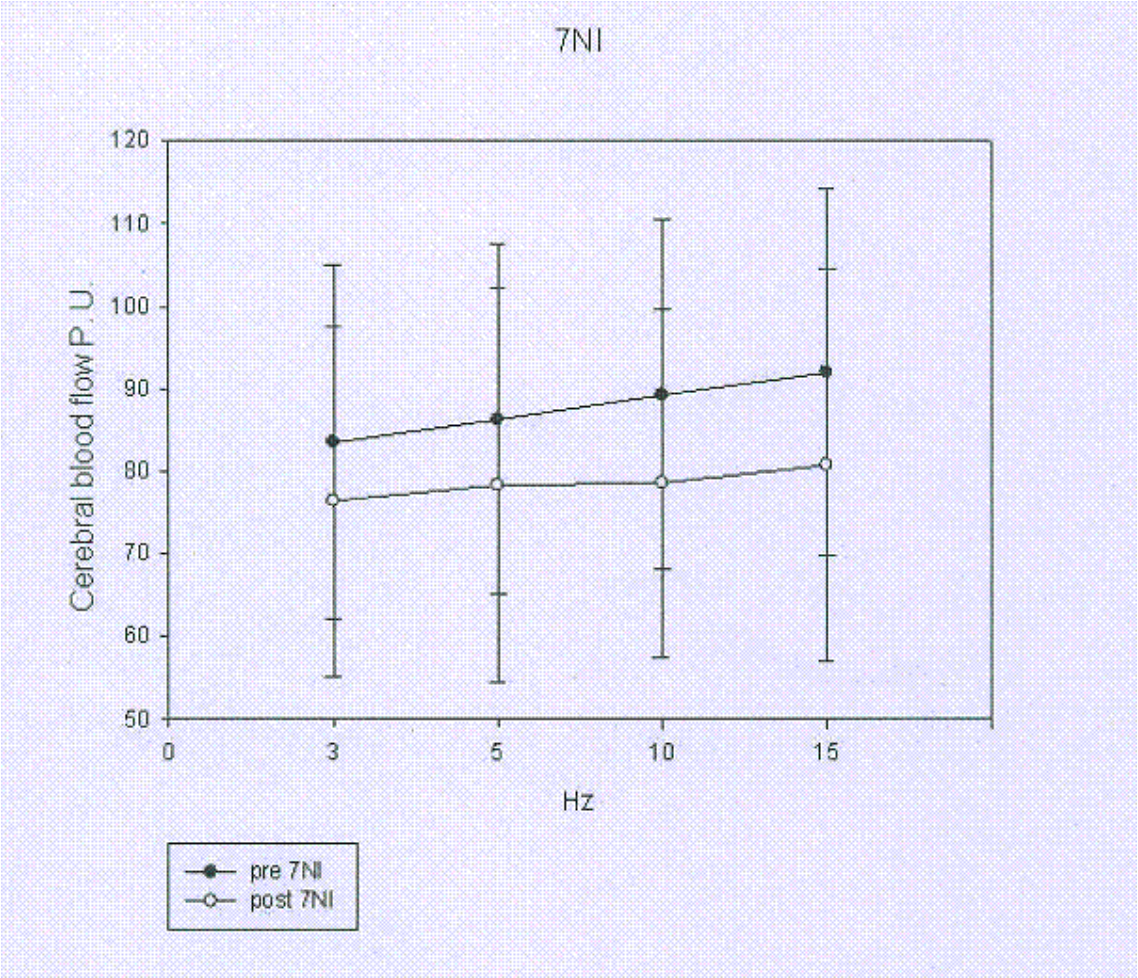
Tato hypotéza se nám potvrdila, což je evidentní z grafu 1. Stimulace senzomotorického kontralaterálního kortexu vyvolala signifikantní zvýšení průtoku u kontrolní skupiny. Z výsledků vyplývá, že čím vyšší je frekvence stimulace, tím více vzrůstá hodnota bazálního průtoku.

• Zvyšující se průtok krve mozkem při transcallosální stimulaci bude mít tendenci ke snížení

Tato hypotéza se nepotvrdila. Po aplikaci FeTTPS dochází ke zvyšování průtoku při všech frekvencích. Rozdíl v hodnotách před a po aplikaci při všech frekvencích není signifikantně významný. Z grafu 1 a tabulky 4 vyplývá, že aplikace FeTTPS nemá signifikantní vliv na průtok krve mozkem při transcallosální stimulaci.

