

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Mgr. Andrea Nagy**

**2013**

**Univerzita Karlova v Praze  
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program

**Lékařská chemie a biochemie**

**Bioindikátory zánětu, oxidačního a nitračního stresu u potkana kmene Wistar po celotělovém a lokálním ozáření plic**

**Bioindicators of inflammation, oxidative and nitrosative stress in Wistar rats after whole-body and lung irradiation**

**Mgr. Andrea Nagy (roz. Babicová)**

Školitel: doc. Ing. Jaroslav Chládek, Ph.D.

Hradec Králové, 2013

Obhajoba dne:

**Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 8.2.2013

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu svému školiteli, doc. Ing. Jaroslavu Chládkovi, PhD., za odborné vedení a cennou pomoc, kterou mi věnoval během celého doktorandského studia. Zároveň bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Jiřině Vávrové, CSc., za její odbornou pomoc a také celému kolektivu Ústavu radiobiologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové za spolupráci. Mé díky také patří doc. MUDr. Martině Řezáčové, PhD. a celému kolektivu Ústavu lékařské biochemie za podporu během mého studia. Poděkování dále patří mé kolegyni Ing. Zuzaně Havlínové a všem pracovníkům Ústavu lékařské farmakologie za pomoc a laboratorní zázemí, které mi poskytli. A v neposlední řadě patří poděkování mé rodině za veškerou podporu a porozumění.

Tato dizertační práce byla finančně podpořena grantem MO OVUOFVZ2008, výzkumným záměrem MŠMT 0021620820, vnitřním grantem Roche Lékařské fakulty v Hradci Králové a granty SVV-2011-262901 a SVV-2012- 264901.

## Obsah

<b>1. KAPITOLA: TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>12</b>
1.1 ÚVOD.....	12
1.2 IONIZUJÍCÍ GAMA ZÁŘENÍ, RADIAČNÍ PNEUMONITIDA A FIBRÓZA.....	13
1.3 RADIOPROTEKCE .....	15
1.4 CYTOKINY, ZÁNĚTLIVÁ REAKCE A FIBROGENEZE .....	18
1.5 OXIDAČNÍ A NITRAČNÍ STRES PŘI FYZIOLOGICKÝCH A PATOFYZIOLOGICKÝCH POCHODECH.....	21
1.6 BIOINDIKÁTORY ZÁNĚTU, OXIDAČNÍHO A NITRAČNÍHO STRESU PO CELOTĚLOVÉM ČI LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ .....	26
1.6.1 <i>Produkty lipoperoxidace</i> .....	26
1.6.2 <i>Oxid dusnatý a další dusíkaté látky</i> .....	27
1.6.3 <i>Další dusíkaté látky</i> .....	30
1.6.4 <i>Arginin</i> .....	31
1.6.5 <i>Antioxidanty</i> .....	32
1.7 EXPERIMENTÁLNÍ ZVÍŘATA .....	33
<b>2. KAPITOLA: CÍLE VÝZKUMNÉ PRÁCE .....</b>	<b>35</b>
<b>3. KAPITOLA: METODOLOGIE.....</b>	<b>36</b>
3.1. ZVÍŘATA.....	36
3.2. ZDROJ ZÁŘENÍ .....	36
3.3. UKONČENÍ EXPERIMENTU .....	37
3.4. VYDECHOVANÝ OXID DUSNATÝ.....	37
3.5. VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	38
3.5.1. <i>Malondialdehyd (MDA)</i> .....	38
3.5.2. <i>Arginin</i> .....	39
3.5.3. <i>Koncentrace dusičnanů/dusitanů (NOx)</i> .....	41
3.5.3.1. <i>Homogenizace tkání pro HPLC stanovení NOx</i> .....	41
3.6. STANOVENÍ CELKOVÉ BÍLKOVINY (TP).....	42
3.7. STANOVENÍ EXPRESE PROTEINŮ POMOCÍ METODY WESTERN BLOT .....	43
3.7.1. <i>Homogenizace tkání pro elektroforézu</i> .....	43
3.7.2. <i>Western blot</i> .....	44
3.8. STANOVENÍ EXPRESE PROTEINŮ POMOCÍ METODY RT-PCR .....	46
3.8.1. <i>Homogenizace tkání pro RT-PCR</i> .....	47
3.8.1.1. <i>Optimalizace homogenizace tkáně pro izolaci RNA</i> .....	47
3.8.2. <i>Izolace RNA z plicní tkáně</i> .....	48
3.8.2.1. <i>Izolace RNA pomocí kitu</i> .....	48
3.8.2.2. <i>Měření koncentrace a čistoty RNA</i> .....	49
3.8.2.3. <i>Přepis RNA do cDNA</i> .....	49
3.8.3. <i>RT-PCR</i> .....	50
3.9. HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ .....	51
3.10. STATISTICKÁ ANALÝZA .....	52
<b>4. KAPITOLA: VÝSLEDKY .....</b>	<b>53</b>
4.1. CELOTĚLOVÉ OZÁŘENÍ.....	53
4.1.1. <i>Porovnání změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu vyvolaných ionizujícím zářením s účinky bakteriálního LPS u potkana kmene Wistar</i> .....	53
4.1.1.1. <i>Projekt pokusu</i> .....	53
4.1.1.2. <i>Výsledky</i> .....	54
4.1.2. <i>Sledování ochranného vlivu vybraných radioprotektivních látek proti následkům celotělového ozáření potkana Wistar</i> .....	60
4.1.2.1. <i>Projekt pokusu</i> .....	60
4.1.2.2. <i>Výsledky</i> .....	61
4.2. LOKÁLNÍ OZÁŘENÍ .....	65

4.2.1.	<i>Sledování změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu ve fázi rozvoje radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku u potkana kmene Wistar</i>	65
4.2.1.1.	<i>Projekt pokusu</i>	65
4.2.1.2.	<i>Výsledky</i>	66
4.2.2.	<i>Sledování radioprotektivního účinku studovaných látek ve fázi radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku potkana kmene Wistar</i>	72
4.2.2.1.	<i>Projekt pokusu</i>	72
4.2.2.2.	<i>Výsledky</i>	73
<b>5.</b>	<b>KAPITOLA: DISKUZE</b>	<b>77</b>
5.1.	CELOTĚLOVÉ OZÁŘENÍ	77
5.1.1.	<i>Porovnání změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu vyvolaných ionizujícím zářením s účinky bakteriálního LPS u potkana kmene Wistar</i>	77
5.1.2.	<i>Sledování ochranného vlivu vybraných radioprotektivních látek proti následkům celotělového ozáření potkana Wistar</i>	79
5.2.	LOKÁLNÍ OZÁŘENÍ	82
5.2.1.	<i>Sledování změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu ve fázi rozvoje radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku u potkana kmene Wistar</i>	82
5.2.2.	<i>Sledování radioprotektivního účinku studovaných látek ve fázi radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku potkana kmene Wistar</i>	84
<b>6.</b>	<b>KAPITOLA: ZÁVĚRY</b>	<b>86</b>
	<b>Literatura</b>	<b>88</b>
	<b>Příloha</b>	<b>102</b>
	CELOTĚLOVÉ OZÁŘENÍ	102
	<i>Porovnání změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu vyvolaných ionizujícím zářením s účinky bakteriálního LPS u potkana kmene Wistar</i>	102
	Souhrn výsledků	102
	Lineárně-kvadratický model dávkové závislosti	103
	<i>Sledování ochranného vlivu vybraných radioprotektivních látek proti následkům celotělového ozáření potkana Wistar</i>	104
	Souhrn výsledků	104
	LOKÁLNÍ OZÁŘENÍ	105
	<i>Sledování změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu ve fázi rozvoje radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku u potkana kmene Wistar</i>	105
	Souhrn výsledků	105
	Výsledky RT-PCR	106
	Infiltrace zánětlivými buňkami	107
	Vzdušnost plicní tkáně	107
	<i>Sledování radioprotektivního účinku studovaných látek ve fázi radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku potkana kmene Wistar</i>	108
	Souhrn výsledků	108
	Výsledky RT-PCR	109
	Expres argináz v plicní tkáni u skupiny ALC v 7. týdnu po lok. ozáření hrudníku dávkou 15 Gy	110
	Infiltrace zánětlivými buňkami	110
	PUBLIKACE	111

## Použité zkratky

<b>AA</b>	aminokyselina (aminoacid)
<b>AG</b>	Aminoguanidine
<b>ADMA</b>	asymetrický dimethylarginin
<b>ALC</b>	acetyl-L-karnitin (acetyl - L - carnitine)
<b>ARDS</b>	syndrom akutní respirační tísně (acute respiratory distress syndrom)
<b>BAL</b>	tekutina z bronchoalveolární laváže
<b>B-cell</b>	B lymfocyt
<b>BH4</b>	Tetrahydrobiopterin
<b>CaM</b>	kalmodulin (calmodulin)
<b>CAT</b>	transportér pro kationické aminokyseliny (cationic amino acid transporter)
<b>DDAH</b>	dimethylarginin dimethylaminohydroláza
<b>DRF</b>	redukční faktor dávky (dose reduction factor)
<b>DSB</b>	dvojlátkové zlomy DNA (double-strand breaks)
<b>EDRF</b>	endoteliální relaxační faktor
<b>eNOS</b>	endoteliální NOS
<b>GIT</b>	gastrointestinální trakt
<b>GPx</b>	glutathion peroxidáza
<b>GSH</b>	redukováný glutathion
<b>GSSG</b>	oxidovaný glutathion
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxid vodíku
<b>HO<sup>·</sup></b>	hydroxylový radikál
<b>HOCl</b>	kyselina chlorná
<b>HPLC</b>	vysokotlaká/vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high pressure/performance liquid chromatography)
<b>CHOPN</b>	chronická obstrukční plicní nemoc
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	interferon $\gamma$
<b>Ig</b>	Imunoglobulin
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B kináza
<b>IL</b>	Interleukin
<b>iNOS</b>	inducibilní NOS, NOS II (inducible nitric oxide synthase)
<b>IS</b>	imunitní systém
<b>I<math>\kappa</math>B</b>	inhibitor nukleárního faktoru $\kappa$ B
<b>JAK</b>	Janusova kináza
<b>JAK- STAT</b>	komplex Janusova kináza-transkripční faktor
<b>KAT</b>	kataláza
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>LD</b>	letální dávka
<b>LD<sub>50/30</sub></b>	střední letální dávka
<b>L-NAME</b>	methylester nitro- L-argininu (NG -L-argininmethylester)
<b>L-NMMA</b>	L- monomethylarginin (NG-monomethyl L-arginine)
<b>LPS</b>	Lipopolysacharid
<b>LT</b>	Leukotrien
<b>MDA</b>	Malondialdehyd
<b>Mr</b>	molekulární hmotnost

<b>mRNA</b>	<u>m</u> ediátorová <u>R</u> NA
<b>mtNOS</b>	<u>m</u> itochondriální <u>N</u> OS
<b>NADPH, NADP<sup>+</sup></b>	kofaktor nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
<b>NFκB</b>	<u>n</u> ukleární faktor <u>κ</u> B
<b>nNOS</b>	<u>n</u> euronální <u>N</u> OS
<b>NO<sup>+</sup></b>	Nitrosyl
<b>NOHA</b>	<u>N</u> <u>o</u> mega <u>h</u> ydroxy- <u>L</u> - <u>a</u> rginin
<b>NOS</b>	syntáza oxidu dusnatého ( <u>n</u> itric <u>o</u> xide <u>s</u> ynthase)
<b>NT</b>	<u>N</u> itro <u>t</u> yrozin
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	singletový kyslík
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	superoxidový radikál
<b>O<sub>3</sub></b>	Ozón
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	peroxynitrit (peroxodusitan)
<b>PBS</b>	pufrovaný fyziologický roztok ( <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
<b>PCR</b>	polymerázová řetězová reakce ( <u>p</u> olymerace <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
<b>PG</b>	<u>p</u> rostaglandin
<b>PPB</b>	počet částic na bilion ( <u>p</u> arts <u>p</u> er <u>b</u> illion)
<b>PRMT</b>	<u>p</u> rotein- <u>a</u> rginin <u>m</u> ethyl <u>t</u> ransferáza
<b>RF</b>	<u>r</u> adiační <u>f</u> ibróza
<b>RNS</b>	reaktivní formy dusíku ( <u>r</u> eactive <u>n</u> itrogen <u>s</u> pecies)
<b>RO<sup>•</sup></b>	alkoxylový radikál
<b>RONOO<sup>-</sup></b>	Alkylperoxonitrit
<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku ( <u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies)
<b>RP</b>	<u>r</u> adiační <u>p</u> neumonitida
<b>RT-PCR</b>	PCR v reálném čase ( <u>R</u> eal <u>T</u> ime <u>P</u> CR)
<b>SSB</b>	jednovláknové zlomy DNA ( <u>s</u> ingle- <u>s</u> trand <u>b</u> reaks)
<b>SH</b>	thiolová skupina
<b>SOD</b>	<u>s</u> uper <u>o</u> xid <u>d</u> ismutáza
<b>STAT</b>	transkripční faktor STAT ( <u>s</u> ignal <u>t</u> ransducer and <u>a</u> ctivator of <u>t</u> ranscription)
<b>T-cell</b>	T lymfocyt
<b>TGF-β</b>	transformující růstový faktor β ( <u>t</u> ransforming growth <u>f</u> actor β)
<b>TNF-α</b>	<u>t</u> umor <u>n</u> ekrotizující <u>f</u> aktor <u>α</u>



## Seznam tabulek

TABULKA 1 REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU .....	21
TABULKA 2 REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU .....	21
TABULKA 3 ANTIOXIDAČNÍ ENZYMY .....	22
TABULKA 4 ANTIOXIDAČNÍ SUBSTRÁTY .....	23
TABULKA 5 PŘEHLED SYNTÁZ OXIDU DUSNATÉHO .....	29
TABULKA 6 PŘEHLED ZVÍŘECÍCH MODELŮ – MALÁ ZVÍŘATA .....	33
TABULKA 7 PŘEHLED ZVÍŘECÍCH MODELŮ – VELKÁ ZVÍŘATA .....	34
TABULKA 8 ROZDĚLENÍ ZVÍŘAT DO SKUPIN – CELOTĚLOVÉ OZÁŘENÍ .....	54
TABULKA 9 ROZDĚLENÍ ZVÍŘAT DO SKUPIN – APLIKACE LPS .....	54
TABULKA 10 ČASOVÝ PROFIL ENO PO DÁVCE 5 A 50 GY .....	55
TABULKA 11 POROVNÁNÍ HLADIN ENO PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ A APLIKACI LPS .....	55
TABULKA 12 KONCENTRACE NOX V PLAZMĚ V 6. A 24. HODINĚ PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ V ZÁVISLOSTI NA DÁVCE .....	56
TABULKA 13 POROVNÁNÍ KONCENTRACÍ NOX V PLAZMĚ V 6. A 24. HODINĚ PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ A PO APLIKACI LPS .....	57
TABULKA 14 POROVNÁNÍ KONCENTRACÍ ARGININU V PLAZMĚ V 6. A 24. HODINĚ PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ A PO APLIKACI LPS .....	57
TABULKA 15 POROVNÁNÍ KONCENTRACÍ NOX V BAL V 6. A 24. HODINĚ PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ A PO APLIKACI LPS .....	58
TABULKA 16 POROVNÁNÍ KONCENTRACÍ ARGININU V BAL V 6. A 24. HODINĚ PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ A PO APLIKACI LPS .....	58
TABULKA 17 POROVNÁNÍ KONCENTRACÍ NOX V PLICNÍ A JATERNÍ TKÁNI V 6. A 24. HODINĚ PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ A PO APLIKACI LPS .....	59
TABULKA 18 ROZDĚLENÍ ZVÍŘAT DO SKUPIN – APLIKACE RADIOPROTEKTIV .....	61
TABULKA 19 KONCENTRACE MDA V PLAZMĚ 6 H PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ (8 Gy) VLIV STUDOVANÝCH POTENCIÁLNÍCH RADIOPROTEKTIV .....	62
TABULKA 20 KONCENTRACE NOX V PLAZMĚ 6 H PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ (8 Gy) VLIV STUDOVANÝCH POTENCIÁLNÍCH RADIOPROTEKTIV .....	63
TABULKA 21 ROZDĚLENÍ ZVÍŘAT DO SKUPIN – ČASOVÉ INTERVALY PO DÁVCE 20 Gy .....	66
TABULKA 22 ČASOVÝ PROFIL ENO PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy .....	66
TABULKA 23 KONCENTRACE MDA, NOX A TP V PLAZMĚ PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy .....	67
TABULKA 24 KONCENTRACE CELKOVÉ BÍLKOVINY V TEKUTINĚ Z BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽE PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy .....	67
TABULKA 25 KONCENTRACE MALONDIALDEHYDU V TEKUTINĚ Z BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽE PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy .....	68
TABULKA 26 EXPRESE CAT1 V PLICNÍ TKÁNI PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy .....	69
TABULKA 27 EXPRESE CAT2 V PLICNÍ TKÁNI PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy .....	69
TABULKA 28 EXPRESE CAT3 V PLICNÍ TKÁNI PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy .....	70
TABULKA 29 ROZDĚLENÍ ZVÍŘAT DO SKUPIN – APLIKACE RADIOPROTEKTIV .....	72
TABULKA 30 VLIV RADIOPROTEKTIV NA KONCENTRACI VYDECHOVANÉHO OXIDU DUSNATÉHO V 7. TÝDNU PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 15Gy .....	73
TABULKA 31 VLIV RADIOPROTEKTIV NA KONCENTRACE MDA, NOX A TP V PLAZMĚ V 7. TÝDNU PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 15Gy .....	73
TABULKA 32 VLIV RADIOPROTEKTIV NA EXPRESI CAT1 V PLICNÍ TKÁNI V 7. TÝDNU PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 15Gy .....	74
TABULKA 33 VLIV RADIOPROTEKTIV NA EXPRESI CAT3 V PLICNÍ TKÁNI V 7. TÝDNU PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 15 .....	74
TABULKA 34 VLIV RADIOPROTEKTIV NA VZDUŠNOST PLICNÍ TKÁNĚ V 7. TÝDNU PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 15Gy .....	75
TABULKA 35 VLIV RADIOPROTEKTIV NA INFILTRACI ZÁNĚTLIVÝCH BUNĚK DO PLICNÍ TKÁNĚ V 7 TÝDNU PO OZÁŘENÍ DÁVKOU 15 Gy .....	75
TABULKA 36 POROVNÁNÍ ZMĚN V METABOLICKÉ DRÁŽE ARGININ-OXID DUSNATÝ A NITRAČNÍHO STRESU VYVOLANÝCH IONIZUJÍCÍM ZÁŘENÍM S ÚČINKY BAKTERIÁLNÍHO LPS U POTKANA KMENE WISTAR .....	102
TABULKA 37 LINEÁRNĚ-KVADRATICKÝ MODEL DÁVKOVÉ ZÁVISLOSTI .....	103

TABULKA 38 SLEDOVÁNÍ OCHRANNÉHO Vlivu VYBRANÝCH RADIOPROTEKTIVNÍCH LÁTEK PROTI NÁSLEDKŮM CELOTĚLOVÉHO OZÁŘENÍ POTKANA WISTAR .....	104
TABULKA 39 SLEDOVÁNÍ ZMĚN V METABOLICKÉ DRÁŽE ARGININ-OXID DUSNATÝ A NITRAČNÍHO STRESU VE FÁZI ROZVOJE RADIČNÍ PNEUMONITIDY PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU U POTKANA KMENE WISTAR.....	105
TABULKA 40 VÝSLEDKY RT-PCR U DÁVKY 20 Gy .....	106
TABULKA 41 SLEDOVÁNÍ RADIOPROTEKTIVNÍHO ÚČINKU STUDOVANÝCH LÁTEK VE FÁZI RADIČNÍ PNEUMONITIDY PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU POTKANA KMENE WISTAR .....	108
TABULKA 42 VÝSLEDKY RT-PCR U DÁVKY 15 Gy .....	109