Podobný experiment prováděla ve své diplomové práci Strnadová (2011). Sledovala změny průtoku krve mozkem, které reagují na zvyšující se frekvenci transcallosální stimulace před a po aplikaci 7-nitroindazolu. 7-NI je relativně specifický inhibitor neuronální syntázy oxidu dusnatého. Výsledky potvrdily zvyšující se průtok krve mozkem při všech frekvencích před aplikací 7-NI. Po aplikaci 7-NI došlo ke snížení průtoku ve srovnání s kontrolní skupinou. Snížení však nebylo signifikantní (graf 11).

Jak dále Strnadová uvádí, je několik aspektů, které mohly ovlivnit validitu jejích a našich výsledků. Prvním z faktorů může být extrakraniální přiložení sondy LDF. Dalším z faktorů, který může měření ovlivnit, je teplota v oblasti měření.



Graf 11 *Změna průtoku krve mozkem před a po aplikaci 7-NI při transcallosální stimulaci*

Další cílem diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv má aplikace FeTTPS na sklon křivky a práh dráždivosti evokovaných potenciálů a jaký vliv má aplikace FeTTPS na počet a dobu trvání následných výbojů. Naše hypotézy byly:

• Sklon křivky a práh dráždivosti evokovaných potenciálů se po aplikaci FeTTPS nezmění.

Hypotéza se potvrdila. Aplikace FeTTPS nemá signifikantní vliv na sklon křivky a práh dráždivosti evokovaných potenciálů (graf 6 a tabulka 5, graf 7 a tabulka 6). Jen jeden rozdíl hodnot byl signifikantně významný, a to při měření vstupní a výstupní křivky evokovaných potenciálů ve 30 minutách po aplikaci FeTTPS a fyziologického roztoku. Toto mohlo nastat chybou měření.

• Počet a doba následných výbojů (afterdischarges) se po aplikaci FeTTPS nezmění.

Následný výboj je prolongovaná odpověď v nervovém vláknu po skončení stimulace. K ověření této hypotézy jsme použili srovnání experimentální a kontrolní

skupiny potkanů. Experimentální skupině jsme změřili počet a dobu trvání následných výbojů před aplikací FeTTPS, 30 a 180 minut po aplikaci. Hodnoty byly při všech časech téměř stejné. U kontrolní skupiny potkanů byl postup stejný, jen se jim aplikoval fyziologický roztok. Počet následných výbojů a doba trvání se zvětšili ve 30 i 180 minutách. Předpokládali jsme nárůst hodnot i u experimentální skupiny (graf 9 a tabulka 7, graf 10 a tabulka 8). Naše hypotéza se nepotvrdila.

FeTTPS patří do skupiny katalyzátorů rozkladu peroxynitritu. Peroxynitrit je oxidační činidlo, vzniká reakcí superoxidu s oxidem dusnatým. Aplikací FeTTPS se potlačí vznik výše uvedených volných radikálů, a to podle našich výsledků snižuje počet a dobu trvání následných výbojů ve srovnání s aplikací fyziologického roztoku.

7 ZÁVĚR

Reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku (RONS) jsou fyziologickou součást životních dějů a významnými ochrannými prostředky organismu. Byla odhalena řada úrovní, kde lze škodlivé oxidaci zasáhnout. Antioxidační ochrana zastavuje tvorbu ROS (inhibitory enzymů), odstraňuje již vznikající radikály (vychytávače – scavengery), zablokuje propagaci radikálových reakcí (tokoferol) a posiluje oslabenou imunitu (antioxidanty, vitamíny).

Prvním cílem experimentální části diplomové práce bylo zjistit, zda FeTTPS, katalyzátor rozkladu peroxynitritu, má vliv na průtok krve mozkem při transcallosální stimulaci. Výsledky ukazují, že transcallosální stimulace se zvyšující se frekvencí zvyšuje průtok krve mozkem. Rozdíl v hodnotách průtoku krve mozkem při transcallosální stimulaci před a po aplikaci FeTTPS není signifikantně významný.