## Seznam grafů

GRAF 1 ČASOVÝ PROFIL VYDECHOVANÉHO OXIDU DUSNATÉHO V INTERVALU 24 HODIN PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ DÁVKAMI 5 A 50Gy.....	55
GRAF 2 POROVNÁNÍ KONCENTRACÍ ENO V 6. A 24. HODINĚ PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ DÁVKAMI 5 A 50 Gy A PO APLIKACI LPS .....	56
GRAF 3 ZÁVISLOST PLAZMATICKÉ KONCENTRACE NOX NA DÁVCE IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ PŘI CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ .....	56
GRAF 4 POROVNÁNÍ KONCENTRACÍ NOX V PLAZMĚ PO OZÁŘENÍ A APLIKACI LPS .....	57
GRAF 5 POROVNÁNÍ KONCENTRACÍ NOX V BAL V 6. A 24. HODINĚ PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ A PO APLIKACI LPS .....	58
GRAF 6 KONCENTRACE MDA V PLAZMĚ 6 H PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ (8 Gy) VLIV STUDOVANÝCH POTENCIÁLNÍCH RADIOPROTEKTIV. ....	62
GRAF 7 KONCENTRACE NOX V PLAZMĚ 6 H PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ (8 Gy) VLIV STUDOVANÝCH POTENCIÁLNÍCH RADIOPROTEKTIV. ....	63
GRAF 8 PŘEŽÍVÁNÍ POTKANŮ WISTAR PO DOBU 30 DNÍ PO CELOTĚLOVÉM OZÁŘENÍ DÁVKOU 8 Gy.....	64
GRAF 9 VYDECHOVANÝ OXID DUSNATÝ PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy .....	67
GRAF 10 KONCENTRACE CELKOVÉ BÍLKOVINY V TEKUTINĚ Z BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽE PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy.....	68
GRAF 11 KONCENTRACE MALONDIALDEHYDU V TEKUTINĚ Z BRONCHOALVEOLÁRNÍ LAVÁŽE PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy.....	68
GRAF 12 EXPRESE CAT1 V PLICNÍ TKÁNI PO DÁVCE 20 Gy .....	69
GRAF 13 EXPRESE CAT2 V PLICNÍ TKÁNI PO DÁVCE 20 Gy .....	69
GRAF 14 EXPRESE CAT3 V PLICNÍ TKÁNI PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy.....	70
GRAF 15 VZDUŠNOST PLICNÍ TKÁNĚ V 7. TÝDNU PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy .....	70
GRAF 16 INFILTRACE ZÁNĚTLIVÝCH BUNĚK V 7. TÝDNU PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy .....	71
GRAF 17 PŘEŽÍVÁNÍ POTKANŮ PO PO OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 Gy .....	71
GRAF 18 VYDECHOVANÝ OXID DUSNATÝ V 7 TÝDNU PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 15Gy.....	73
GRAF 19 VLIV RADIOPROTEKTIV NA EXPRESI CAT1 V PLICNÍ TKÁNI V 7 TÝDNU PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 15Gy .....	74
GRAF 20 VLIV RADIOPROTEKTIV NA EXPRESI CAT3 V PLICNÍ TKÁNI V 7. TÝDNU PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 15Gy .....	74
GRAF 21 VZDUŠNOST PLICNÍ TKÁNĚ V 7. TÝDNU PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 15Gy.....	75
GRAF 22 INFILTRACE ZÁNĚTLIVÝCH BUNĚK PLICNÍ TKÁNĚ V 7. TÝDNU PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 15 Gy .....	75
GRAF 23 PŘEŽÍVÁNÍ PO DÁVCE 15Gy.....	76

## Seznam obrázků

OBRÁZEK 1 CHEMICKÁ STRUKTURA ACETYL- L- KARNITINU, AMINOGUANIDINU A METHYLESTERU NITRO-L-ARGININU .....	18
OBRÁZEK 2 POCHODY VEDOUcí K FIBROGENEZI .....	20
OBRÁZEK 3 ZDROJE ROS V ORGANISMU .....	25
OBRÁZEK 4 VZNIK LIPOPEROXIDŮ .....	26
OBRÁZEK 5 AKTIVACE INOS .....	30
OBRÁZEK 6 CHEMICKÁ STRUKTURA ARGININU, N-MONOMETHYLARGININU A ASYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU .....	32
OBRÁZEK 7 EXPRESE INOS V PLICNÍ TKÁNI .....	59
OBRÁZEK 8 EXPRESE INOS V JATERNÍ TKÁNI .....	59
OBRÁZEK 9 INFILTRACE ZÁNĚTLIVÝMI BUŇKAMI PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 GY .....	107
OBRÁZEK 10 VZDUŠNOST PLICNÍ TKÁNĚ PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 20 GY .....	107
OBRÁZEK 11 EXPRESE ARGINÁZ V PLICNÍ TKÁNI U SKUPINY ALC V 7. TÝDNU PO OZÁŘENÍ DÁVKOU 15 GY.....	110
OBRÁZEK 12 INFILTRACE ZÁNĚTLIVÝMI BUŇKAMI PO LOKÁLNÍM OZÁŘENÍ HRUDNÍKU DÁVKOU 15 GY .....	110

## 1. KAPITOLA: TEORETICKÁ ČÁST

### 1.1 Úvod

Předložená práce se věnuje možnostem využití bioindikátorů zánětu, oxidačního a nitračního stresu u organismu vystaveného ionizujícímu gama záření, se zaměřením na oblast hrudníku. A to nejen pro účely v oblasti nukleární medicíny a onkologie, ale také v oblasti ochrany a monitorování expozice obyvatelstva, vojenských i civilních pracovníků ohrožených ionizujícím zářením.

Markery zánětu, oxidačního a nitračního stresu by mohly nahradit doposud používané metody detekce chromozomálních aberací, které se používají k posouzení míry zasažení či poškození organismu ionizujícím zářením. Tyto molekulárně-biologické metody jsou zdoluhavé a proto je v současné době snaha zavést metody rychlejší, avšak se stejnou výpovědní hodnotou (Vaijapurkar, 2001). Jako vhodné se jeví markery zánětu, oxidačního a nitračního stresu, které jsou zodpovědné za prvotní poškození plicní tkáně, například po radioterapii (Jack, 1996). Biochemické metody pro stanovení reaktivních sloučenin kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) jsou rychlé a lze je využít i v podmínkách mobilních laboratoří. Přitažlivou možností jsou také neinvazivní postupy vyšetření bioindikátorů ve vydechovaném vzduchu a jeho kondenzátu. Měření koncentrace oxidu dusnatého (NO) ve vydechovaném vzduchu má ověřený přínos u pacientů s astmatem (Hesslinger, 2009), ale přináší cennou informaci také u pacientů s intersticiální plicní fibrózou (Montuschi, 1998), mezi které patří radiační fibróza (RF). U intersticiální plicní fibrózy lze také využít měření koncentrace 8-izoprostanu ve vydechovaném vzduchu jako markeru oxidačního stresu (Montuschi, 1998). Nedávná studie ukázala, že vydechaný NO (eNO) lze využít jako potenciální prediktivní marker radiačního poškození plic u lidí, kteří prodělali radiační léčbu karcinomu jícnu (Guerrero, 2011).

Společným rysem poškození všech orgánů, který byly vystaveny vysokoenergetickému gama záření, je akutní zánětlivá reakce, spojená s uvolňováním

řady cytokinů a transkripčních faktorů (Wong, 1995). Následkem zvýšené exprese cytokinů, zvýšeného oxidačního a nitračního stresu a také hojení orgánů dochází po několika měsících k rozvoji fibrózy (Novo, 2008).

Nejčastějšími následky expozice ionizujícího gama záření v oblasti hrudníku je radiační pneumonitida (Inoue, 2001), která přechází z akutního stadia do stádia chronické radiační fibrózy. Tyto aspekty limitují intenzitu radioterapie, zvyšují morbiditu a zhoršují kvalitu života nemocných s nádory plic či Hodgkinovou nemocí (Rodrigues, 2004; Kim, 2005; Prato, 1977). Vznik a rozvoj radiační pneumonitidy je dán věkem, pohlavím a také dávkou, které je jedinec vystaven (Claude, 2004). Prevalence radiační pneumonitidy se zvyšuje s dávkou záření.

## **1.2 Ionizující gama záření, radiační pneumonitida a fibróza**

Pod pojmem ionizující záření rozumíme takové záření, které je schopno svou energií vyvolat ionizaci atomů či molekul ozářených látek. Tento druh záření zahrnuje jednak záření, které se uvolňuje při radioaktivním rozpadu nestabilních nuklidů, jednak rentgenové záření, dále pak záření vzniklé v urychlovačích částic a také záření neutronové, které vzniká např. v jaderném reaktoru, nebo ze speciálních jaderných reakcí. Ionizující záření může být dvojího charakteru: korpuskulární (částicové) s nenulovou klidovou hmotností částic - částice alfa, protony, deuterony, elektrony, pozitrony, neutrony, mezony atd. a elektromagnetické s nulovou klidovou hmotností částic - záření gama, RTG (Österreicher, 2003).

Interakce ionizujícího záření s organismem probíhá ve dvou nezávislých drahách, přímo a nepřímo (Haghdoost, 2005). V případě přímého účinku buňky absorbují energii záření a dochází k poškození důležitých struktur jakým je například DNA či proteiny. Nejčastějším poškozením DNA jsou jednovláknové (SSB) a dvojitvláknové zlomy (DSB), poškození bazí a zesíťování DNA (Ward, 1987). Účinek nepřímý je zprostředkován radiolýzou vody a následným vznikem volných radikálů, které reagují s molekulami organických látek a mění jejich složení a funkci v organismu.

Odolnost jednotlivých orgánů a tkání vůči radiačnímu záření charakterizuje radiosenzitivita. Radiosenzitivitu dobře vystihuje axiom, který formulovali již v roce 1906 Bergonié a Tribondeau: Radiosenzitivita buněk je přímo úměrná rychlosti dělení buněk (tedy frekvenci mitóz) a nepřímo úměrná úrovni buněčné specializace (tedy diferenciaci). I když jsou plíce komplexní orgán tvořený více než 40 typy buněk, na ionizující záření reagují jako jeden celek (Travis, 1986). Díky své funkční kapacitě a poměrně velké schopnosti reparace se plíce nachází uprostřed škály radiosenzitivity.

Radiační pneumonitida (RP) je akutní zánětlivá reakce, která se objevuje za 1-8 měsíců po radioterapii (Rancati, 2003). Jedná se o intersticiální plicní zánět (Cornelissen, 2007), který se může vyvinout u 5-15% případů, zvláště u dětí (Mihál, 2007). Mezi typické příznaky RP patří dušnost, suchý kašel a zvýšená teplota (Movsas, 1997). RP se objevuje u lidí i zvířat po ozáření dávkou větší než 8 Gy. Svými projevy se řadí k onemocněním souhrnně nazývaným syndrom akutní respirační tísně (ARDS) (Jantz, 1999).

Léčba RP spočívá především v podávání protizánětlivých orálních kortikosteroidů (Cornelissen, 2007; Magaña, 2003). Při léčbě orálními kortikosteroidy se může vyskytnout celá řada nežádoucích účinků např. kortikosteroidní myopatie (Hanson, 1997). Při selhání léčby nebo výskytu závažných nežádoucích účinků orálních kortikosteroidů lze použít imunosupresivní látky, např. azathioprin (McCarthy, 1996) nebo cyklosporin A (Muraoka, 2002). K prevenci vzniku RP lze využít i látek majících antioxidační vlastnosti, jakými jsou např. vitamín A, či radioprotektivum amifostin (Srinivas, 2007).

První zmínka o RP jako následku radioterapie pochází z roku 1922, kdy byly popsány různé symptomy po léčbě nádorů plic (Groover, 1922). Navazující studie se zabývaly objasňováním mechanismů vzniku a rozvoje RP a fibrózy a léčbou plic poškozených radioterapií. RP vzniká jako důsledek radioterapie v oblasti horní části hrudníku, nejčastěji se jedná o nádory plic, Hodgkinův lymfom či rakovinu prsu (Gross,

1977). Fáze radiační pneumonitidy můžeme rozdělit na fázi latentní a fázi akutní či exsudativní (Coggle, 1986).

Po poškození tkáně ionizujícím zářením dochází k uvolňování velkého počtu cytokinů, růstových faktorů a cyklinů, které regulují odpověď organismu na tento inzult (Trott, 2004). Při RP dochází k úbytku pneumocytů typu I (Morgan, 1995) a proliferaci pneumocytů typu II (Tsoutsou, 2006). U pneumocytů typu II dochází po ozáření k hyperplazii, což negativně ovlivňuje regeneraci plicní tkáně (Yi, 1996).

Incidenci RP je velmi obtížné stanovit. Existují rozdíly nejen v druhu použité radioterapie, ale také ve spojení radioterapie s chemoterapií (Tsoutsou, 2006). Přehled jednotlivých studií a incidence RP uvádí například přehledový článek v časopise *Pulmonary Radiation Injury* (Movsas, 1997). Podobné studie incidence RP byly prováděny i v České republice (Stejskal, 2007).

Konečným stádiem procesu postradiačního hojení plicní tkáně je radiační fibróza plic (RF). RF se rozvíjí 10 měsíců po ozáření. Stejně jako RP se řadí k intersticiálním plicním procesům, resp. Fibrózám. Fibróza je charakterizována jako snaha organismu o reparaci poškozené tkáně zvýšenou tvorbou kolagenních vláken, která jsou normální součástí tkáně (Xavier, 2004). Nadměrnou tvorbou kolagenu postižený orgán ztrácí svoji funkčnost. Fibrotické plíce mají sníženou schopnost transportovat kyslík přes alveolokapilární membránu, což je typické pro všechny fibrózy spadající do skupiny intersticiálních plicních fibróz. Charakteristickým nálezem je zvýšená koncentrace kolagenů a cytokinu TGF- $\beta$ 1, který proces fibrózy ovlivňuje (Martin, 2000).

### **1.3 Radioprotekce**

S ohledem na poškození tkání radiací je potřeba organismus před nežádoucími vlivy ionizujícího záření chránit. Proto jsou látky snižující negativní účinky záření (radioprotektiva) předmětem intenzivního zkoumání a to s ohledem na jejich potenciální využitelnost v oblasti nukleární medicíny, při výzkumu vesmíru, po haváriích reaktorů

jaderných elektráren či s ohledem na zvyšující se riziko použití jaderných zbraní ve válce (Adhvaryu, 2008). Radioprotektiva mohou být různého charakteru, obecně je lze rozdělit podle původu na radioprotektiva chemická, adaptogeny a absorbenty (Maurya, 2006). Chemická radioprotektiva mají obecně vyšší účinnost než ostatní radioprotektiva. Jedná se o uměle vytvořené látky, především sloučeniny síry a antioxidanty. Adaptogeny jsou přírodní látky obsažené např. v rostlinách, které navozují nespécifickou ochranu organismu proti stresu a stimulují radiorezistenci (Nair, 2000). Absorbenty jsou látky zabraňující vstupu radiojódů do štítné žlázy a absorpci dalších radionuklidů jakými jsou např.  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{90}\text{Sr}$  či  $^{239}\text{Pu}$  (Maurya, 2006).

Radioprotektiva by měla splňovat určitá základní kritéria. Zaprvé, radioprotektivum musí mít podstatný ochranný vliv proti negativním účinkům ionizujícího záření. Dále pak nesmí být pro organismus toxické. Důležitým parametrem je v tomto případě terapeutický index, který vyjadřuje poměr mezi střední letální dávkou a střední účinnou dávkou. Jeho nízká hodnota je u řady radioprotektiv velký problém. Je pravidlem, že radioprotektiva dobře tolerovaná organismem nejsou příliš účinná (Maurya, 2006) a naopak, účinná radioprotektiva jsou často příliš toxická (Benkovic, 2008). Důležitou vlastností radioprotektiv je způsob aplikace (cesta podání). Organismus by měl dobře snášet radioprotektivum při podání především perorálním a případně i intramuskulárním. Preferuje se perorální podání pro jeho nenáročnost. Při radioterapii lze ale využít také intravenózní podání. Velkou nevýhodou je, pokud se radioprotektivní působení rozvíjí až po opakovaném podávání látky po delší dobu. Použití takových látek je zcela nereálné v případě jaderné havárie či útoku jadernými zbraněmi. Ačkoliv se již testovalo více než 20 000 látek, žádná z nich zatím nesplňuje všechna kritéria pro ideální radioprotektivum.

Radioprotektivní účinek dané látky je posuzován podle redukčního faktoru dávky, DRF. Pro výpočet je možné použít zjednodušený postup: poměr  $\text{LD}_{50}$  počtu přežitých jedinců chráněných radioprotektivní látkou k počtu nechráněných jedinců (Rima, 1999). Látka má radioprotektivní účinek dosáhne-li uvedený poměr hodnotu vyšší než 1. Validní



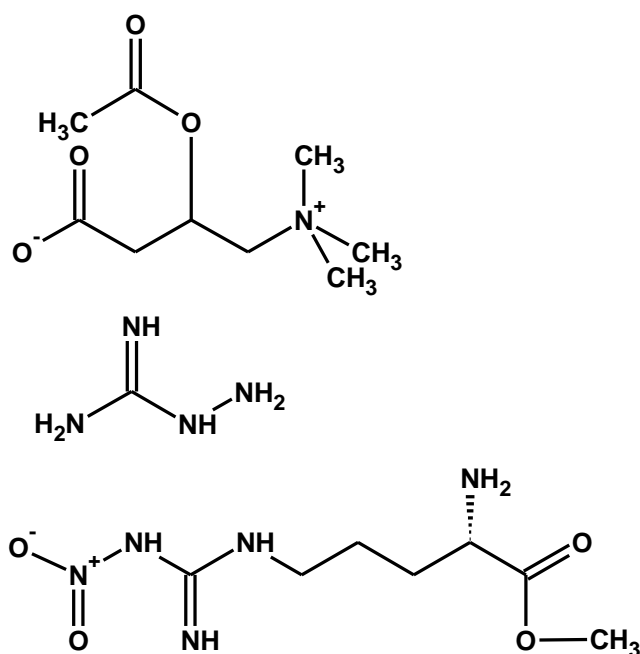
hodnocení DRF testované látky vyžaduje sledování letality nejméně 30 dní ( $LD_{50/30}$ ) po celotělovém ozáření (Jagetia, 2004).

Při vývoji radioprotektiv se výzkum nejčastěji zaměřoval na látky snižující oxidační stres. Rozvoj poznatků o mnohočetných funkcích oxidu dusnatého (NO) v organismu vedl k závěru, že patologické stavy spojené s oxidačním stresem zároveň charakterizuje zvýšená koncentrace NO a jiných reaktivních dusíkatých sloučenin, tj. nitrační stres. V případě ionizujícího záření je hlavním zdrojem NO indukovatelná syntáza NO (iNOS), která se typicky aktivuje v průběhu zánětlivých stavů (Kinnula, 2005). Látky se selektivním inhibičním účinkem vůči iNOS nebo neselektivní inhibitory syntáz NO by se potenciálně mohly uplatnit jako radioprotektiva. V naší práci jsme se zaměřili na účinky acetyl-L-karnitinu vykazujícího antioxidační vlastnosti, neselektivního inhibitoru NO syntáz L-NAME a na účinky aminoguanidinu, látky s antioxidačním účinkem současně inhibující především iNOS a méně ostatní izoenzymy syntázy NO.

Acetyl-L-karnitin (ALC) je derivát L-karnitinu, kvarterního aminu strukturně podobnému cholinu (Lopes, 2003). V organismu se zapojuje do  $\beta$ -oxidace mastných kyselin (Yasui, 2002). ALC působí jako antioxidant a jeho úkolem je chránit látky bílkovinné povahy před oxidačním poškozením, např. antioxidační enzymy (Gülçin, 2006). Mnohé studie prokázaly i pozitivní vliv ALC na mozkovou činnost (Pettegrew, 2000; Rumpt, 2010). ALC vykazuje také pozitivní účinky ve spojení s ozářením (Mansour, 2006; Babicová, 2012). Dávka 250 mg/kg ALC byla zvolena na základě výsledků studie, kterou publikoval Mansour (Mansour, 2006). Při této dávce bylo pozorováno zmírnění negativních účinků ionizujícího záření. Studie s ALC prokázaly vysokou toleranci a nízkou toxicitu a možnost perorálního podání látky (Esposti, 1994).