Dalším cílem bylo zjistit, zda FeTTPS ovlivňuje sklon křivky a práh dráždivosti evokovaných potenciálů a zda ovlivňuje počet a dobu trvání následných výbojů. Vliv FeTTPS na sklon křivky a práh dráždivosti evokovaných potenciálů není ve srovnání s fyziologickým roztokem signifikantně významný. Hypotéza, kterou jsem si stanovili, se potvrdila. Počet a doba trvání následných výbojů se po 30 i 180 minutách po aplikaci fyziologického roztoku zvětšuje. Počet a doba trvání následných výbojů po 30 a 180 minutách po aplikaci FeTTPS zůstávají stejné. To je v rozporu s naší poslední hypotézou. FeTTPS snižuje počet a dobu trvání následných výbojů se srovnání s fyziologickým roztokem.

SEZNAM LITERATURY

1. *Ala kyselina alfa lipoová univerzální antioxidant* [online]. Doktorka.cz. [cit.2012-04-30]. Dostupné z: http://vitaminy.doktorka.cz/ala-kyselina-alfa-lipoova-univerzalni-antioxidant/

2. ARNDT, Tomáš. *Melatonin* [online]. Celostní medicína, 2009. [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: http://www.celostnimedicina.cz/melatonin.htm

3. ARNDT, Tomáš. *Ubiquinol* [online]. Celostní medicína, 2009. [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: http://www.celostnimedicina.cz/ubiquinol.htm

4. ARNDT, Tomáš. *Vitamin E (tocoferolum aceticum, tokoferol)* [online]. Celostní medicína, 2008. [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: http://www.celostnimedicina.cz/vitamin-e-tocoferolum-aceticum-tokoferol.htm

5. COVARRUBIAS, Luis. *Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active?*. Developmental Biology 320. 2008, 2., 1 - 11.

6. CUZZORCREA, Salvatore, Emanuela MAZZON, Rossana DI PAOLA, Emanuela ESPOSITO, Heather MACARTHUR, George MATUSCHAK a Daniela SALVEMINI. *A Role for Oxide-Mediated Peroxynitrite Formation in a Model of Endotoxin-Induced Shock*. The Journal of Phafmacology and Experimental Therapeutics. 2006, č. 1, s. 9. DOI: 10.1124/jpet.106.108100.

7. ČULÍK, Jan. *Je stárnutí způsobené oxidačním stresem?* [online]. Britské listy. [cit. 2012-02-16]. Dostupné z: http://www.britskelisty.cz/0009/20000904f.html

8. DUCHEN, Michael. *Mitochondria in health and disease: Perspectives on a new mitochondrial biology*. Molecular aspects of medicine. 2004, č. 25, s. 86.

9. DVOŘÁKOVÁ, Zuzana. *Srovnání metod pro stanovení malonyldialdehydu ve vzorcích krevního séra*. Brno, 2009. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie. Vedoucí práce Jan Lochman.

10. ECO, Umberto. Jak napsat diplomovou práci. Olomouc: Votonia, 1997. Velká řada, 27. svazek. ISBN 80-7198-173-7.

11. EL-REMESSY, Azza, Huda TAWFIK, Suraporn MATRAGOON, Bindu PILLAI, Ruth CALDWELL a William CALDWELL. *Peroxynitrite Mediates Diabetes-Induced Endothelial Dysfunction: Possible Role of Rho Kinase Activation*. Hindawi Publishing Corporation. 2010, č. 5, s. 9. DOI: 10.1155/2010/247861.

12. FOŘT, Petr. *Pro sportovce – oxidační stres* [online]. Celostní medicína, 2007. [cit. 2012-04-02]. Dostupné z: http://www.celostnimedicina.cz/pro-sportovce-oxidativni-stres-rndr-petr-fort-csc.htm

13. GALLOVÁ, Lucie. *Modulace funkční aktivity fagocytů látkami s protizánětlivými a antioxidačními účinky.* Brno, 2006. Disertační práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Antonín Lojek.

14. GORDON, Grant R. J., Sean J. MULLIGAN a Brian A. MACVICAR. *Astrocyte Control of the Cerebrovasculature*. Glia. 2007, č. 55, s. 7. DOI: 10.1002/glia.