L-NAME, tj. methylester  $N^{\omega}$ -nitro-L-argininu, je nescifický inhibitor syntáz NO schopný výrazně snižovat koncentrace NO v organismu a to zejména po aplikaci bakteriálního LPS (McCluskie, 2004), ale také ve spojitosti s redukcí následků lokálního ozáření břicha (Erbil, 1998). Dávka L-NAME byla zvolena na základě výsledků studie (McCluskie, 2004), ukazující výrazný pokles markerů zánětu při podání 100 mg/kg

L-NAME současně s bakteriálním lipopolysacharidem. Aminoguanidin (AG), také známý jako pimagedin, je organická sloučenina, která stejně jako L-arginin obsahuje guanidinovou skupinu. AG je relativně specifický inhibitor iNOS, inhibuje ale také diamin oxidázu (histaminázu) (Lindell, 1960). Jako první byly popsány jeho protektivní účinky vůči vzniku pokročilých koncových produktů glykace (AGE) (Corbett, 1996). Následoval objev jeho inhibičního účinku na iNOS. Dávka 400 mg/kg byla zvolena na základě výsledků práce (Huang, 2009), dokládající její ochranný vliv na střevo při lokálním ozáření abdominální oblasti.



**Obrázek 1** Chemická struktura acetyl- L- karnitinu, aminoguanidinu a methylesteru nitro-L-argininu

#### **1.4 Cytokiny, zánětlivá reakce a fibrogeneze**

Stejně jako po aplikaci LPS dochází i po působení ionizujícího záření k rozvoji zánětlivé odpovědi (Johnston, 1998, Hayashi, 2012). Jejimi mediátory jsou především cytokiny (Rübe, 2005). Cytokiny jsou důležité signální molekuly, jejichž úkolem je zprostředkovat mezibuněčnou komunikaci (Holloway, 2002). Jedná se o rozpustné proteiny o malé molekulové hmotnosti (Turnbull, 1999). Ačkoliv je funkce cytokinů často

spjata s regulací imunitního systému (IS), zasahují cytokiny také do procesů jako je růst a diferenciace buněk nebo také nidace embrya (Hopkins, 2003). Svými účinky se cytokiny podobají hormonům, avšak v některých vlastnostech se liší. Cytokiny působí na cílové buňky prostřednictvím membránových receptorů. Existuje více než 100 cytokinů a růstových faktorů, ale receptorů pro ně je mnohem méně (Singh, 2004). Receptory mají složitou strukturu, často se skládají z více podjednotek a řada z nich patří do tzv. rodin receptorů (Woodcock, 1997). Největší část cytokinů se váže na receptory z rodiny receptorů pro cytokiny typu 1 a 2. Tyto receptory využívají signální dráhy JAK-STAT. JAK – Janus kinázy fosforylují tyrozinové zbytky na STAT proteinech, které pak po vstupu do jádra indukují tvorbu odpovídajících genů (Gadina, 2001).

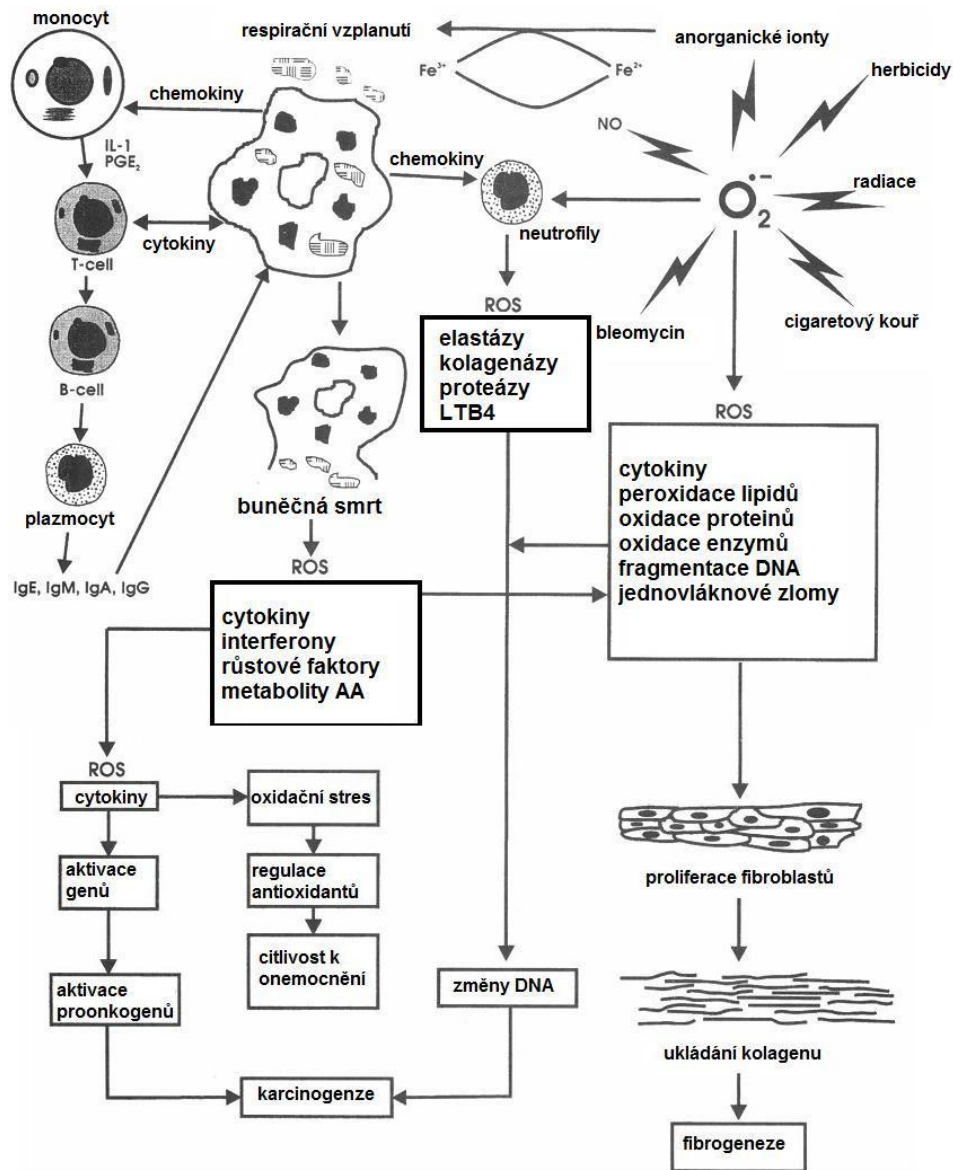
Zánětlivé cytokiny jsou imunomodulační agens, které jsou produkovány IS, například makrofágy (Seymour, 2001), a jsou bezprostředně spojeny s IS (Wong, 1995). Můžeme je rozdělit na pro- a protizánětlivé. Jejich nerovnováha je zodpovědná za vznik zánětlivé reakce (Opal, 2000). Mezi typické představitele zánětlivých cytokinů patří interleukin 1 (IL-1), tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a interleukin 6 (IL-6). IL-1 a TNF- $\alpha$  jsou typickými představiteli prozánětlivých cytokinů, jejich pravým opakem je IL-6.

Nukleární faktor kappa B (NF $\kappa$ B) je proteinový komplex sloužící jako transkripční faktor (Gilmore, 2006). Nachází se ve většině živočišných buněk. NF $\kappa$ B je aktivován cytokiny, ROS či poškozením DNA (Braisier, 2006). NF $\kappa$ B se nachází v cytoplazmě v neaktivní formě navázaný na svůj inhibitor I $\kappa$ B. Po fosforylaci I $\kappa$ B kinázou (IKK) dojde k oddělení těchto dvou částí a NF $\kappa$ B se stává aktivním (Ouyang 2005). Putuje do jádra a nastává exprese prozánětlivých cytokinů (Katsuyama 1998). Kromě stimulace exprese cytokinů ovlivňuje NF $\kappa$ B také diferenciaci buněk a proliferaci B-lymfocytů (Nishikori 2005).

Již dříve zmíněný cytokin TGF hraje významnou roli při rozvoji fibrózy. TGF ovlivňuje reparační pochody, podporuje angiogenezi, stimuluje proliferaci fibroblastů,

inhibuje proliferaci T a B lymfocytů, inhibuje syntézu cytokinů makrofágy, atd. (Klener, 1997).

Na obrázku 2 jsou znázorněny základní pochody vedoucí k fibrogenezi a karcinogenezi.



**Obrázek 2** Pochody vedoucí k fibrogenezi (upraveno dle Vallyathan 1997)

IL 1 - interleukin 1; PGE<sub>2</sub> - prostaglandin E2; T cell - T lymfocyt; B cell - B lymfocyt; IgE, IgM, IgA, IgG - imunoglobuliny; NO - oxid dusnatý, ROS - reaktivní formy kyslíku; AA - aminokyseliny; LBT<sub>4</sub> - leukotrien T4

## 1.5 Oxidační a nitrační stres při fyziologických a patofyziologických pochodech

Reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) hrají důležitou roli patogenezi radiačního poškození. Objevují se nejen v počátečních fázích zánětu, ale i ve fázích fibrogenese. ROS a RNS lze obecně zařadit mezi oxidanty či radikály. ROS a RNS radikálové povahy jsou molekuly, atomy či ionty, které mají ve své valenční vrstvě jeden nebo více nespárovaných elektronů, což je důvodem jejich vysoké reaktivity (Valko, 2004). Jiné ROS a RNS svou strukturou nejsou radikály, ale reagují velmi podobně, např. peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Kevin, 2005).

**Tabulka 1** Reaktivní formy kyslíku  
(upraveno dle Reiter, 1995, Halliwell, 2006)

REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU (ROS)	
<b>Volné radikály</b>	
Superoxid	$\text{O}_2^{\cdot-}$
Hydroxylový radikál	$\text{HO}\cdot$
Peroxy	$\text{ROO}\cdot$
Alkoxy	$\text{RO}\cdot$
Hydroperoxy	$\text{HO}_2\cdot$
<b>Látky, které nejsou radikály</b>	
Peroxid vodíku	$\text{H}_2\text{O}_2$
Kyselina chlorná	$\text{HClO}$
Ozon	$\text{O}_3$
Singletový kyslík	$^1\text{O}_2$

**Tabulka 2** Reaktivní formy dusíku  
(upraveno dle Sies, 1993)

REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU (RNS)	
<b>Volné radikály</b>	
Oxid dusnatý	$\text{NO}\cdot$
Oxid dusičitý	$\text{NO}_2\cdot$
<b>Látky, které nejsou radikály</b>	
Nitrosyl	$\text{NO}^+$
Kyselina dusitá	$\text{HNO}_2$
Peroxyinitrit	$\text{OONO}^-$
Alkylperoxyinitrit	$\text{ROONO}^-$

Oxidační a nitrační stres je do určité míry v organismu fyziologický (Valko, 2004) (Obrázek 3). ROS a RNS (tabulka 1 a 2) jsou významnými faktory imunitního systému organismu (IS), signálními molekulami buněčné regulace (např. Inoue, 2003) a zprostředkovateli přenosu energie.

Endogéním zdrojem ROS a RNS v organismu jsou (Betteridge, 2000):

- redoxní pochody dýchacího řetězce v mitochondriích
- redoxní reakce katecholaminů, hemoglobinu
- syntéza prostaglandinů
- oxidativní deaminace aminokyselin
- metabolismus a detoxikace xenobiotik a antibiotik
- proces fagocytózy
- destrukce tkáně v místě zánětu
- stimulace adheze neutrofilů (superoxid)

Organismus má do jisté míry pro tyto pochody velmi účinné antioxidační mechanismy, které dokáží vzniklé produkty inaktivovat (Valko, 2007).

V organismu existuje celá řada antioxidačních systémů, zahrnujících nízkomolekulární látky a vysokomolekulární látky s různými funkcemi. Můžeme je rozdělit na antioxidační enzymy (Tabulka 3) a substráty (Tabulka 4) (Valko, 2007).

**Tabulka 3** Antioxidační enzymy  
(upraveno dle Sies, 1993)

<b>ANTIOXIDAČNÍ ENZYMY A STOPOVÉ PRVKY</b>	
Superoxid dismutáza (SOD)	Zinek, mangan, měď, železo
Glutathionperoxidáza (GPx)	Selen
Kataláza (KAT)	Železo
Mitochondriální cytochromový systém (P450)	
Laktoperoxidáza	
Cytochromoxidáza	Měď

**Tabulka 4** Antioxidační substráty

(upraveno dle Krinsky, 1988)

<b>ANTIOXIDAČNÍ SUBSTRÁTY – nízkomolekulární látky</b>	
<b>rozpuštěné v tucích</b>	<b>rozpuštěné ve vodě</b>
Tokoferoly	Kyselina askorbová
Karotenoidy (retinol)	Glutathion
Koenzym Q (ubichinon)	Kyselina močová
Bilirubin	Cystein
Katecholaminové estrogény	Histidin
	Kreatinin

Organismus využívá tři způsoby ochrany před škodlivými účinky ROS a RNS (Carrí, 2003). Jedním ze způsobů je regulace tvorby nadměrného množství ROS pomocí regulace aktivity enzymů, které je tvoří. Dalším je pak vychytávání přechodných prvků, které zvyšují aktivitu reaktivních forem (např. volné Fe do transferinu). Jiný způsob představuje zachytávání a odstraňování již vytvořených radikálů, látkami označovanými jako tzv. vychytávače (scavengers), lapače (trappers) a zhášče (quencheres).

Nelze nezmínit také reparaci molekul a struktur organismu poškozených účinkem ROS a RNS.

Při porušení rovnováhy mezi ROS a RNS na jedné straně a antioxidačními mechanismy organismu na straně druhé dochází ke vzniku patofyziologických procesů, které jsou spojeny s nadměrnou tvorbou ROS a RNS (Betteridge, 2000).

Tato nerovnováha má za následek především (Magder, 2006):

- ☒ peroxidaci nenasycených mastných kyselin (lipoperoxidace) a tím změnu fluidity membrány a její následnou destrukci
- ☒ změnu struktury proteinů a to především oxidací SH skupin aminokyselin
- ☒ poškození struktury DNA, chybné párování bází při replikaci DNA. Následkem je mutagenese, kancerogeneze, apoptóza
- ☒ změnu syntézy kolagenu a polymeraci kyseliny hyaluronové

- ☒ inhibici řady buněčných funkcí, např. fosfátového transportu, anaerobní glykolýzy

Existuje řada škodlivých podnětů, které vyvolávají vznik nefyziologického oxidačního a nitračního stresu (Obrázek 3). Například bakteriální lipopolysacharid způsobuje infekci doprovázející zvýšený oxidační a nitrační stres (např. Ben-Sauhl, 2001).

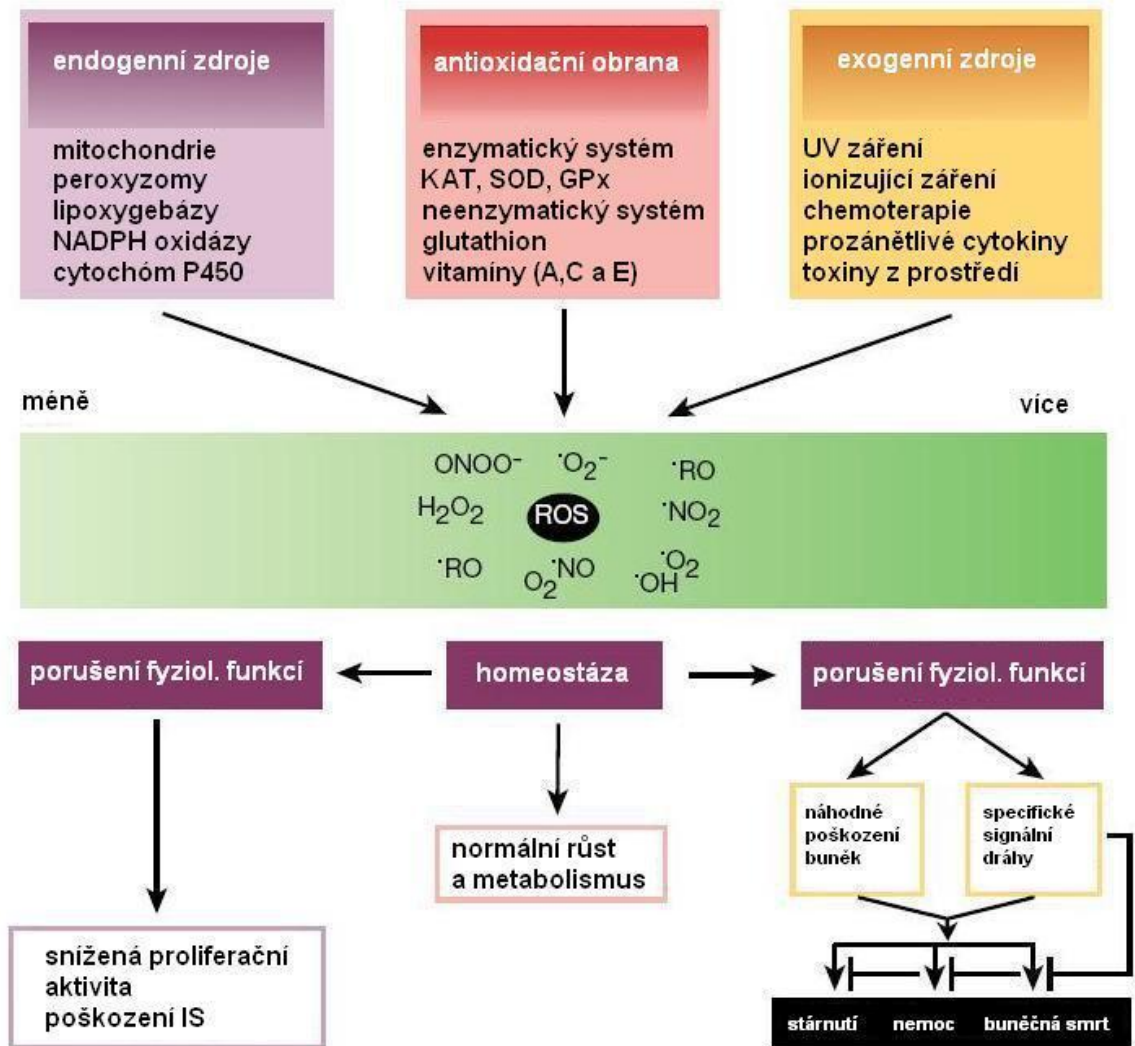
Lipopolysacharid (LPS, bakteriální endotoxin), je hlavní složkou vnější buněčné membrány gramnegativních bakterií (Das, 1994). Skládá se ze dvou základních strukturních jednotek, charakteristických pro jednotlivé bakterie. Na virulenci bakterie se podílí polysacharidová část endotoxinu a lipid A je zodpovědný za jeho toxicitu (Netea, 2002; Wang, 2010). V organismu LPS vyvolává silnou odpověď IS a spouští cytokinovou kaskádu (Raetz, 2002).

Aby byl LPS organismem rozpoznán a odstraněn dochází v časně fázi zánětlivé odpovědi k tvorbě proteinu vázajícího lipopolysacharid (LBP). LPS je navázán na tento protein a poté jeho prostřednictvím předložen povrchovému receptoru CD14 a receptoru Toll-like 4 (TLR4), který se nachází v blízkosti receptoru CD14 (Beutler, 2000). Aktivace těchto receptorů vede k produkci zánětlivých cytokinů (např. TNF -  $\alpha$ , IL1 a IL-6)(Tateda, 1996). Tyto uvolněné cytokiny poté podněcují sekreci dalších cytokinů. Cílovými buňkami, tedy buňkami s povrchovými receptory CD14 a TLR4, jsou buňky monocytomakrofágové řady, neutrofilů a B lymfocyty (Hawiger, 1999).

Dále je také oxidační a nitrační stres spojen s různými onemocněními, jako jsou např. diabetes mellitus (Maritim, 2003), neurodegenerativní onemocnění mozku (Barnham 2004), onemocnění srdce, zhoubné nádory či autoimunitní zánětlivá onemocnění, např. revmatoidní artritida (Valko, 2007).

Indukce tvorby ROS a RNS je také připisována zvýšené tělesné námaze u sportovců (Finaud, 2006).





**Obrázek 3** Zdroje ROS v organismu

(upraveno dle Finkel, 2000)

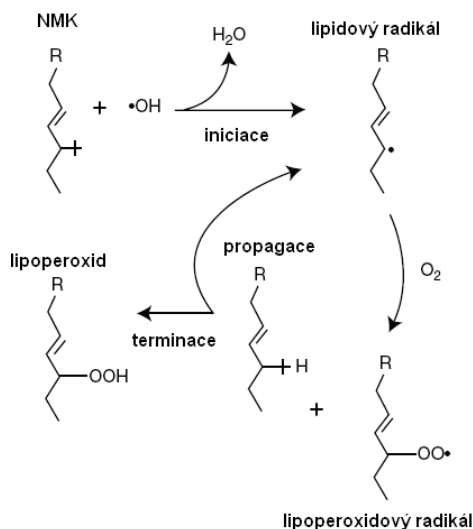
KAT – kataláza; SOD – superoxid dizmutáza; GPx – T glutathion peroxidáza; ONOO<sup>-</sup> – peroxynitrit; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peroxid vodíku; RO· – alkoxy; NO – oxid dusnatý; NO<sub>2</sub> – oxid dusičitý; ROS – reaktivní formy kyslíku; O<sub>2</sub> – kyslík; HO· – hydroxyl; O<sub>2</sub><sup>-</sup> – superoxidový anion;

## 1.6 Bioindikátory zánětu, oxidačního a nitračního stresu po celotělovém či lokálním ozáření

### 1.6.1 Produkty lipoperoxidace

ROS a RNS reagují s důležitými biomolekulami v organismu. Lipoperoxidace je jedna z oxidačních přeměn nenasycených mastných kyselin. Nenasycené mastné kyseliny, např. ve fosfolipidové membráně, jsou napadány hydroxylovým radikálem za vzniku lipidového radikálu, který oxidací přechází na lipoperoxidový radikál. Lipoperoxidový radikál poté reaguje s dalším lipidem a vznikají tak další radikály a lipoperoxidy. Lipoperoxidy jsou velmi nestabilní a rozkládají se za vzniku různých látek, jakými jsou malondialdehyd (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal či izoprostany (produkty lipoperoxidace kyseliny arachidonové). Tyto sekundární produkty lipoperoxidace jsou měřitelné ve všech biologických tekutinách a tkáních. (Janicka, 2010).

Malondialdehyd vzniká také při syntéze prostaglandinů (Marnett, 2002). MDA je pro organismus škodlivý, má prokázané mutagenní účinky (Basu, 1984).



**Obrázek 4** Vznik lipoperoxidů  
(upraveno dle Clark, 2008)

NMK - nenasycená mastná kyselina;  $\text{H}_2\text{O}$  – voda; R – alkyl;  $\text{O}_2$  – kyslík;  $\cdot\text{OH}$  – hydroxyl

### 1.6.2 Oxid dusnatý a další dusíkaté látky

Oxid dusnatý, ale i další reaktivní formy dusíku (RNS) jsou jedny z nejvíce studovaných endogenních látek v organismu. Ještě před několika lety byl NO považován pouze za škodlivinu, která přispívá ke znečišťování ovzduší. Tyto představy trvaly až do roku 1978, kdy bylo prokázáno, že se NO vyskytuje v lidském těle přirozeně. V roce 1978 se podařilo dokázat, že NO je ve skutečnosti látka dříve označovaná jako endoteliální relaxační faktor (EDRF), kterou poprvé popsal F. R. Furchgott (Furchgott, 1980). Od té doby bylo popsáno mnoho funkcí NO v organismu. V roce 1992 byl NO prohlášen renomovaným vědeckým časopisem Science „Molekulou roku“. V roce 1998 za objev NO jako signální molekuly v kardiovaskulárním systému získali vědci F. R. Furchgott, L. J. Ignarro a F. Murad Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.

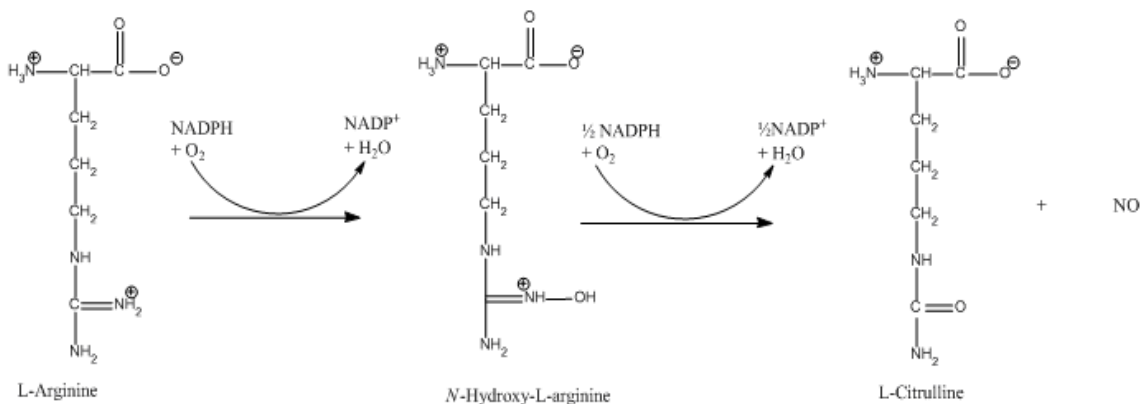
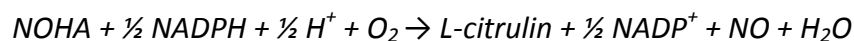
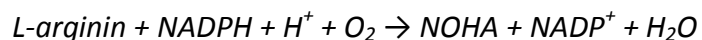
NO je plynná signální molekula, dalšími jsou sirovodík a oxid uhelnatý (Du, 2006).

NO má malou nenabitou molekulu s ideálními vlastnostmi, která velmi rychle proniká z místa vzniku biologickými membránami. Podílí se na regulaci mnoha fyziologických procesů jako jsou např. vazodilatace, myorelaxace, inhibice agregace destiček, přenos nervových vzruchů (neadrenergní necholinergní inhibiční neurotransmise) či imunitní obrana organismu (cytotoxický, tumoricidní a baktericidní efekt) (Bugá, 2000). V dýchacích cestách NO ovlivňuje tonus hladkého svalstva průdušek a cév.

NO je díky své povaze „volného radikálu“ velmi reaktivní, má velmi krátký biologický poločas (několik sekund). Rychle se váže na cílová místa, zejména kovy v molekulách metaloenzymů a v hemu. V tělních tekutinách velmi rychle reaguje s kyslíkem, superoxidem a jinými reaktivními formami kyslíku (ROS) nebo se váže na nízkomolekulární a vysokomolekulární látky, které obsahují thiolové skupiny (glutathion, albumin). V plynné fázi je NO při nízkých koncentracích stabilnější a to umožňuje jeho stanovení ve vydechaném vzduchu.

NO je v savčím organismu tvořen NO syntázami (NOS), které katalyzují oxidaci L-argininu na L-citrulin zahrnující přenos 5 elektronů z kyslíku a NADPH. Meziproduktem této reakce je N $\omega$ -hydroxy-L-arginin (NOHA), jenž je inhibátorem argináz.

Sumární chemická rovnice je následující:



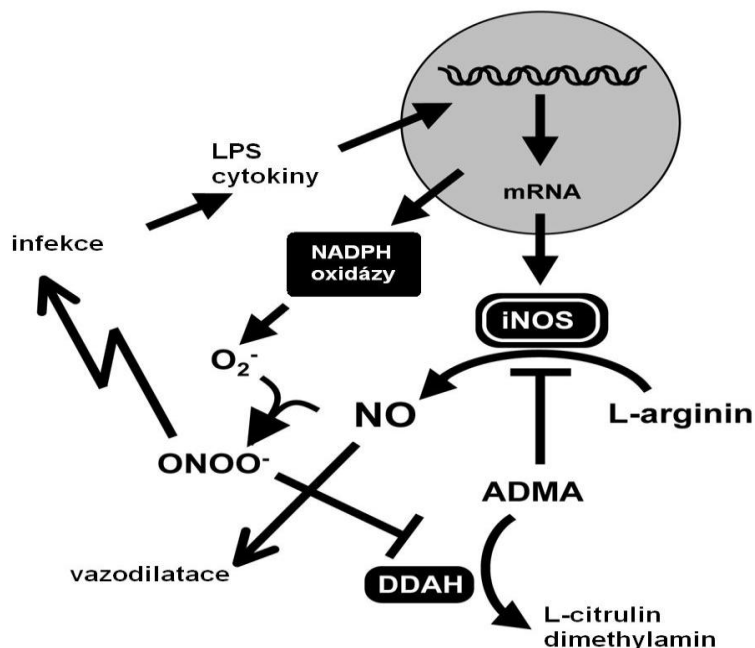
Byly popsány čtyři izoformy NOS, které se liší molekulovou hmotností, závislostí na koncentraci intracelulárního Ca<sup>2+</sup>, ale také lokalizací exprese (viz tabulka 5). Konstitutivní izoformy eNOS (endoteliální, NOS3) a nNOS (neuronální, NOS1) jsou řízeny koncentrací intracelulárního Ca<sup>2+</sup>, kalcium se naváže na bílkovinu kalmodulin (CaM) a vytvořený komplex pak aktivuje eNOS nebo nNOS. Touto cestou je tvorba NO velmi rychlá (během několika sekund) a koncentrace NO se pohybuje v nízkých hodnotách (pikomoly), působí lokálně (vazodilatace, bronchodilatace a přenos nervových vzruchů). Relativně nedávno objevená konstitutivní forma je mitochondriální NOS (mtNOS). Její aktivita je také regulována koncentrací kalcia a má vliv zejména na mitochondriální bioenergetiku (Ghafourifar, 2005). Aktivita indukibilní formy iNOS (NOS2) je naopak řízena transkripčně pomocí transkripčního faktoru NFκB. Komplex Ca<sup>2+</sup>-CaM je integrální částí molekuly iNOS. Izoforma tvoří vysoké (nanomolární) koncentrace NO. Tvorba NO

probíhá pomaleji (několik hodin) a NO působí po delší dobu. Takto vzniklý NO se uplatňuje především při imunitní a zánětlivé odpovědi. Aktivitu iNOS zvyšují prozánětlivé cytokiny (např. TNF- $\alpha$  – tumor-nekrotizující faktor  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  - interleukin-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  – interferon- $\gamma$ ) a bakteriální lipopolysacharid (LPS) (obrázek 5).

**Tabulka 5** Přehled syntáz oxidu dusnatého  
(upraveno dle Knowles, 1994)

	eNOS	nNOS	iNOS
<b>Mr</b>	160 kDa	131 kDa	133 kDa
<b>Exprese</b>	Konstitutivní	Konstitutivní	inducibilní (cytokiny, LPS)
<b>Regulace</b>	Ca <sup>2+</sup> /CaM	Ca <sup>2+</sup> /CaM	na úrovni transkripce
<b>Kofaktory</b>	BH4, arginin, ADMA	BH4, arginin, ADMA	BH4, arginin, ADMA
<b>Produkce NO</b>	Krátkodobá	Krátkodobá	Dlouhodobá
<b>Koncentrace</b>	Pikomolární	Pikomolární	Nanomolární
<b>Výskyt</b>	Endotel	Neurony	makrofágy, většina buněk
<b>Funkce</b>	<b>fyziol. Regulace</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ regulace cévního tonu</li> <li>▪ prokrvení</li> </ul>	<b>fyziol. Regulace</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ neurotransmise</li> <li>▪ tvorba paměťové stopy</li> <li>▪ motilita GIT</li> </ul> <b>patologická nadprodukce</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ cytotoxicita</li> <li>▪ neurodegenerace</li> </ul>	<b>patologické stavy</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ cytotoxicita</li> <li>▪ vazodilatace</li> <li>▪ zánět</li> <li>▪ septický šok</li> <li>▪ imunitní obrana organismu</li> </ul>

Inhibitory NO syntáz přispívají ke snížení nitračního stresu. Můžeme je rozdělit do tří základních skupin: látky soutěžící s NADPH, s kalmodulinem či sargininem o NOS (Knowles, 1994). Mezi analogy argininu řadíme L-monomethylarginin (L-NMMA), asymetrický dimethylarginin (ADMA) (Obrázek 6) a L-nitroarginin (L-NNA). Dále pak námi zkoumané L-NAME a AG (Alderton, 2001).



**Obrázek 5** Aktivace iNOS  
(upraveno dle 2006 Böger)

Symbols: LPS – bakteriální lipopolysacharid; mRNA – mediátorová RNA; iNOS - indukovatelná forma NO-syntázy; NO - oxid dusnatý; ADMA – asymetrický dimethylarginin; DDAH - dimethylarginin dimethylaminohydroláza;  $O_2^-$  - superoxidový radikál,  $ONOO^-$  - peroxynitrit

### 1.6.3 Další dusíkaté látky

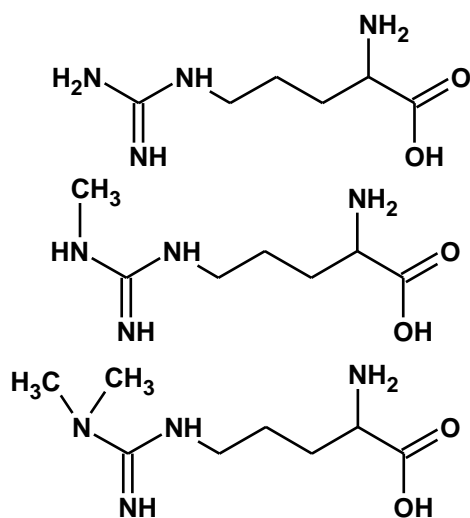
Kromě NO patří k RNS i další dusíkaté látky, jakými jsou například peroxynitrit ( $ONOO^-$ , peroxodusitan) či oxid dusičitý ( $NO_2$ ). NO se velmi snadno v přítomnosti volného kyslíku oxiduje na  $NO_2$ . V přítomnosti  $O_2^-$  vzniká  $ONOO^-$ , který je velmi účinným prostředkem v boji s intracelulárními patogeny. Peroxynitrit je silným nitračním činidlem, které může nitrovat široké spektrum biomolekul, např. bílkoviny. Při reakci  $ONOO^-$  s tyrozinem vzniká velmi stabilní produkt 3-nitrotyrozin (NT). Právě NT se jeví jako vhodný marker nitračního stresu v podmínkách *in vitro* ale také *in vivo* (Giaid, 2003).

Dalšími důležitými reakcemi RNS jsou reakce s látkami obsahujícími thiolové skupiny (SH), např. již zmíněné bílkoviny, nízkomolekulární látky s SH skupinou. Nitrosoproteiny a nitrosothioly jsou transportní formou NO a podílejí se na regulaci enzymů prostřednictvím mechanismu podobného fosforylaci. Post-translační modifikace proteinů účinkem NO vede ke změně jejich aktivity či subcelulární lokalizace. Nitrosothioly vznikají především reakcí NO s glutathionem, jejich zvýšenou koncentrací lze pozorovat u zánětlivých plicních onemocnění, jakými jsou například cystická fibróza a chronická obstrukční plicní nemoc (CHOPN) (2001, Corradi).

#### 1.6.4 Arginin

Arginin je výchozí látkou nejen pro tvorbu oxidu dusnatého, ale také prostřednictvím ornitinu pro syntézu polyaminů spermidinu, spermicinu a putrescinu, které jsou důležitými regulátory buněčného růstu, diferenciaci a smrti (Wallace, 2003). Dalším buněčným regulátorem, který vzniká z argininu prostřednictvím ornitinu je prolin, součást kolagenu. Metabolismus L-argininu je tak centrálním bodem nejen pro regulaci ale také tkáňovou přestavbu, dává vzniku vaskulárním mediátorům (ADMA, NO, L-NMMA), ale také tkáňovým mediátorům (prolin, NO) (Kitowska, 2008). Metabolismus methylovaných derivátů argininu začíná posttranslační modifikací – methylací - proteinů bohatých na arginin. Tuto reakci zprostředkovávají enzymy protein-arginin methyl transferázy (PRMT). Degradací těchto proteinů, které se účastní různých fyziologických dějů, vznikají deriváty argininu, např. ADMA, L-NMMA (Bulau, 2007). Transport argininu z extracelulárního prostoru je zprostředkováván pomocí transportérů CAT (cationic amino acid transporter),  $\gamma^+$  systému, specifických pro kationické aminokyseliny, ke kterým patří i arginin. CAT jsou membránové glykoproteiny o molekulové hmotnosti 70 kDa, které se nacházejí v izoformách, CAT1, CAT2a, CAT2b, CAT3 a CAT4. Isoformy se liší tkáňovou distribucí, substrátovou afinitou a transportní kapacitou (Ito, 1997; Yeramian, 2006; Closs, 2000). CAT1 je konstitutivně exprimována ve všech tkáních vyjma jaterní tkáň dospělého jedince. Jeho afinita pro arginin je velmi vysoká, avšak transportní kapacita nízká. Stejně jako CAT1 i CAT2b má

vysokou afinitu a malou kapacitu pro transport argininu. CAT2b je exprimována během zánětu makrofágy, astrocyty a myocyty (Simmons, 1996; Nicholson, 2001; Stevens, 1996). Isoforma CAT2a je lokalizována v játrech, k argininu má vysokou transportní kapacitu a nízkou afinitu. Isoforma CAT3 s vysokou afinitou a nízkou transportní kapacitou pro arginin je především lokalizována v mozkové tkáni. Funkce CAT4 není zatím objasněna (Yeramian, 2006). V organismu může být L-arginin metabolizován na řadu sloučenin za katalýzy řadou enzymů: syntázami oxidu dusnatého (NOS) na oxid dusnatý a citrulin, arginázi (ARG) na ornitin, arginin:glycin-amidnottransferázou (AGAT) na kreatin, arginin-dekarboxylázou (ADC) na agmatin. Z pohledu zánětlivé reakce jsou nejdůležitější NOS a ARG. Arginázy se vyskytují ve dvou izoformách. Arginázu typu 1 lokalizujeme v cytozolu jater. Argináza typu 2 je mitochondriální enzym produkovaný mnoha orgány, vyjma jater, nejvíce však ledvinami.



**Obrázek 6** Chemická struktura argininu, N-monomethylargininu a asymetrického dimethylargininu

### 1.6.5 Antioxidanty

Stanovit v organismu lze také látky zprostředkovávající antioxidační ochranu organismu, například vitamíny s antioxidační schopností (vitamín A, vitamín E) antioxidační enzymy (SOD, GPx či KAT) a další látky. Důležitým markerem posouzení oxidačního stresu i samotné antioxidační kapacity organismu je stanovení redukováného



glutathionu (GSH), ale také poměru redukovaného a oxidovaného glutathionu (GSH:GSSG). Glutathion je jedním z hlavních intracelulárních antioxidantů, jehož úkolem je vychytávat ROS (Dröge, 2000). Slouží také jako substrát pro enzym GPx, který organismus chrání před účinky H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 1.7 Experimentální zvířata

V současné době existuje několik zvířecích modelů pro radiační poškození plic, přičemž každý model má své výhody a nevýhody.

Nejčastěji jsou pro pokusy užívána malá laboratorní zvířata – myši a potkani. Na myším experimentálním modelu byly poprvé studovány zářením vyvolané změny v expresi cytokinů a chemokinů (Rubin, 1995). Potkaní model se pro změnu začal široce používat pro studium plicních funkcí (např. Zhang, 2008).

Radiační výzkum má fázi studia mechanismů a fázi validace poznatků. Při studiu mechanismů účinků radiačního záření se využívají spíše malá zvířata - hlodavci, zatímco velká zvířata – prase, pes, primáti jsou důležitými modely ve fázi validace (Augustine, 2005).

Přehled zvířecích modelů je uveden v následujících tabulkách 6 a 7.

**Tabulka 6** Přehled zvířecích modelů – malá zvířata  
(upraveno dle Williams, 2010)

Model	Výhody	Nevýhody
<b>Myš</b>	raidosenzitivita plicní tkáně podobná s lidskou stejná doba pro rozvoj pneumonitidy i fibrózy	jiná anatomická struktura plic –členění laloků, relativní šíře septa
<b>Potkan</b>	raidosenzitivita plicní tkáně podobná s lidskou stejná doba pro rozvoj pneumonitidy i fibrózy	jiná anatomická struktura plic –členění laloků, relativní šíře septa

**Tabulka 7** Přehled zvířecích modelů – velká zvířata  
(upraveno dle Williams, 2010)

model	Výhody	Nevýhody
prase Pes	podobná anatomická struktura plic ---	omezení jak lokální tak celotělové dávky záření stejně jako malá experimentální zvířata jiná stavba plic
vyšší primáti	nejvhodnější model	jen několik málo studií

Nejvíce propracovaný a nejlépe charakterizovaný je myší model radiační pneumonitidy a fibrózy plic (Rübe, 2000). Potkaní model radiační fibrózy plic nebyl doposud řádně prostudován. Mnohem častěji byla studována plicní fibróza vyvolaná u myší nebo potkanů bleomycinem (např. Endo, 2003 – myší model; Koslowski, 2003 – potkan). Bleomycin je protinádorové peptidové antibiotikum izolované z plísňe *Streptococcus verticillus* (Blum, 1973), které se využívá především při léčbě Hodgkinových a non-Hodgkinových lymfomů (Tapkire, 2009). Vznik intersticiální plicní fibrózy navozené bleomycinem závisí na dávce (Punithavathi, 2000). Mechanismus vzniku a rozvoje plicní fibrózy není ještě přesně definován. Existuje předpoklad, že bleomycin indukuje tvorbu ROS (Zelko, 2010), které pak vedou přes pneumonitidu k intersticiální plicní fibróze (Wei, 2010).