15. HAYDON, Philip G. a Giorgio CARMIGNOTO. *Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling*. Physiological Reviews. 2005, č. 86, s. 24. ISSN 0031-9333. DOI: 10.1152/physrev.00049.2005.

16. HOLEČEK, Václav. *Oxidační stres, jeho stanovení a účinek*. Československá fyziologie. 2009, roč. 58, č. 2, s. 53 - 59.

17. HOLEČEK, Václav. *Oxidační stres u nádorových onemocnění.* Klin. Biochem. Metab. 2010, roč. 18, č. 4, s. 225 - 230.

18. HOLEČEK, Václav. *Volné radikály a antioxidanty* [online]. Celostní medicína, 2005. [2011-12-05]. Dostupné z: http://www.celostnimedicina.cz/volne-radikaly-a-antioxidanty-mudr-vaclav-holecek-csc.htm.

19. HOLEČEK, Václav. *Volné radikály, antioxidanty a jak dále?*. Klinická biochemie a metabolismus. březen 2006, č. 3, s. 5.

20. HOLEČEK, Václav. *Volné radikály, antioxidanty, jejich účinky a možnost jejich sledování metodami FORT a FORD* [online]. [cit. 2012-03-15]. Dostupné z: http://dotdiag.cz/img/prednasky/O2_radik__ly_u_diabetu_CR3000.pdf.

21. HOLEČEK, Václav a Richard ROKYTA. *Volně radikálová teorie stárnutí.* ČEZ GER REV. 2005, č. 3, s. 7.

22. ILLNEROVÁ, Helena. *Melatonin, jeho tvorba a působení* [online]. Chemické listy, 1996. [cit. 2012-03-05]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/Bulletin/bulletin273/melatoni.html

23. KAMENÍKOVÁ, Ludmila. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění* [online]. Solutio, 2001. [cit. 2012-03-06]. Dostupné z: http://www.medon-solutio.cz.

24. KOTTOVÁ, M., J. POUROVÁ a M. VOPRŠÁLOVÁ. *Oxidační stres a jeho role v respiračních onemocněních*. Česká a slovenská farmacie. 2007, roč. 56, č. 5, s. 215 - 219.

25. KOVÁCS, Richard, Ismini PAPAGEORGIOU a Uwe HEINEMANN. *Slice Cultures as a Model to Study Neurovascular Coupling and Blood Brain Barrier In Vitro*. Cardiovascular Psychiatry and Neurology. 2010, č. 646958, s. 9. DOI: 10.1155/2011/646958.

26. *Kyslíkové radikály* [online]. 2007. [cit. 2011-12-10]. Dostupné z: http://www.almikro.eu/img/Kyslikove_radikaly.pdf

27. LANGER, Ladislav. *Vzrůstající role vitamínů jako antioxidantů* [online]. Celostní medicína, 2005. [cit. 2012-04-02]. Dostupné z: http://www.celostnimedicina.cz/vzrustajici-role-vitaminu-jako-antioxidantu-mudr-ladislav-langer.htm

28. LEDVINA, Miroslav, Alena STOKLASOVÁ a Jaroslav CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*: 1.díl. Vydání 1. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0851-0.

29. LÍZALOVÁ, Martina. *Aplikace vybraných metod k analýze oxidačního stresu*. Brno, 2010. Disertační práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Antonín Lojek.

30. MAŇÁSKOVÁ, Dana. *Oxidační stres* [online]. [cit. 2012-03-14]. Dostupné z: http://medicinman.cz/?p=leky-latky/oxidacni-stres

31. MASOPUST, Jiří. *Reaktivní formy kyslíku (volné kyslíkové radikály* [online]. Klinická biochemie, 2005 [cit. 2011-09-15]. Dostupné z: lekarny.zdravcentra.cz

32. MCKERSIE, Brian.*Oxidative stress* [online]. 2009. [cit.2012-01-31]. Dostupné z: http://www.plantstress.com.

33. *Melatonin* [online]. Wikipedia. [cit. 2012-04-29]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/melatonin

34. *Metabolismus nukleových kyselin* [online]. Interaktivní elektronická učebnice biochemie. [cit.2012-04-02]. Dostupné z: http://orion.chemi.muni.cz/e_learning/=Texty/19-Metabolismus%20nukleotidů/Metab%20Nukl1a.htm

35. MICHALÍK, Petr, Zdeněk ROUB a Václav VRBÍK. Zpracování diplomové a bakalářské práce na počítači. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni, Fakulta pedagogická, 2006. ISBN 978-80-7043-458-1.