Pro studium radiačních účinků se také velmi často využívají buněčné linie. Jedná se o buňky malých a velkých laboratorních zvířat, ale také lidské buněčné linie (Marusyk, 2010).

---

## 2. KAPITOLA: CÍLE VÝZKUMNÉ PRÁCE

### Cíl výzkumné práce

1. Posoudit možnost využití vydechovaného oxidu dusnatého jako potenciálního prediktivního časného markeru celkové expozice organismu ionizujícímu záření po celotělovém ozáření
2. Posoudit radioprotektivní účinky vybraných látek s vlastnostmi antioxidantů a inhibitorů NOS (L-NAME, aminoguanidin, acetyl-L-karnitin) proti následkům celotělového ozáření
3. Posoudit možnost využití vydechovaného oxidu dusnatého jako potenciálního prediktivního markeru rozvoje radiační pneumonitidy
4. Posoudit radioprotektivní účinky výše uvedených látek proti následkům lokálního ozáření hrudníku

## 3. KAPITOLA: METODOLOGIE

### 3.1. Zvířata

K experimentu byly použity potkaní samice kmene Wistar (VELAZ, s.r.o., Únětice, ČR) prosté specifických patogenů (SPF). Laboratorní zvířata byla ustájena v klimatizované místnosti ( $22 \pm 2$  °C,  $50 \pm 10$  % relativní vlhkost, světlo od 07<sup>00</sup> do 19<sup>00</sup> hodin), krmena dietou standartní dietou ST-1 (Velaz, s.r.o.) a napájena vodovodní vodou *ad libitum*. Zacházení s experimentálními zvířaty bylo pod dohledem etické komise Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové, ČR.

### 3.2. Zdroj záření

V experimentech byl k ozáření použit kobaltový (<sup>60</sup>Co) zdroj (Chirana, Praha, ČR) gama záření. Pro dozimetrii byl použit klinický dozimetr PTW Unidos 1001 (sériové č. 11057, RPD Inc., Albertville, MN, USA) s ionizační komorou PTW TM 313 (sériové č. 0012, RPD Inc).

Ozařování potkanů gama zářením bylo prováděno jednak celotělově dávkami v rozmezí 2 až 50 Gy, dávkovým příkonem 1-0,6 Gy/min ze vzdálenosti 1 m od zdroje. K celotělovému ozáření bylo použito boxu z plexiskla, které umožnilo ozářit 10 zvířat najednou, bez anestézie.

Pro analgosedaci zvířat před aplikací lokálního ozáření byla použita kombinace látek narkamon (5%, 40 mg/kg, BIOVETA, a.s, Ivanovice na Hané, ČR) a rometar (2%, 4,8 mg/kg, BIOVETA, a.s, Ivanovice na Hané). Ozařování probíhalo jednotlivě upoutáním na umělohmotnou podložku (VLA JEP, Hradec Králové, ČR) ve vzdálenosti 0,5 m a dávkovým příkonem 4,1-2,5 Gy/min. Byla ozařována oblast plic (3 cm na šířku) zbylé části těla byly stíněny 10 ti cm olova. Kontrolní zvířata byla ovlivněna stejným způsobem bez ozáření.

### **3.3. Ukončení experimentu**

Na konci experimentu byla zvířata uspána pentobarbitalem sodným (dávka 50 mg/kg i. p., Sigma Aldrich, Praha, ČR) a následně usmrcena vykrvácením z břišní aorty. Bronchoalveolární laváž (BAL) byla získána výplachem 10 ml 0,9% fyziologického roztoku (B. Braun Medical s.r.o., Praha, ČR) při tracheostomii. Vzorky nesrážlivé krve (odběrový systém: 9 ml S monovette K3EDTA, SARSTEDT spol. s r.o., Praha, ČR) a tekutiny z bronchoalveolární laváže (odběrový systém: 15ml centrifugační zkumavky, P - LAB a.s., Praha, ČR) byly po odebrání centrifugovány (2000 g/10 min/4°C), rozpipetovány a zamraženy při teplotě -80 °C.

### **3.4. Vydechovaný oxid dusnatý**

Měření koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého (eNO) je neinvazivní vyšetření, jehož výsledek odráží zánět probíhající v oblasti dýchacích cest a plic. Výsledek vyšetření se udává jako frakční koncentrace NO ve vydechovaném vzduchu (symbol FeNO). FeNO je biomarker, využívaný při monitorování zánětu průdušek při astmatu, ale také u dalších chorob např. chronické plicní obstrukční nemoci (CHOPN). Při detekci nízkých koncentrací vydechovaného NO (jednotky až desítky ppb, tj. parts per bilion) NO se využívají elektrochemické a chemiluminiscenční analyzátory.

Stanovení eNO jsme prováděli chemiluminiscenční metodou na analyzátoru CLD 88 (Ecomedics, Duernten, Švýcarsko). Principem této metody je oxidace NO ozonem a následná emise žlutozeleného záření. Koncentrace je udávána v jednotkách ppb, měřící rozsah přístroje je 0,1 až 5000 ppb.

Potkan je umístěn do hermeticky uzavřené plastové komory o objemu 3 l (P - LAB a.s.), která je před měřením vyfoukána 3 minuty vzduchem zbaveným NO. Po 10 minutách je otevřen ventil spojující komoru s nasávací kanylou NO analyzátoru a je změřena koncentrace NO ve vzduchu v komoře (rychlost nasávání vzorku do

analyzátoru: 330 ml/min). Metoda je drobnou modifikací metody použité jinými autory (Ahmad, 2009).

### **3.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie nebo také vysokotlaká kapalinová chromatografie je analytická metoda pro separaci a analýzu směsí látek, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. Výhodou oproti klasické kapalinové chromatografii je nižší spotřeba organických rozpouštědel a tím i snížení nákladů. Principem této metody je rozdílná distribuce stanovovaných látek ve vzájemně nemísitelných fázích. Odebraný biologický vzorek je před nástřikem na chromatografickou kolonu vhodně upraven. Obvykle se provádí precipitace proteinů ze vzorku, extrakce analytů z biologické matrix například v systému kapalina-kapalina nebo na kolonkách s pevným sorbentem. V některých případech se provádí derivatizace stanovované látky, jejímž nejčastějším důvodem je zcitlivění detekce.

#### **3.5.1. Malondialdehyd (MDA)**

##### **Parametry metody**

**systém:** Shimadzu (Kyoto, Japonsko) / Agilent (Santa Clara, CA, USA)

**kolona:** NUCLEOSIL 100-5 C18 (4,6x125 mm, Macherey-Nagel, Düren, Německo)

**nástřik:** 30-100  $\mu$ l (podle typu vzorku)

**průtok:** 1,0 ml/min

**mobilní fáze:** izokratická - acetonitril (ACN) + voda + kyselina octová (380:620:2)  
pH=3,4

**teplota na koloně:** 30 °C

**detektor:** UV/VIS

**vlnová délka:**  $\lambda$ = 310 nm

**doba analýzy:** 11 minut

### Použité chemikálie

**standard:** tetrabutylamonium malondialdehyd (Sigma Aldrich,  $M_r = 313,53 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**derivatizační činidlo:** 2,4-dinitrofenylhydrazin (Sigma – Fluka,  $M_r = 198,14 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**deproteinační činidlo:** 35% (v/v) kyselina chloristá ( $M_r = 100,46 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**pomocné roztoky:**

→ 2 M kyselina chlorovodíková ( $M_r = 36,46 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ 6 M hydroxid sodný ( $M_r = 40,00 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ 1% kyselina sírová ( $M_r = 98,08 \text{ g.mol}^{-1}$ )

K 250  $\mu\text{l}$  vzorku nebo standardu bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  6M NaOH. Po alkalické hydrolýze 30 minut při teplotě 60 °C byly vzorky ochlazeny stáním po dobu 5 minut v chladu (-20 °C). Pro deproteinaci vzorku bylo do objemu přidáno 125  $\mu\text{l}$  35% HClO<sub>4</sub>. Ze supernatantu po centrifugaci (15000 g/10 minut/4°C) bylo odebráno 250  $\mu\text{l}$  a přidáno 25  $\mu\text{l}$  derivatizačního činidla (5 mM DNPH), Po 10 minutové inkubaci byla stanovena koncentrace produktu derivatizace (1-(2,4-dinitrofenyl)pyrazol). Metoda je modifikací postupu podle Pilze (Pilz et al. 2000).

### 3.5.2. Arginin

#### Parametry metody

**system:** Agilent

**kolona:** Kinetex C18 (3x150 mm, 2,6 $\mu\text{m}$ , Phenomenex, Torrance, CA, USA)

**nástřik:** 1  $\mu\text{l}$

**průtok:** 0,85 ml/min

**mobilní fáze:** gradientová - A: H<sub>2</sub>O-kyselina mravenčí (pH = 3)

B: MeOH → 0,0 – 11,0 min: 7-19% B

→ 11,0 – 14,5 min: 30% B

→ 14,5 – 16,5 min: 7% B

**teplota na koloně:** 45 °C

**detektor:** fluorescenční

**vlnová délka:** excitační = 335 nm

emisní = 450 nm

**doba analýzy:** 16,5 minut

### **Použité chemikálie**

**standard:** arginin (Sigma Aldrich,  $M_r = 174,20 \text{ g.mol}^{-1}$ )

nor-NOHA (Cayman,  $M_r = 176,20 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**derivatizační činidlo:** *o* – phtaldialdehyd (OPA, Sigma Aldrich,  $M_r = 134,13 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**eluční činidlo:** octan draselný:voda:methanol (20:20:60)

**pomocné roztoky:**

→ 0,1 M kyselina chlorovodíková ( $M_r = 36,46 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ 1 M octan draselný ( $M_r = 82,03 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ 50 mM fosfátový pufr pH=7,4 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ( $M_r = 138,00 \text{ g.mol}^{-1}$ ) nebo  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $M_r = 156,01$ ))

→ methanol ( $M_r = 32,04 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ kyselina 3-merkaptopropionová ( $M_r = 106,14 \text{ g.mol}^{-1}$ )

K 200  $\mu\text{l}$  vzorku plazmy (1000  $\mu\text{l}$  vzorek BAL) nebo standardu bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  standardu argininu a 600  $\mu\text{l}$  fosfátového pufru (pH 7,4). Analyty byly extrahovány z biologické matrice na kolonkách s pevnou fází Oasis MCX (Waters, Milford, MA, USA) pomocí následujícího postupu: Kolonka se promyje 2 ml MeOH a 2 ml vody (příprava sorbentu). Poté je na kolonku nanášeno 850  $\mu\text{l}$  vzorku plazmy nebo 1350  $\mu\text{l}$  BAL. Kolonka se promyje 1 ml 0,1M HCl a 1 ml MeOH. Poté následuje eluce vzorku 1 ml elučního činidla. Vzorky po eluci se odpaří pod proudem dusíku (teplota termostatu 40 °C). Odparek vzorku je rozpuštěn ve 200  $\mu\text{l}$  vody. Po přidání 200  $\mu\text{l}$  derivatizačního činidla



(OPA) se vzorek analyzuje. Metoda je modifikací dříve publikovaného postupu (Teerlik et al. 2002).

### **3.5.3. Koncentrace dusičnanů/dusitanů (NO<sub>x</sub>)**

#### **3.5.3.1. Homogenizace tkání pro HPLC stanovení NO<sub>x</sub>**

Zmrazená tkáň byla pomocí tekutého dusíku (Linde Gas a.s., Praha, ČR) rozetřena v třecí misce. 100 mg prášku bylo smícháno s acetátovým pufrům (25 mmol/l, pH=4,5). Výsledná suspenze byla centrifugována (15000 g/15 min/4 ° C). K deproteinaci supernatantu byla využita ultrafiltrace (10000 g/15min/4°C) pomocí kolonek Microcon YM-30 (Millipore Corp., Billerica, MA, USA). Pro HPLC stanovení NO<sub>x</sub> byl použit ultrafiltrát.

#### **Parametry metody**

**system:** Shimadzu / Agilent

**kolona:** Gemini–NX C18 (4,6x150 mm, 5µm, 110Å, Phenomenex)

**nástřik:** 20 µl

**průtok:** 1,0 ml/min

**mobilní fáze:** izokratická – 20M borátový pufr + ACN (70:30)

**teplota na koloně:** 45 °C

**detektor:** fluorescenční

**vlnová délka:** excitační = 365 nm

emisní = 435 nm

**doba analýzy:** 8 minut

#### **Použité chemikálie**

**standard:** dusičnan sodný (Sigma Aldrich, Mr= 85,00 g.mol<sup>-1</sup>)

**derivatizační činidlo:** 2,3-diaminonaftalen (Sigma Aldrich, Mr= 158,20 g.mol<sup>-1</sup>)

**redukční činidlo:** nitrát reduktáza (NR, původ *Aspergillus niger*, Sigma Aldrich)

**kofaktor:** NADPH (Sigma Aldrich)

**pomocné roztoky**

- 20 mM borátový pufr (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, pH=8,7, Mr= 61,83 g.mol<sup>-1</sup>)
- 0,62 M kyselina chlorovodíková (Mr= 36,46 g.mol<sup>-1</sup>)
- 0,1 M hydroxid sodný (Mr= 40,00 g.mol<sup>-1</sup>)
- 170 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (pH=7,4, Mr= 358,14 g.mol<sup>-1</sup>)
- roztok NR - 170 mM fosfátový pufr+glukóza-6-fosfát + glukóza-6-fosfát dehydrogenáza

K 20 µl vzorku nebo standardu bylo přidáno 7,5 µl pracovního roztoku NR a 6 µl roztoku NADPH. Po dobu 45 minut ve tmě při laboratorní teplotě probíhala redukce dusičnanů na dusitany. Poté bylo ke vzorku přidáno 120 µl derivatizačního činidla (DAN) a vzorek byl inkubován 10 minut ve tmě při laboratorní teplotě. Reakce byla ukončena přidáním 300 µl 0,1 M roztoku NaOH. Metoda je modifikací postupu, který publikovali Woitzik a spolupracovníci (Woitzik et al. 2001).

### **3.6. Stanovení celkové bílkoviny (TP)**

Principem této reakce je alkalická redukce Cu<sup>2+</sup> na Cu<sup>1+</sup> proteiny ve vzorku a následná tvorba chelátů iontu s kyselinou bicinchoninovou.

#### **Použité chemikálie**

**standard:** bovinní sérový albumin (Sigma Aldrich)

**vizualizační činidlo:** reagensie A:B(50:1)

- **reagencie A:** uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, kyselina bicinchoninová a tartrát sodný v 0,1M hydroxidu sodném
- **reagencie B:** 4% síran měďnatý

Ke stanovení celkové bílkoviny byla použita spektrofotometrická metoda provedená pomocí diagnostické soupravy BCA Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA). Do mikrotitrační destičky bylo pipetováno 40  $\mu\text{l}$  vzorku nebo standardu a 180  $\mu\text{l}$  činidla. Reakční směs byla inkubována 30 minut při 37 °C, poté se odečetla absorbance při 562 nm.

### **3.7. Stanovení exprese proteinů pomocí metody Western blot**

Metoda Western blot je analytická metoda sloužící k detekci proteinu pomocí specifické protilátky. Jedná se o dvoukrokovou metodu. V prvním kroku jsou proteiny separovány na základě molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Po elektroforéze následuje v druhém kroku přenos separovaných proteinů na PVDF membránu a jejich detekce pomocí specifických protilátek

#### **3.7.1. Homogenizace tkání pro elektroforézu**

##### **Použité chemikálie**

**zásobní pufr:** pH=7,4

- 1 mM EDTA ( $M_r=292,20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
- 50 mM TRIS ( $M_r=121,10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
- Triton X-100

**homogenizační pufr:**

- zásobní pufr
- 1 mM Phenylmethanesulfonyl fluoride (Sigma Aldrich,  $M_r=174,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
- 1 mM DL-Dithiothreitol (Sigma Aldrich,  $M_r=154,25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
- 1,5  $\mu\text{M}$  Aprotinin (Sigma Aldrich,  $M_r=6511,5 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

→ 14,5 uM Pepstatin A (Sigma Aldrich,  $M_r=685,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

→ 23,4 uM Leupeptin (Serva,  $M_r=426,6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

Vzorky orgánů (plíce, játra) byly po odběru zamraženy v tekutém dusíku a uloženy při  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . Homogenizace tkáně byla provedena v homogenizačním pufru (poměr tkáň:pufr byl 1:5) za chladu ( $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) pomocí homogenizátoru Ultra Turrax (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo). První centrifugace zhomogenizované tkáně proběhla při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 10 minut a 1000 g. Supernatant byl podroben druhé centrifugaci po dobu 30 minut při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  a 19000 g. Stanovení exprese daných proteinů bylo provedeno v supernatantu po druhé centrifugaci.

Koncentrace proteinů byla stanovena diagnostickou soupravou BCA Protein Assay Reagent (Pierce).

### 3.7.2. Western blot

#### Parametry metody

**elektroforéza:** 200 V/240 mA, čas závislý od pohyblivosti proteinů

**blotting:** 100 V/250 mA, 120 minut

#### Použité chemikálie

##### **protilátky primární**

- iNOS polyclonal antibody (Cayman, Praha, Česká republika)
- anti- $\beta$ -actin (Sigma Aldrich)
- Purified Mouse Anti-Arginase I (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA)
- Arginase II (H-64, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)

##### **protilátky sekundární**

- Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins /HRP (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dánsko)
- Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (Dako Denmark A/S)

**0,5M zaostřovací pufr: pH=6,8**

→ Tris-HCl (Sigma Aldrich,  $M_r=157,60 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**1,5M rozdělovací pufr: pH=8,8**

→ Tris-HCl (Sigma Aldrich,  $M_r=157,60 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**akrylamid**

→ 30% akrylamid (Sigma Aldrich,  $M_r=71,08 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ 0,8% bis-akrylamid (,  $M_r=154,17 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**dodecyl síran sodný (10%, Serva,  $M_r=288,38 \text{ g.mol}^{-1}$ )****amonium persulfát (10%, Sigma Aldrich,  $M_r=228,20 \text{ g.mol}^{-1}$ )****tetramethylethylendiamin (Sigma Aldrich,  $M_r=116,20 \text{ g.mol}^{-1}$ )****vzorkový pufr**

→ 0,5 M Tris-HCl (Sigma Aldrich,  $M_r=157,60 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ glycerol (  $M_r=92,09 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ dodecyl síran sodný (Serva,  $M_r=288,38 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ 0,1% bromidová modř

→ 15%  $\beta$ -merkptoethanol (Sigma Aldrich,  $M_r=84,17 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**running pufr: pH=8,3**

→ 25 mM Tris (Sigma Aldrich,  $M_r=157,60 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ Glycin (Sigma Aldrich,  $M_r=75,07 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ dodecyl síran sodný (Serva,  $M_r=288,38 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**transfer pufr: pH=8,3**

→ 25 mM Tris (Sigma Aldrich,  $M_r=157,60 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ Glycin (Sigma Aldrich,  $M_r=75,07 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ 20% methanol ( $M_r=32,04 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**10xTBS- Tris-buffered saline: pH= 7,6**

→ 20 mM Tris (Sigma Aldrich,  $M_r=157,60 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→ 137 nM hydroxid sodný ( $M_r=40,00 \text{ g.mol}^{-1}$ )

**TBS-T – Tris-buffered saline+Tween**

→ Tween 20 (Sigma Aldrich)

**sušené odtučněné mléko** (5%, Bio-Rad, Praha, Česká republika)

**bovinní sérový albumin** (5%, Sigma Aldrich)

Tkáňový homogenát byl naředěn 3x koncentrovaným SDS vzorkovým pufrům a zahřát na 90 °C po dobu 5 minut. 30 mg proteinu bylo nanášeno na 10-15% SDS-polyakrylamidový gel (dle molekulární hmotnosti sledovaného proteinu) a elektroforeticky separováno systémem Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Praha, Česká republika).

Poté byly separované proteiny přeneseny z gelu na PVDF membrány pomocí Trans-Blot aparatury (Bio-Rad, Praha, Česká republika). Po 1 h blokaci v TBS pufru pH 7.6 (20 mM Tris, 137 mM NaCl), obsahujícím 5% odtučněné mléko a 0,05% Tween 20 byly membrány inkubovány přes noc při teplotě 4 °C s následujícími protilátkami: iNOS polyklonální protilátka (1:500), anti- $\beta$ -aktin (1:20 000), argináza I (1:1000) a argináza II (1:500). Po promytí v TBS, obsahujícím 0,05% Tween 20, byly membrány inkubovány se sekundární protilátkou anti-myší IgG konjugovanou s křenovou peroxidázou pro Arginázu I (1:1000) a  $\beta$ -aktin (1:25 000) a anti-králičí IgG konjugovanou s křenovou peroxidázou pro iNOS a arginázu II (1:2000). K detekci navázaných protilátek byl použit kit Chemiluminescence Western Blotting (Roche, Basel, Švýcarsko).

### **3.8. Stanovení exprese proteinů pomocí metody RT-PCR**

Polymerázová řetězová reakce je molekulárně biologická metoda sloužící k namnožení úseků DNA, které se pak dále využívají například k diagnostice infekčních onemocnění, sekvenaci DNA, diagnostice dědičných onemocnění či analýze genů.

PCR se skládá ze tří základních kroků, které se neustále opakují. Počet opakování je asi 30-50. Po 30 opakováních je získána přibližně 1 miliardasynthetizovaných úseků DNA. Prvním krokem je denaturace DNA probíhající při 95 °C, kdy dochází k rozdělení

vlákna DNA. Poté dochází k nasednutí specifických primerů, annealing, při teplotě 50-60°C. Konečným krokem PCR je elongace, neboli syntéza DNA, kdy dochází k vlastní syntéze nové DNA.

RT-PCR – neboli PCR v reálném čase je modifikací klasické metody PCR, která umožňuje sledování průběhu reakce v reálném čase pomocí fluorescenčních sond či barev. Hlavní výhodou RT-PCR oproti klasické PCR je možnost kvantifikovat nasyntetizovaný produkt DNA.

### **3.8.1. Homogenizace tkání pro RT-PCR**

#### **Použité chemikálie**

**Kit pro izolaci RNA:** RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo)

**Kit pro transkripci cDNA:** High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA)

**Kit pro RT-PCR expresi genů:** TaqMan® Gene Expression Assay (Life Technologies Corporation)

**Master Mix pro RT-PCR expresi genů:** TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Life Technologies Corporation)

#### **pomocné roztoky**

→ Ethanol ( $M_r = 46,07 \text{ g.mol}^{-1}$ )

→  $\beta$ -merkptoethanol ( $M_r = 84,17 \text{ g.mol}^{-1}$ )

#### **3.8.1.1. Optimalizace homogenizace tkáně pro izolaci RNA**

Pro izolaci RNA z plicní tkáně byly testovány 3 metody homogenizace. Homogenizace probíhala při teplotě 4 °C.

### 1. Homogenizace za pomoci homogenizatoru Ultra Turrax

K plicní tkáni o hmotnosti 25-30 mg bylo přidáno 350  $\mu$ L pufru RLT (Qiagen) a pomocí homogenizatoru Ultra Turrax (IKA Werke GmbH & Co. KG) byla tkáň zhomogenizována.

### 2. Homogenizace pomocí kuliček s přidavkem $\beta$ -merkapt ethanolu

Ke skleněným kuličkám (průměr 1,2 mm) o celkové hmotnosti 0,17-0,18 g bylo přidáno 25-30 mg plicní tkáně a 350  $\mu$ l RLT pufru (Qiagen) a 10  $\mu$ l  $\beta$ -merkapt ethanolu. Pro homogenizaci byl použit přístroj MagNA Lyser (Roche, Basel, Švýcarsko). Parametry pro homogenizaci tkáně byly 6500 ot/min, 15 s. Celý proces homogenizace byl opakován 3x, mezi jednotlivými homogenizacemi byl vzorek chlazen v  $-20$  °C po dobu 5 min.

### 3. Homogenizace pomocí kuliček bez přidavku $\beta$ -merkapt ethanolu

Homogenizace postupem podle bodu 2 ale bez přidavku  $\beta$ -ME

## 3.8.2. Izolace RNA z plicní tkáně

### 3.8.2.1. Izolace RNA pomocí kitu

**Kit:** RNeasy Mini Kit

Zhomogenizovaná tkáň byla centrifugována při 16000 g 3 min (4 °C). Supernatant byl převeden do čisté zkumavky a následoval přidavek 350  $\mu$ l 70% EtOH. Tato směs byla nanášena na připravenou kolonku, pod kolonku byla umístěna čistá mikrozkuavka a proběhla centrifugace 30 s při 8000 g (4 °C). Po odstranění filtrátu bylo na kolonku nanášeno 700  $\mu$ l pufru RW1. Následovala další centrifugace 30 s při 8000 g (4 °C). Pufr RW1 odstranil ze směsi sacharidy, proteiny a mastné kyseliny. Po odstranění filtrátu bylo na kolonku nanášeno 500  $\mu$ l pufru RPE a proběhla centrifugace 30 s při 8000 g. RPE pufr sloužil k odstranění solí ze vzorku. Po odstranění filtrátu bylo znovu nanášeno 500  $\mu$ l pufru RPE. Následně proběhla centrifugace 2 min při 8000 g. Pod kolonku byla umístěna



čistá zkumavka a centrifugace probíhala na nejvyšší otáčce (16000 g) po dobu 1 min (4 °C). Pod kolonku byla umístěna nová mikrozskumavka a bylo nanášeno 30 µl RNase-free water. Vzorek byl ponechán 3 min stát a proběhla centrifugace 1 min při 8000 g (4 °C).

### 3.8.2.2. Měření koncentrace a čistoty RNA

Koncentrace a čistota RNA byla měřena pomocí spektrofotometru Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Koncentrace RNA je stanovena měřením absorpance vzorku při vlnové délce 260 nm. Čistota RNA se zjišťuje pomocí hodnoty poměru absorpací A260 / A280 a A230 / A260. Při poměru absorpací 260/280 nižších než 1,7 nebyl vzorek při izolaci dostatečně separován od bílkovin. Při poměru absorpací 230/260 nižších než 1,7 byl vzorek kontaminován organickými sloučeninami, které se používaly při izolaci RNA.

### 3.8.2.3. Přepis RNA do cDNA

**Kit:** High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Vzorek RNA byl zředěn pomocí RNase-free water (Qiagen) na koncentraci 200 ng/µl.

Potřebný objem jednotlivých komponent pro jeden vzorek

Komponenty	µl	µl+8 %
10x RT buffer	2	2,16
25x dNTP Mix (100mM)	0,8	0,87
10x RT random Primers	2	2,16
Multiscribe Reverse Transcripase	1	1,08
Nuclease-free Water	9,2	9,94
<b>celkový objem</b>	<b>15</b>	<b>16,21</b>

Mikrozskumavky s RNA byly vloženy do cykléru (2720 Thermal Cycler, Life Technologies Corporation). Pro transkripci byl použit následující časový a teplotní protokol:

25 °C 10 min

32 °C 120 min

85 °C 5 s

4°C→poté byly vzorky uchovávány při -20 °C.

### 3.8.3. RT-PCR

Analýza byla provedena s použitím systému Applied Biosystems 7500 HT Fast Real-Time PCR systému (Foster City, USA). Jako vnitřní kontrola byl použit GAPDH, tzv. housekeeping gen, který poukazuje na správný přepis RNA do cDNA. Kvantifikace cílového genu byla prováděna pomocí porovnání exprese GAPDH a cílového genu. Použité geny jsou uvedeny v následující tabulce

	symbol genu	název genu	assay ID	délka amplikonu
<b>iNOS</b>	Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible	Rn00561646_m1	77
<b>eNOS</b>	Nos3	nitric oxide synthase 3, endothelial cell	Rn02132634_s1	117
<b>ARG II</b>	ArgII	arginase type II	Rn00569814_m1	123
<b>ARG I</b>	ArgI	arginase, liver	Rn00567522_m1	63
<b>CAT1</b>	Slc7a1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	Rn00565399_m1	76
<b>CAT2</b>	Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	Rn01488325_m1	74
<b>CAT3</b>	Slc7a3	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 3	Rn00500256_m1	80
<b>GAPDH</b>	Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Rn01775763_g1	174

**Kit:** TaqMan® Gene Expression Assay

TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG

Potřebný objem jednotlivých komponent Master Mixu (MM) pro jeden vzorek

Komponenty	μl
<b>20x TaqMan Gene Expression Assay</b>	0,5
<b>2x TaqMan Fast Universal PCR</b>	5
<b>celkový objem</b>	<b>5,5</b>

Vzorky byly napipetovány do destičky v dubletu. K 5,5  $\mu$ l MM byl přidán 4,5  $\mu$ l vzorku. Destičku zakryjeme krycí fólií a zavortexujeme. Točíme 5 min při 2000 g. Pro RT-PCR byl použit následující časový a teplotní protokol:

**Zahájení RT- PCR**

95 °C 3 min

**Opakování cyklu: 40x**

95 °C 10 s

60 °C 10 s

### **3.9. Histologické vyšetření**

Vzorky plic byly po odebrání fixovány v roztoku 10% neutrálního formalinu (Chemapol, Praha, Česká republika). Další zpracování proběhlo na Katedře radiobiologie (Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany) Po fixaci ve formaldehydu byly vzorky plic vloženy do parafínu (Paramix, Holice, Česká Republika). Následně byly vytvořeny tkáňové řezy 5  $\mu$ m silné pomocí Microtonu (Leica SM2000 R, Heidelberg, Německo). Vzdušnost plic byla posouzena zjišťováním volného prostoru mezi septy, při barvení hematoxilin-eosinem (Merck, Praha, Česká Republika)

K detekci fagocytujících buněk byla využita hydrolýza specifického substrátu chloracetát esterázou přítomnou v granulách neutrofilních granulocytů (kit Sigma Aldrich, Praha, Česká republika).

Vzdušnost plicní tkáně a počet neutrofilních granulocytů byly měřeny v 15 náhodně vybraných polích při zvětšení 400-krát pomocí BX-51 mikroskopu (Olympus, Praha, Česká republika) a softwaru ImagePro 5,1 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

---

### **3.10. Statistická analýza**

Při statistickém hodnocení dat bylo nejdříve posuzováno jejich rozložení. Pokud se výrazně lišilo od gausovského, byla analýza provedena neparametrickým Mann-Whitneyho testem nebo analýzou rozptylu (ANOVA) po logaritmické transformaci dat. Pokud rozložení odpovídalo gausovskému, byl použit t-test a při vzájemném srovnávání tří a více experimentálních skupin ANOVA. V případě hodnocení přežívání byl použit Kaplanův-Meierův odhad. Za statisticky významnou byla považována hodnota  $P < 0,05$ . Pro statistické zpracování byly použity programy Statistica 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA), GraphPad Prism, verze 5.02 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) a SigmaStat 3.1 (Systat Software Inc., Erkhart, Germany).

## 4. KAPITOLA: VÝSLEDKY

### 4.1. Celotělové ozáření

#### 4.1.1. Porovnání změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu vyvolaných ionizujícím zářením s účinky bakteriálního LPS u potkana kmene Wistar

První studie byla zaměřena na porovnání vlivu ionizujícího záření a aplikace bakteriálního lipopolysacharidu (původ *Escherichia coli* 055:B5, Sigma Aldrich) na metabolickou dráhu arginin - oxid dusnatý a markery nitračního stresu.

Lipopolysacharidový model byl zaveden na Ústavu farmakologie (Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze). U tohoto modelu byly použity samice potkana kmene Wistar SPF (specific pathogen-free) o hmotnosti 200-300 g (Velaz, s.r.o., místo, Česká republika). Zvířata byla rozdělena do tří skupin po 8 zvířatech.

Pro model s ionizujícím zářením byly použity samice potkana kmene Wistar SPF o hmotnosti 170-250 g (Velaz, s.r.o.). Zvířata byla rozdělena do skupin po 6 zvířatech. Zvířata byla celotělově vystavena dávkám záření od subletálních po letální (2 až 50 Gy).

Ve vzorcích plazmy, v tekutině z BAL, a v homogenátech jater a plic byly stanovovány dusičnany/dusitany (NO<sub>x</sub>) a arginin. Koncentrace eNO byla vyšetřena neinvazivně ve vydechovaném vzduchu. Ukončení experimentu probíhalo v 6. a 24. hodině po ozáření, resp. po aplikaci LPS. Kontrolní skupiny zahrnují potkany neozářené a potkany s intraperitoneální aplikací sterilního pufovaného fyziologického roztoku (PBS), který sloužil jako vehikulum při podávání LPS.

#### 4.1.1.1. Projekt pokusu

##### Použité chemikálie

**LPS** (Sigma Aldrich, původ *Escherichia coli* 055:B5)

**Pentobarbital sodný** (Sigma Aldrich, Mr= 248,25 g.mol<sup>-1</sup>)

### **Aplikace látek**

**LPS:** i.p., 5 mg/kg

**Pentobarbital sodný:** i.p., 50 mg/kg

### **Rozvržení pokusu**

**Tabulka 8** Rozdělení zvířat do skupin – celotělově ozáření

<i>dávka (Gy)</i>	<i>počet zvířat</i>	<i>interval (h)</i>	
0	6	6	24
2	6	6	24
5	6	6	24
10	6	6	24
20	6	6	24
50	6	6	24

**Tabulka 9** Rozdělení zvířat do skupin – aplikace LPS

<i>Aplikace</i>	<i>Počet zvířat</i>	<i>interval (h)</i>	
PBS	6	6	24
LPS	6	6	24

#### **4.1.1.2. Výsledky**

Z původního rozpětí dávek 2-50 Gy byly vybrány dávky 5 a 50 pro další analýzy časových profilů koncentrací sledovaných látek. Vodítkem byla skutečnost, že u dávky 5 Gy dochází ke statisticky významnému zvýšení NOx v plazmě oproti kontrolní skupině a dávka 50 Gy je maximální zvolená dávka.

Výsledky eNO byly testovány pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) s následným Bonferroniho post-hoc testem. Koncentrace NOx a argininu byly testovány pomocí jednofaktorové ANOVA s Dunnettovým post-hoc testem. Jako popisné statistické charakteristiky byly zvoleny průměr a směrodatná odchylka. V případě eNO průměr a střední chyba průměru.

Celkové výsledky shrnuje tabulka v příloze (Tabulka 36).

## 4.1.1.2.1. Vydechovaný oxid dusnatý

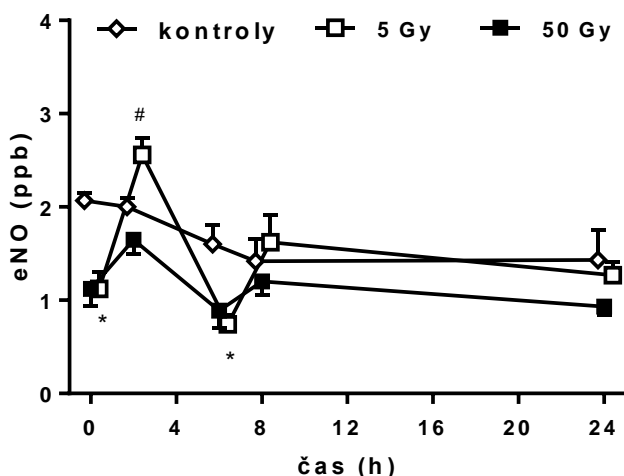
Stanovení koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého u skupin zářených dávkami 5 a 50 Gy ukázalo statisticky významné snížení hodnot v nulté a šesté hodině ve srovnání s kontrolní skupinou (Tabulka 10, Graf 1). Ve 2. hodině po záření dávkou 5 Gy došlo ke statisticky významnému zvýšení hodnot eNO vůči hodnotám nalezeným v nulté hodině (Tabulka 10, Graf 1). Tyto změny však nebyly srovnatelné se změnami nalezenými u zvířat, kterým byl aplikován LPS. Zde došlo v 6. hodině po aplikaci LPS k rapidnímu nárůstu hodnot až na 50 násobek výsledku kontrolní skupiny. Ve 24. hodině mírné zvýšení přetrvávalo (Tabulka 11, Graf 2).

**Tabulka 10** Časový profil eNO po dávce 5 a 50 Gy

		0 h	2 h	6 h	8 h	24 h
eNO (ppb)	Kontroly	2,07 (0,09)	2,00 (0,10)	1,60 (0,21)	1,42 (0,25)	<b>1,43 (0,32)</b>
	5 Gy	1,12 (0,18) <sup>a</sup>	2,56 <sup>c</sup> (0,18)	0,74 <sup>a</sup> (0,11)	1,62 (0,30)	<b>1,27 (0,14)</b>
	50 Gy	1,12 (0,18) <sup>a</sup>	1,65 (0,15)	0,89 <sup>a</sup> (0,19)	1,2 (0,14)	<b>0,93 (0,08)</b>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: a... $P \leq 0,05$ , c... $P \leq 0,001$  (ANOVA: Dunnettův test)

**Graf 1** Časový profil vydechovaného oxidu dusnatého v intervalu 24 hodin po celotělovém ozáření dávkami 5 a 50 Gy

**Legenda:**

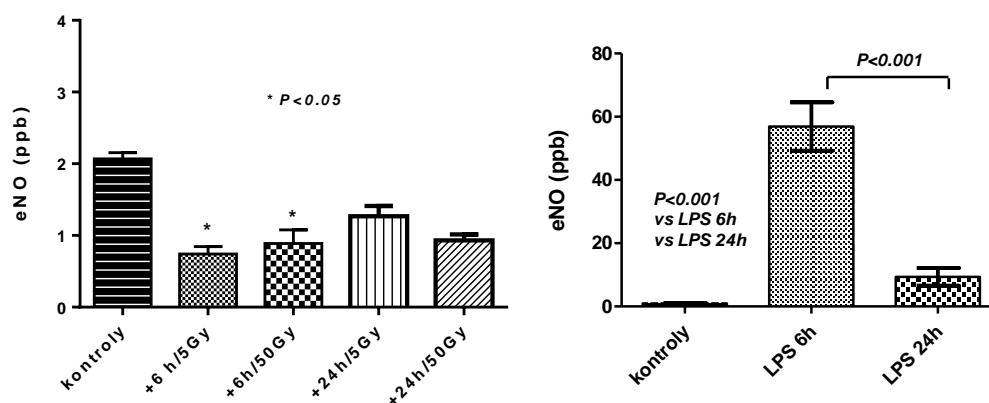
\*  $P < 0,05$  (srovnání s kontrolní skupinou)  
#  $P < 0,001$  (srovnání shodnotou eNO v 0 hodině u dávky 5 Gy)

**Tabulka 11** Porovnání hladin eNO po celotělovém ozáření a aplikaci LPS

	Kontroly	5 Gy +6 h	5 Gy +24 h	50 Gy +6 h	50 Gy +24 h	PBS kontroly	LPS +6 h	LPS +24 h
eNO (ppb)	2.07 (0.09)	0.74 (0.26) <sup>a</sup>	1.3 (0.34)	0.89 (0.46) <sup>a</sup>	0.93 (0.21)	0.94 (0.39)	57 (22) <sup>c</sup>	9.4 (7.4) <sup>c</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: a... $P \leq 0,05$ , c... $P \leq 0,001$  (ANOVA: Dunnettův test)

**Graf 2** Porovnání koncentrací eNO v 6. a 24. hodině po celotělovém ozáření dávkami 5 a 50 Gy a po aplikaci LPS



#### 4.1.1.2.2. NO<sub>x</sub> a arginin v plazmě

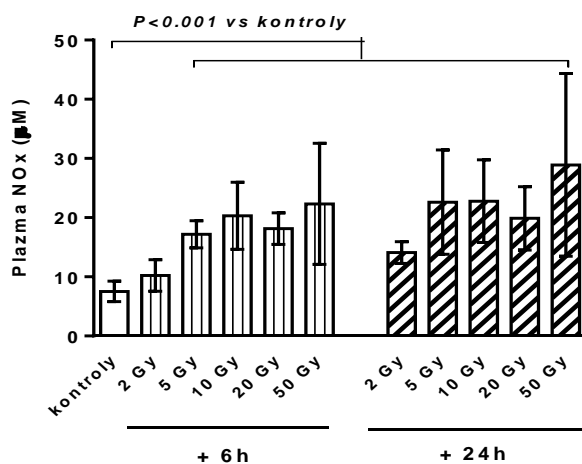
Po celotělovém ozáření dávkami 2 až 50 Gy byl pozorován dávkově závislý nárůst koncentrací NO<sub>x</sub> v plazmě (Tabulka 12, Graf 3). Také po aplikaci LPS došlo ke změnám v koncentraci dusičnanů/dusitanů (NO<sub>x</sub>) v plazmě (Tabulka 13, Graf 4). Podobně jako u exhalovaného NO byl nárůst koncentrace NO<sub>x</sub> v plazmě vlivem LPS mnohonásobně vyšší než v důsledku ozáření. K signifikantnímu zvýšení došlo v čase 24 h, zatímco po ozáření bylo největší zvýšení pozorováno v čase 6 h.