36. ONDRUŠ, Jan. *Oxidační stres a antioxidanty* [online]. Atletický trénink, 2007. [cit. 2012-03-26]. Dostupné z: http://www.atletickytrenink.cz/Regenerace/antioxidanty.php

37. *Oxidační stres* [online]. Genscan.com. [cit. 2012-02-03]. Dostupné z: http://www.genscan.com/cz/oxidacni-stres.

38. PAVELKOVÁ, Alena. *Využití chemiluminiscence při studiu fotodynamické produkce reaktivních forem kyslíku.* Olomouc, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Fakulta přírodovědecká, Katedra fyzikální chemie. Vedoucí práce Martina Bancířová.

39. *Peroxidace lipidů* [online]. eStránky.cz. [cit. 2012-01-28]. Dostupné z: http://www.biology.estranky.cz/clanky/biochemie/peroxidace-lipidu.html.

40. *Peroxid vodíku* [online]. Wikipedia. [cit.2012-04-03]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Peroxid_vodíku

41. PLÁTENÍK, Jan. *Volné radikály, antioxidanty a stárnutí*. Interní medicína pro praxi. 2009, č. 1, s. 4.

42. RACEK, Jaroslav. *Oxidační stres: a možnosti jeho ovlivnění*. První vydání. Praha: Galén, 2003. ISBN 80-7262-231-5.

43. RACEK, Jaroslav a Václav HOLEČEK. *Enzymy a volné radikály*. Chemické listy. 1999, č. 93, s. 774 - 780.

44. *Reaktivní formy kyslíku a dusíku* [online]. Wikiskripta. [cit. 2011-10-11]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Reaktivni_formy_kysliku_a_dusiku.

45. RICHTEROVÁ, Lenka. *Reaktivní sloučeniny kyslíku*. Brno, 2008. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Petr Zbořil.

46. SHARMA, Shyam, Arti DHAR a Ravinder KAUNDAL. FeTTPS protects against global cerebral ischemic-reperfusion injury in gerbils. Pharmatological Research. 2007, č. 55, s. 8. DOI: 10.1016/j.phrs.2007.01.002.

47. SKOUMALOVÁ, Alice. *Problematika volných radikálů a antioxidantů v medicíně* [online]. 2006. [cit. 2012-02-05]. Dostupné z: http://www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/radikaly.ppt.

48. STEJSKAL, Pavel. *Koenzym Q10 a jeho využití v lékařské praxi* [online]. Celostní medicína, 2007. [cit. 2012-03-07]. Dostupné z: http://www.celostnimedicina.cz/koenzym-q10-a-jeho-vyuziti-v-lekarske-praxi-doc-mudr-pavel-stejskal-csc.htm

49. STRNADOVÁ, Petra. *Vliv oxidu dusnatého na průtok krve mozkem při neuronální aktivitě.* Praha, 2011. Diplomová práce. Fakulta tělesné výchovy a sportu. Vedoucí práce Jakub Otáhal.

50. STRUNECKÁ, Anna. *Melatonin – hormon tmy a spánku* [online]. Celostní medicína, 2010. [cit. 2012-03-06]. Dostupné z: http://www.celostnimedicina.cz/melatonin-hormon-tmy-a-spanku.htm

51. STRUNECKÁ, Anna a Jiří PATOČKA. *Doba jedová*. Vydání 1. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2011. ISBN 978-80-7387-469-8.

52. *Superoxid* [online]. Wikipedia. [cit. 2012-04-03]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/superoxid

53. *Superoxiddismutáza* [online]. Vydavatelství VŠCHT. [cit.2012-05-01]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/grafy/superoxiddismutasa.2.graph.html

54. ŠÁCHA, Petr. *Koenzym Q10* [online]. Celostní medicína, 2005. [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: http://www.celostnimedicina.cz/koenzym-q-10.htm

55. ŠEBKOVÁ, Sylva. *Vitamin C* [online]. Celostní medicína, 2005. [cit. 2012-03-05]. Dostupné z: http://www.celostnimedicina.cz/vitamin-c.htm.