**Tabulka 12** Koncentrace NO<sub>x</sub> v plazmě v 6. a 24. hodině po celotělovém ozáření v závislosti na dávce

	Kontroly	2 Gy	5 Gy	10 Gy	20 Gy	50 Gy
NO <sub>x</sub> (μM)	7,53 (1,72)	6 h 10,24 (2,67)	17,21 (2,29) <sup>c</sup>	20,32 (5,67) <sup>c</sup>	18,15 (2,67) <sup>c</sup>	22,33 (10,2) <sup>c</sup>
		24 h 14,11 (1,84) <sup>c</sup>	22,62 (8,80) <sup>c</sup>	22,78 (6,97) <sup>c</sup>	19,88 (5,35) <sup>c</sup>	28,91 (15,4) <sup>c</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: c...P ≤ 0,001 (ANOVA: Dunnettův test)

**Graf 3** Závislost plazmatické koncentrace NO<sub>x</sub> na dávce ionizujícího záření při celotělovém ozáření

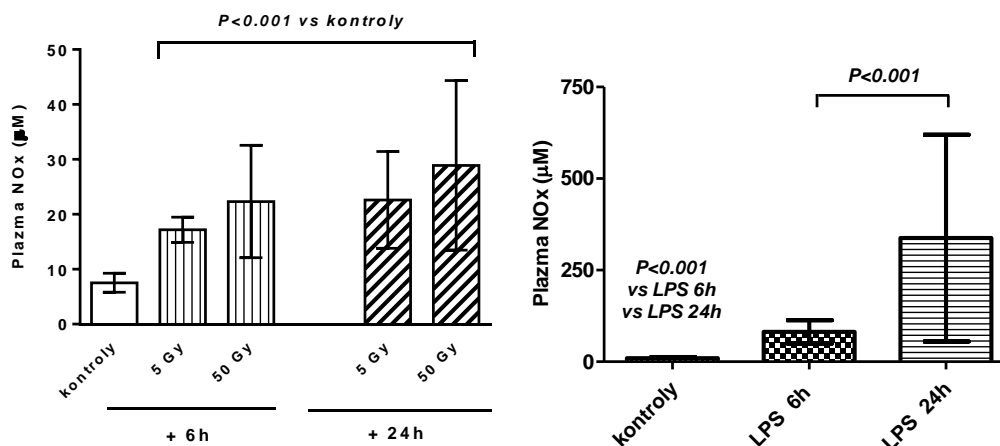




**Tabulka 13** Porovnání koncentrací NO<sub>x</sub> v plazmě v 6. a 24. hodině po celotělovém ozáření a po aplikaci LPS

	<i>kontroly</i>	<b>5 Gy</b> <b>+6 h</b>	<b>5 Gy</b> <b>+24h</b>	<b>50 Gy</b> <b>+6 h</b>	<b>50 Gy</b> <b>+24 h</b>	<b>PBS</b> <b>kontroly</b>	<b>LPS</b> <b>+6 h</b>	<b>LPS</b> <b>+24 h</b>
<b>NO<sub>x</sub></b> <b>(μM)</b>	7.5 (1.7)	17 (2.3) <sup>c</sup>	22 (10) <sup>c</sup>	23 (8.8) <sup>c</sup>	29 (15) <sup>c</sup>	9.9 (2.8)	81 (32) <sup>c</sup>	340 (280) <sup>c</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: c...P≤0,001 (ANOVA: Dunnettův test)

**Graf 4** Porovnání koncentrací NO<sub>x</sub> v plazmě po ozáření a aplikaci LPS

Koncentrace argininu v plazmě zůstaly po ozáření nezměněny. Po podání LPS dochází ke statisticky významnému snížení koncentrace argininu v 6. hodině (Tabulka 14).

**Tabulka 14** Porovnání koncentrací argininu v plazmě v 6. a 24. hodině po celotělovém ozáření a po aplikaci LPS

	<i>Kontroly</i>	<b>5 Gy</b> <b>+6 h</b>	<b>5 Gy</b> <b>+24 h</b>	<b>50 Gy</b> <b>+6 h</b>	<b>50 Gy</b> <b>+24 h</b>	<b>PBS</b> <b>kontroly</b>	<b>LPS</b> <b>+6 h</b>	<b>LPS</b> <b>+24 h</b>
<b>arginin</b> <b>(μM)</b>	196 (41)	207 (8.6)	179 (15)	190 (13)	207 (24)	184 (38)	53 (21) <sup>b</sup>	135 (52)

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: b...P≤0,01 (ANOVA: Dunnettův test)

#### 4.1.1.2.3. NO<sub>x</sub> a arginin v tekutině z bronchoalveolární laváže (BAL)

V tekutině BAL bylo pozorováno po ozáření jen mírné zvýšení NO<sub>x</sub> v porovnání se změnami nalezenými v plazmě. Maximální hodnoty byly dosaženy až ve 24. hodině po ozáření u dávky 5 Gy (Tabulka 15, Graf 5). Z hodnot nalezených po dávkách 2, 10 a 20 Gy bylo zjištěno, že efekt ozáření na hladiny NO<sub>x</sub> v BAL nebyl dávkově závislý. Po aplikaci

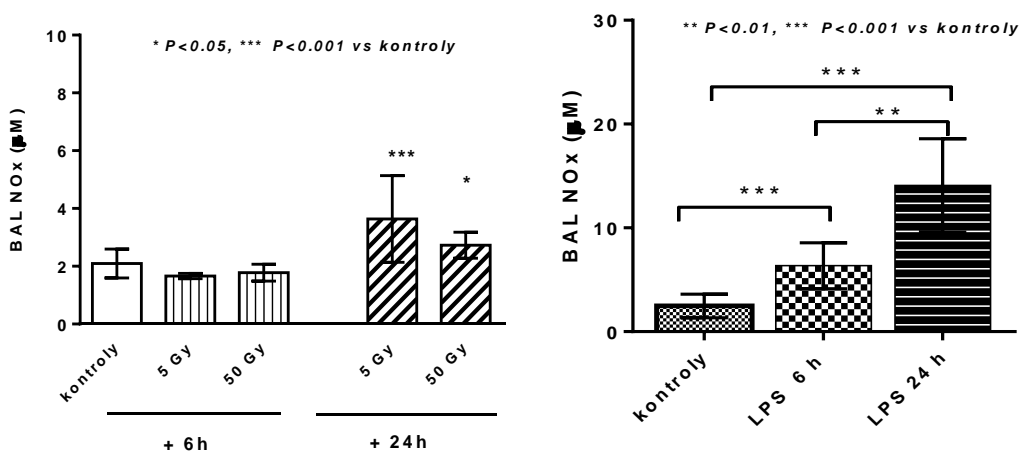
LPS došlo v 6. a 24. hodině k statisticky významnému zvýšení hodnot NO<sub>x</sub> v BAL (P<0,001) s maximem ve 24. hodině. V porovnání s výsledky eNO byla maximální koncentrace pozorována později.

**Tabulka 15** Porovnání koncentrací NO<sub>x</sub> v BAL v 6. a 24. hodině po celotělovém ozáření a po aplikaci LPS

	<i>kontroly</i>	<b>5 Gy</b> <b>+6 h</b>	<b>5 Gy</b> <b>+24 h</b>	<b>50 Gy</b> <b>+6 h</b>	<b>50 Gy</b> <b>+24 h</b>	<b>PBS</b> <b>kontroly</b>	<b>LPS</b> <b>+6 h</b>	<b>LPS</b> <b>+24 h</b>
<b>NO<sub>x</sub></b> <b>(μM)</b>	2.1 (0.50)	1.7 (0.09)	3.6 (1.5) <sup>c</sup>	1.8 (0.29)	2.7 (0.45) <sup>a</sup>	2.5 (1.1)	6.4 (2.2) <sup>c</sup>	14 (4.5) <sup>c</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: a...P≤0,05, c...P≤0,001 (ANOVA: Dunnettův test)

**Graf 5** Porovnání koncentrací NO<sub>x</sub> v BAL v 6. a 24. hodině po celotělovém ozáření a po aplikaci LPS



Koncentrace argininu v BAL zůstávají po ozáření nezměněny (Tabulka 16).

**Tabulka 16** Porovnání koncentrací argininu v BAL v 6. a 24. hodině po celotělovém ozáření a po aplikaci LPS

	<i>Kontroly</i>	<b>5 Gy</b> <b>+6 h</b>	<b>5 Gy</b> <b>+24 h</b>	<b>50 Gy</b> <b>+6 h</b>	<b>50 Gy</b> <b>+24 h</b>	<b>PBS</b> <b>kontroly</b>	<b>LPS</b> <b>+6 h</b>	<b>LPS</b> <b>+24 h</b>
<b>arginin</b> <b>(nM)</b>	225 (69)	241 (23)	225 (43)	240 (140)	329 (84)	223 (55)	229 (70)	273 (64)

Statistika: test neukázal významné rozdíly oproti kontrolní skupině (ANOVA: Dunnettův test)

#### 4.1.1.2.4. Výsledky vyšetření koncentrace NO<sub>x</sub> a exprese iNOS v tkáňových homogenátech

Koncentrace NO<sub>x</sub> v homogenátu plic a jater byla u ozářených skupin srovnatelná s kontrolní skupinou. Po aplikaci LPS došlo ke zvýšení hodnot jak v 6. tak ve 24. hodině (Tabulka 17).

**Tabulka 17** Porovnání koncentrací NO<sub>x</sub> v plicní a jaterní tkáni v 6. a 24. hodině po celotělovém ozáření a po aplikaci LPS

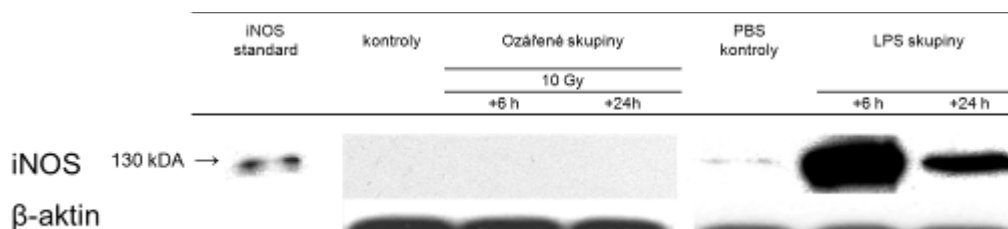
	<i>Kontroly</i>	<i>5 Gy +6 h</i>	<i>5 Gy +24h</i>	<i>50 Gy +6 h</i>	<i>50Gy +24 h</i>	<i>PBS kontroly</i>	<i>LPS +6 h</i>	<i>LPS +24 h</i>
<b>plíce NO<sub>x</sub></b> ( $\mu\text{mol.g protein}^{-1}$ )	0.38 (0.22)	0.44 (0.14)	0.55 (0.19)	0.48 (0.17)	0.45 (0.16)	0.52 (0.24)	1.6 (0.62) <sup>c</sup>	2.4 (0.83) <sup>c</sup>
<b>játra NO<sub>x</sub></b> ( $\mu\text{mol.g protein}^{-1}$ )	0.37 (0.18)	0.69 (0.27)	0.79 (0.54)	0.94 (0.51) <sup>a</sup>	0.48 (0.15)	0.53 (0.26)	1.2 (0.21) <sup>c</sup>	1.9 (0.75) <sup>c</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: a... $P \leq 0,05$ , c... $P \leq 0,001$  (ANOVA: Dunnettův test)

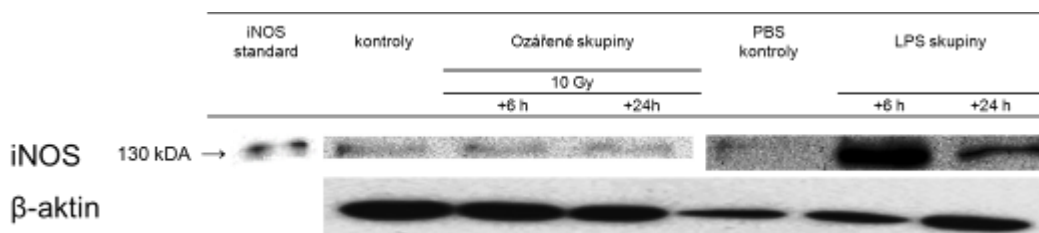
Expresí iNOS v plicní tkáni byla silně zvýšená za 6 h po aplikaci LPS, zatímco ve vzorcích plicní tkáně ozářených a kontrolních potkanů iNOS nebyla detekována (Obrázek 7). Za 24 h po aplikaci LPS bylo pozorováno snížení exprese iNOS. Indukce iNOS tak časově odpovídá změnám eNO po podání LPS.

Expresí iNOS v jaterní tkáni byla po ozáření srovnatelná s expresí iNOS v kontrolní skupině. Po aplikaci LPS byla detekována zvýšená exprese v 6. hodině. Ve 24. hodině bylo pozorováno snížení exprese ve srovnání s 6. hodinou.

**Obrázek 7** Expresí iNOS v plicní tkáni



**Obrázek 8** Expresí iNOS v jaterní tkáni



#### **4.1.2. Sledování ochranného vlivu vybraných radioprotektivních látek proti následkům celotělového ozáření potkana Wistar**

V druhé studii byl sledován vliv potenciálně radioprotektivních látek na markery oxidačního a nitračního stresu a na mortalitu po celotělovém ozáření potkanů dávkou 8 Gy.

Při experimentech s radioprotektivními látkami byly použity SPF samice potkana kmene Wistar o hmotnosti 191-260 g (Velaz s.r.o. Česká Republika). Zvířata byla rozdělena do skupin po 6 zvířatech. Zvířatům byly intraperitoneálně (i.p.) aplikovány látky methylester nitro-L-argininu (L-NAME, 100 mg/kg) a aminoguanidin (AG, 400 mg/kg) 1 hodinu před ozářením. Acetyl-L-karnitin (ALC, 250 mg/kg/den) byl podáván jednou denně po dobu 5 dní, naposledy jednu hodinu před ozářením. Do kontrolních skupin byla zařazena zvířata kontrolní skupiny s aplikací fyziologického roztoku (vehikulum, PBS) ve stejném objemu jako při aplikaci radioprotektiv.

Vliv ionizujícího záření a radioprotektivních látek na úroveň oxidačního a nitračního stresu byl sledován pomocí měření koncentrace MDA a NOx v plazmě za 6 hodin po ozáření. Ve třicetidenní studii byl hodnocen vliv radioprotektivních látek na mortalitu.

##### **4.1.2.1. Projekt pokusu**

###### **Použité chemikálie**

**L-NAME hydrochlorid** (Sigma Aldrich, Mr= 269,69 g.mol<sup>-1</sup>)

**ALC hydrochlorid** (Sigma Aldrich, Mr= 239,70 g.mol<sup>-1</sup>)

**AG hydrochlorid** (Sigma Aldrich, Mr= 110,55 g.mol<sup>-1</sup>)

**PBS**

**Pentobarbital sodný** (Sigma Aldrich, Mr= 248,25 g.mol<sup>-1</sup>)

**Aplikace látek**

**L-NAME:** i.p., 100 mg/kg, 1 hodinu před ozářením

**ALC:** i.p., 250 mg/kg, jednou denně, 5dní před ozářením, poslední dávka 1 hodinu před ozářením

**AG:** i.p., 400 mg/kg, 1 hodinu před ozářením

**PBS:** i.p., stejný objem jako předchozí aplikované látky, 1 hodinu před ozářením

**Pentobarbital sodný:** i.p., 50 mg/kg

**Rozvržení pokusu**

**Tabulka 18** Rozdělení zvířat do skupin – aplikace radioprotektiv

<i>Dávka (Gy)</i>	<i>Aplikace</i>	<i>Počet zvířat</i>	<i>Interval</i>
0	PBS	6	6
8	PBS	6	6
0	L-NAME	6	6
8	L-NAME	6	6
0	ALC	6	6
8	ALC	6	6
0	AG	6	6
8	AG	6	6

**4.1.2.2. Výsledky**

Před statistickou analýzou byly koncentrace NOx a MDA podrobeny logaritmické transformaci, protože nelogaritmované hodnoty byly sešikmeny směrem k vysokým hodnotám. Byla použita jednofaktorová ANOVA a Dunnettův post-hoc test. Výsledky jsou vyjádřeny jako geometrický průměr (95 % interval spolehlivosti pro g. průměr). Přežívání bylo hodnoceno pomocí Kaplan-Meierovy analýzy.

Celkové výsledky shrnuje tabulka v příloze (Tabulka 38).

#### 4.1.2.2.1. Výsledky vyšetření plazmatických koncentrací markerů oxidačního a nitračního stresu

Jednorázové podání inhibitorů NOS L-NAME a AG vyvolalo zvýšení plazmatických koncentrací MDA u neozářených potkanů ve srovnání s kontrolní skupinou PBS ( $P < 0,001$ ). U zvířat předléčených látkou ALC zůstala koncentrace MDA na úrovni srovnatelné s kontrolní skupinou. Celotělové ozáření dávkou 8 Gy způsobilo nárůst koncentrace MDA v plazmě u nechráněné skupiny (PBS) na 1,8-násobek hodnoty neozářených potkanů ( $P < 0,001$ ). Z aplikovaných látek měl na vliv na plazmatické koncentrace MDA ozářených potkanů pouze ALC. Hodnoty nalezené po ozáření zvířat předléčených opakovaným podáním ALC byly srovnatelné s kontrolní neozářenou skupinou PBS. Látka L-NAME neměla na koncentrace MDA v plazmě ozářených potkanů žádný vliv. Účinek jednorázového podání látky AG byl ve srovnání s účinkem ALC menší a snížení koncentrací MDA ve srovnání s ozářenou skupinou PBS nedosáhlo statistické významnosti (Tabulka 19, Graf 6).

**Tabulka 19** Koncentrace MDA v plazmě 6 h po celotělovém ozáření (8 Gy) Vliv studovaných potenciálních radioprotektiv.

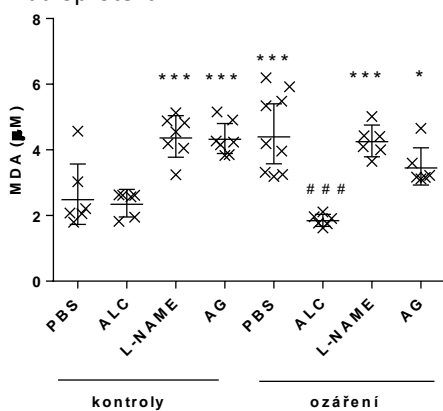
	<i>Kontroly</i>			
	<i>PBS</i>	<i>AG</i>	<i>L-NAME</i>	<i>ALC</i>
<b>MDA</b>	2,49	4,32	4,37	2,34
<b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	(1,73-3,57)	(3,89-4,80) <sup>c</sup>	(3,78-5,04) <sup>c</sup>	(1,73-3,57)

	<i>ozáření 8 Gy</i>			
	<i>PBS</i>	<i>AG</i>	<i>L-NAME</i>	<i>ALC</i>
<b>MDA</b>	4,40	3,45	4,25	1,85
<b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	(3,89-4,80) <sup>c</sup>	(2,93-4,10) <sup>a</sup>	(3,79-4,76) <sup>c</sup>	(1,67-2,04) <sup>c</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: a... $P \leq 0,05$ , c... $P \leq 0,001$  (ANOVA: Dunnettův test)

**Graf 6** Koncentrace MDA v plazmě 6 h po celotělovém ozáření (8 Gy) Vliv studovaných potenciálních radioprotektiv.



**Legenda:**

\*\*\*  $P < 0,001$ , \*  $p < 0,05$  (srovnání s PBS kontrolami)

###  $P < 0,001$  (srovnání s ozářenými potkany, kterým byl podán PBS)

Po aplikaci látek ALC a AG neozářeným potkanům nedošlo ke změnám plazmatických koncentrací NOx. Po jednorázovém podání látky L-NAME byl patrný trend snížení koncentrací NOx v plazmě u neozářených zvířat ( $P=0,085$ ). Po celotělovém ozáření dávkou 8 Gy došlo ve skupině nechráněné radioprotektivem (ozáření PBS) ke zvýšení NOx 1,9x oproti kontrolní skupině. Z aplikovaných látek působil protektivně pouze L-NAME. Koncentrace plazmatických NOx byla u předléčené skupiny L-NAME po ozáření srovnatelná s kontrolní neozářenou skupinou PBS. Látky AG a ALC neměly na koncentrace NOx po ozáření vliv. V těchto skupinách byly koncentrace srovnatelné s koncentrací u ozářených zvířat s aplikací PBS (Tabulka 20, Graf 7).