56. ŠMARDOVÁ, Lenka. *Reaktivní sloučeniny kyslíku, fyziologické a patologické aspekty*. Brno, duben 2011. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Vedoucí práce Petr Zbořil.

57. ŠTÍPEK, Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci*. První vydání. Praha: Grada Publishing, 2000. ISBN 80-7169-704-4.

58. TAUFER, Ivan, Josef KOTYK a Milan JAVŮREK. *Jak psát a obhajovat závěrečnou práci: bakalářskou, diplomovou, rigorózní, disertační, habilitační.* První vydání. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2009. ISBN 978-80-7395-157-3.

59. *Terpény* [online]. O škole. [cit.2012-05-06]. Dostupné z: http://www.oskole.sk/index.php?id_cat=53&clanok=5921

60. THIYAGARAJAN, Meenakshisundaram, Chaman LAL KAUL, Shyam Sundar SHARMA. *Neuroprotective efficacy and therapeutic time window of peroxynitrite docomposition catalysts in focal cerebral ischemia in rats*. British Journal Of Pharmacology. 2004, č. 142, s. 13.

61. TOMŠÍK, Pavel. *Vše o koenzym Q10* [online]. Vitainfo.cz. [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: http://vitainfo.cz/eshop/detail.php?idzb=57

62. *Vitamín C* [online]. Wikipedia. [cit.2012-04-12]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/vitamin_C

63. *Vitamin E (E307)- Alpha-Tokopherol-Chemical Structure* [online]. About.com.Chemistry. [cit.2012-05-02]. Dostupné z: http:// http://chemistry.about.com/od/factsstructures/ig/Chemical-Structures---V/Vitamin-E--E307-.htm

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled a rozdělení antioxidačního systému

Tabulka 2 Klasifikace superoxiddismutázy

Tabulka 3 Reakce superoxiddismutázy

Tabulka 4 Rozdíl time to max před a po aplikaci FeTTPS při transcallosální stimulaci se zvyšující se frekvencí (3, 5, 10, 15Hz)

Tabulka 5 Rozdíl v prahu dráždivosti EP (v mA) před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci

Tabulka 6 Rozdíl ve sklonu křivky EP před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci

Tabulka 7 Rozdíl v počtu následných výbojů před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci

Tabulka 8 Rozdíl v době trvání následných výbojů před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Lewisova elektronová konfigurace superoxidu

Obrázek 2 Peroxid vodíku

Obrázek 3 Vznik ROS enzymovou a neenzymovou cestou

Obrázek 4 Schéma peroxidace lipidů

Obrázek 5 Radikálové poškození buněk

Obrázek 6 Enzymové antioxidační systémy

Obrázek 8 Vitamin E

Obrázek 9 Beta – karoten

Obrázek 10 Přechod ubichinonu na ubichinol prostřednictvím elektronů

Obrázek 11 Melatonin

Obrázek 12 Kyselina močová

Obrázek 13 Kyselina lipoová

Obrázek 14 Chemická struktura FeTTPS

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Změny času v odpovědi průtoku krve mozkem při transcallosální stimulaci se zvyšující se frekvencí před a po aplikaci FeTTPS

Graf 2 Bazální průtok krve mozkem v perfúzních jednotkách před a po aplikaci FeTTPS

Graf 3 Sklon vstupní a výstupní křivky na základě podílu AUC2/AUC1

Graf 4 Sklon vstupní a výstupní křivky na základě procentuálního zvýšení AUC před a po aplikaci FeTTPS

Graf 5 Sklon vstupní a výstupní křivky na základě procentuálního maxima před a po aplikaci FeTTPS

Graf 6 Práh dráždivosti EP před a po aplikaci FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci

Graf 7 Sklon vstupní a výstupní křivky EP před aplikací FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci

Graf 8 Změny prahů dráždivosti EP po aplikaci FeTTPS, procentuální srovnání před, 30 a 180 minut po aplikaci

Graf 9 Počet následných výbojů (afterdischarges) před a po aplikaci FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci

Graf 10 Doba trvání následných výbojů (afterdischarges) před a po aplikaci FeTTPS a fyziologického roztoku, 30 a 180 minut po aplikaci

Graf 11 Změna průtoku krve mozkem před a po aplikaci 7-NI při transcallosální stimulaci