**Tabulka 20** Koncentrace NOx v plazmě 6 h po celotělovém ozáření (8 Gy) Vliv studovaných potenciálních radioprotektiv.

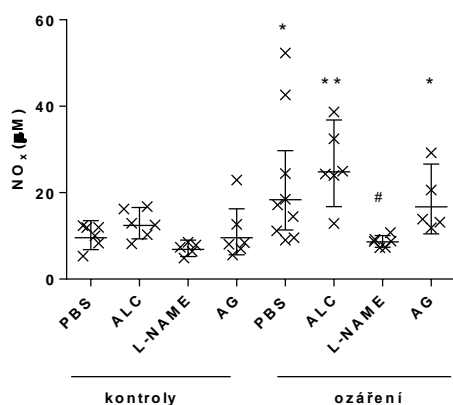
	<b>Kontroly</b>			
	<i>PBS</i>	<i>AG</i>	<i>L-NAME</i>	<i>ALC</i>
<b>NOx</b>	9,60	9,57	6,88	12,4
<b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	(6,81-13,5)	(5,62-16,3)	(5,24-9,03) <sup>b</sup>	(9,33-16,6)

	<b>ozáření 8Gy</b>			
	<i>PBS</i>	<i>AG</i>	<i>L-NAME</i>	<i>ALC</i>
<b>NOx</b>	18,4	16,7	8,61	24,9
<b>(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	(11,4-29,8) <sup>a</sup>	(10,5-26,7) <sup>a</sup>	(7,36-10,1)	(16,8-36,8) <sup>b</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: a... $P\leq 0,05$ , b... $P\leq 0,01$  (ANOVA: Dunnettův test)

**Graf 7** Koncentrace NOx v plazmě 6 h po celotělovém ozáření (8 Gy) Vliv studovaných potenciálních radioprotektiv.



**Legenda:**

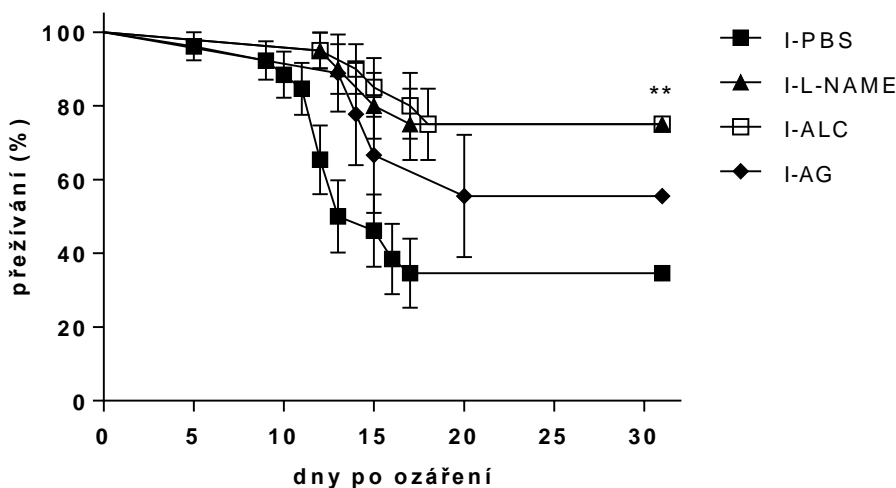
\*  $P<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  (srovnání s PBS kontrolami)

#  $P<0,05$  (srovnání s ozářenými potkany, kterým byl podán PBS)

#### 4.1.2.2.2. Přežívání zvířat chráněných radioprotektivními látkami po celotělovém ozáření dávkou 8 Gy

Ve třicetidenní studii přežívání potkanů po dávce 8 Gy přežilo nejméně jedinců v nechráněné skupině PBS (34,6 %). Ve skupině předléčené AG přežilo 55,6 % a ve skupinách s aplikací L-NAME a ALC shodně 75 % potkanů (Graf 8). Přežívání hodnocené pomocí Kaplan-Meierovy metody s následným log-rank testem ukázalo, že látky L-NAME a ALC statisticky významně zlepšily přežívání oproti kontrolní skupině PBS ( $P < 0,005$ ). Ve skupinách I-L-NAME a I-ALC bylo přežívání srovnatelné, jak dokládá překryv křivek na grafu 8. Přes patrný trend k poklesu mortality nedosáhl rozdíl mezi skupinami I-AG a I-PBS statistické významnosti ( $P = 0,17$ ).

**Graf 8** Přežívání potkanů Wistar po dobu 30 dní po celotělovém ozáření dávkou 8 Gy



**Legenda:**

\*\* $P < 0,01$

Ochranný vliv jednorázového podání methyl esteru nitro-L-argininu (L-NAME, 100 mg/kg, i.p.), aminoguanidinu (400 mg/kg, i.p.) 1 hodinu před ozářením a opakovaného podávání acetyl-L-karnitinu (ALC, 250 mg/kg/den, i.p.) po dobu 5 dní s poslední dávkou 1 hodinu před ozářením.



## **4.2. Lokální ozáření**

### **4.2.1. Sledování změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu ve fázi rozvoje radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku u potkana kmene Wistar**

Třetí pokus byl zaměřen na sledování rozvoje radiační pneumonitidy. Dále byly studovány změny v koncentracích markerů oxidačního a nitračního stresu od časného období po ozáření (do 72 h) až do fáze radiační pneumonitidy (7. týden). V plicní tkáni byla hodnocena exprese genů pro iNOS, eNOS, argináz I a II a transportérů pro kationické aminokyseliny CAT1, 2 a 3. Radiační pneumonitida byla prokázána histochemicky.

Pro model radiační pneumonitidy byly použity SPF samice potkana kmene Wistar o hmotnosti 170-270 g (Velaz s.r.o. Česká Republika). Zvířata byla rozdělena do skupin po 6 a 10 zvířatech. Pro analgosedaci zvířat před aplikací lokálního ozáření byla použita kombinace látek narkamon (5%, 40 mg/kg) a rometar (2%, 4,8 mg/kg). Na konci experimentu byla zvířata uspána pentobarbitalem sodným (dávka 50 mg/kg i.p.) a následně usmrcena vykrvácením z břišní aorty.

Ve vzorcích plazmy a tekutiny z BAL byly vyšetřeny koncentrace MDA, celkové bílkoviny (TP) a NOx. V homogenátu plic byla hodnocena exprese genů iNOS, eNOS, argináz I a II, CAT1, 2 a 3. Pro potvrzení radiační pneumonitidy byly ve vzorcích plic stanoveny imunohistochemicky fagocytující buňky a byla hodnocena vzdušnost plicní tkáně. Ukončení experimentu probíhalo za 6, 24, a 72 hodin a v 7. týdnu po ozáření.

#### **4.2.1.1. Projekt pokusu**

##### **Použité chemikálie**

**Narkamom** (5%, Bioveta)

**Rometar** (2%, Bioveta)

**Pentobarbital sodný** (Sigma Aldrich)

### Aplikace látek

**Narkamon:** i.p., 40 mg/kg

**Rometar:** i.p., 4,8 mg/kg

**Pentobarbital sodný:** i.p., 50 mg/kg

### Rozvržení pokusu

**Tabulka 21** Rozdělení zvířat do skupin – časové intervaly po dávce 20 Gy

dávka (Gy)	počet zvířat	interval (h)		interval (t)	
0	6	--	--	72	7
20	6-10	6	24	72	7

#### 4.2.1.2. Výsledky

Získaná data byla porovnáována pomocí Mann-Whitney testu. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr (směrodatná odchylka).

Celkové výsledky shrnuje tabulka v příloze (Tabulka 39).

##### 4.2.1.2.1. Vydechovaný oxid dusnatý (eNO)

Měření vydechovaného oxidu dusnatého během 7 týdenního intervalu neukázalo žádné výrazné změny po lokálním ozařování. Zvířata ozářená dávkou 20 Gy lokálně na hrudník měla hodnoty eNO srovnatelné s kontrolní skupinou (Tabulka 22, Graf 9) přes histochemicky prokázanou přítomnost radiační pneumonitidy (Příloha: Obrázek 9, 10). eNO se proto nejeví jako vhodný marker rozvoje radiační pneumonitidy u potkana.

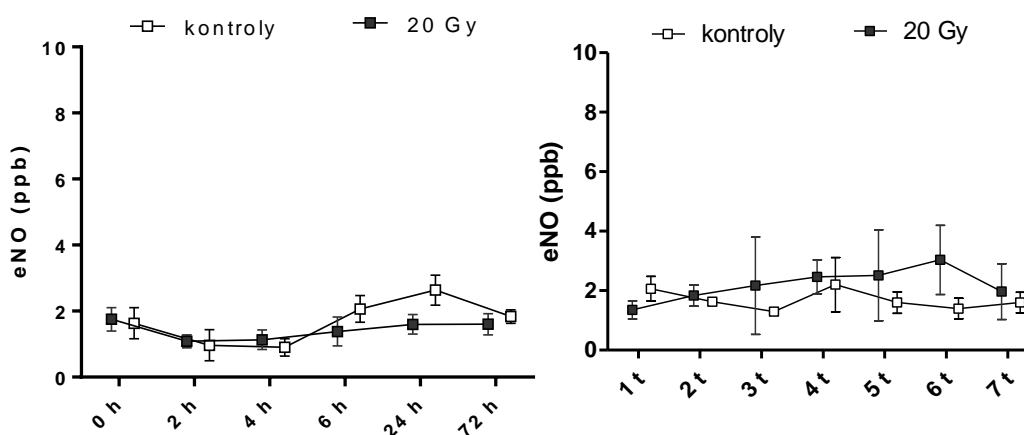
**Tabulka 22** Časový profil eNO po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

		0 h	2 h	4 h	6 h	24 h	72 h
<b>eNO (ppb)</b>	Kontroly	1,63 (0,55)	0,97 (0,55)	0,90 (0,31)	2,07 (0,47)	2,63 (0,52)	1,83 (0,24)
	20Gy	1,75 (0,29)	1,08 (0,16)	1,13 (0,24)	1,38 (0,36)	1,60 (0,24)	1,60 (0,26)

		1 t	2 t	3 t	4 t	5 t	6 t	7 t
<b>eNO (ppb)</b>	Kontroly	2,07 (0,48)	1,63 (0,13)	1,30 (0,12)	2,20 (1,06)	1,60 (0,42)	1,40 (0,40)	1,60 (0,40)
	20Gy	1,35 (0,25)	1,83 (0,29)	2,17 (1,34)	2,47 (0,46)	2,52 (1,25)	3,03 (0,95)	1,97 (0,77)

Statistika: test neukázal významné rozdíly oproti kontrolní skupině (Mann-Whitney test)

**Graf 9** Vydechovaný oxid dusnatý po lokálním ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

#### 4.2.1.2.2. Výsledky analýz v plazmě

Koncentrace MDA, NO<sub>x</sub> a TP v plazmě se v průběhu 7 týdnů po lokálním ozáření hrudníku dávkou 20 Gy nezměnily (Tabulka 23).

**Tabulka 23** Koncentrace MDA, NO<sub>x</sub> a TP v plazmě po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

	<i>neozářené kontroly</i>		<i>ozáření 20 Gy</i>			
	<i>+0 h</i>	<i>+7 t</i>	<i>+6 h</i>	<i>+24 h</i>	<i>+72 h</i>	<i>+7 t</i>
<b>MDA (μM)</b>	3,36 (0,41)	3,51 (0,42)	3,18 (0,66)	3,53 (0,48)	3,59 (0,33)	3,70 (0,41)
<b>NO<sub>x</sub> (μM)</b>	6,94 (1,42)	9,49 (1,58)	13,52 (2,37)	8,34 (5,16)	7,35 (3,28)	9,34(3,89)
<b>TP (g/l)</b>	63,5 (4,08)	63,8 (3,10)	67,4 (3,84)	61,2 (2,23)	55,5 (5,86)	53,4 (13,8)

Statistika: test neukázal významné rozdíly oproti kontrolní skupině (Mann-Whitney test)

#### 4.2.1.2.3. Výsledky analýz v BAL

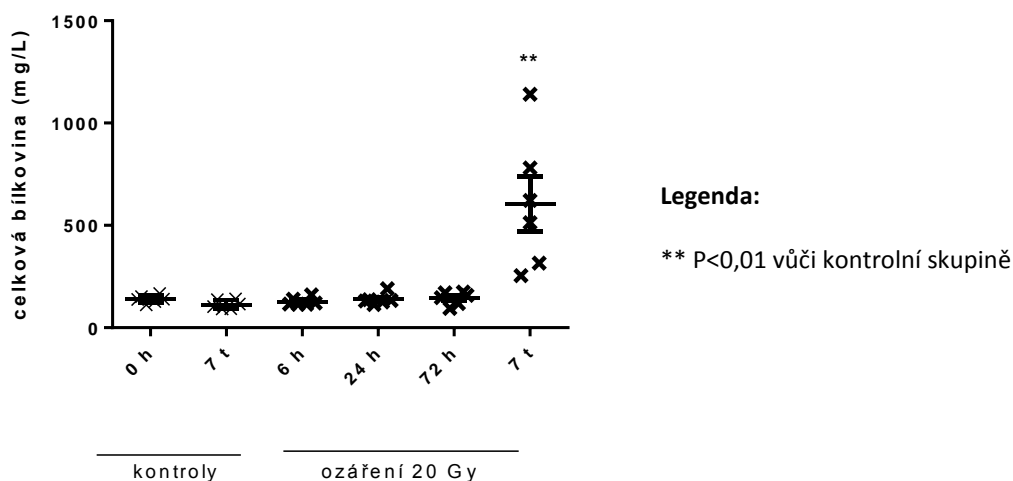
Výsledky stanovení koncentrace TP v tekutině z bronchoalveolární laváže ukázaly její významné zvýšení v 7 týdnu po ozáření (Tabulka 24, Graf 10). Jedná se o důsledek zvýšené propustnosti alveolokapilární membrány. Nárůst koncentrace MDA svědčil pro zvýšení oxidačního stresu v plicích v intervalu 7 týdnů (Tabulka 25, Graf 11).

**Tabulka 24** Koncentrace celkové bílkoviny v tekutině z bronchoalveolární laváže po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

	<i>neozářené kontroly</i>		<i>ozáření 20 Gy</i>			
	<i>+0 h</i>	<i>+7 t</i>	<i>+6 h</i>	<i>+24 h</i>	<i>+72 h</i>	<i>+7 t</i>
<b>TP (mg/L)</b>	140 (18,9)	114 (21,4)	128 (18,7)	138 (26,7)	144 (31,4)	600 (326) <sup>b</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: b...P≤0,01 (Mann-Whitney test)

**Graf 10** Koncentrace celkové bílkoviny v tekutině z bronchoalveolární laváže po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

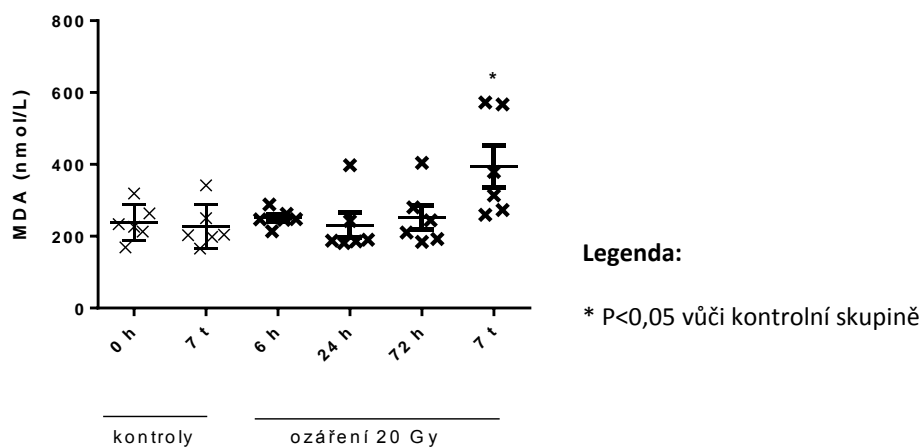


**Tabulka 25** Koncentrace malondialdehydu v tekutině z bronchoalveolární laváže po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

	<i>neozářené kontroly</i>		<i>ozáření 20 Gy</i>			
	<i>+0 h</i>	<i>+7 t</i>	<i>+6 h</i>	<i>+24 h</i>	<i>+72 h</i>	<i>+7 t</i>
<b>BAL MDA (nM)</b>	237 (50,3)	227 (62,4)	251 (24,4)	231 (84,8)	252 (82,4)	394 (142) <sup>a</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: a...P≤0,05 (Mann-Whitney test)

**Graf 11** Koncentrace malondialdehydu v tekutině z bronchoalveolární laváže po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy



#### 4.2.1.2.4. Výsledky sledování genové exprese v plicní tkáni

Expresie genů transportérů pro kationické aminokyseliny CAT v plicní tkáni na úrovni mRNA zjištěné metodou RT-PCR ukázaly statisticky významné zvýšení CAT1

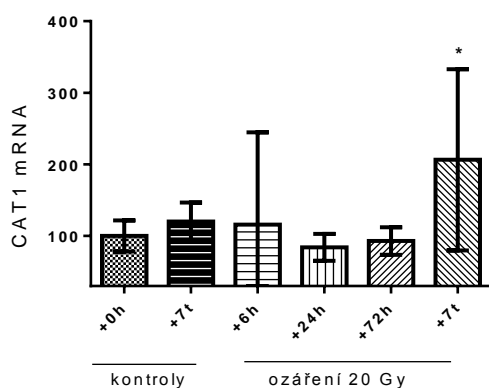
(Tabulka 26, Graf 12), CAT2 (Tabulka 27, Graf 13) a CAT3 (Tabulka 28, Graf 14) v 7. týdnu po ozáření.

**Tabulka 26** Expresce CAT1 v plicní tkáni po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

	<i>neozářené kontroly</i>		<i>ozáření 20 Gy</i>			
	<i>+0 h</i>	<i>+7 t</i>	<i>+6 h</i>	<i>+24 h</i>	<i>+72 h</i>	<i>+7 t</i>
<b>CAT1</b>	100 (21,7)	120 (26,3)	116 (129)	84,1 (18,8)	92,9 (19,3)	206 (127) <sup>a</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: a... $P \leq 0,05$  (Mann-Whitney test)

**Graf 12** Expresce CAT1 v plicní tkáni po dávce 20 Gy



**Legenda:**

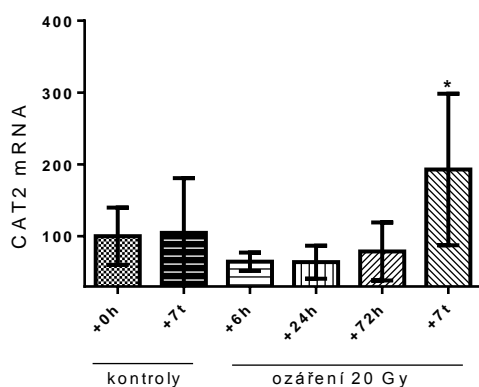
\*  $P < 0,05$  vůči kontrolní skupině

**Tabulka 27** Expresce CAT2 v plicní tkáni po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

	<i>Kontroly</i>		<i>ozáření 20 Gy</i>			
	<i>+0 h</i>	<i>+7 t</i>	<i>+6 h</i>	<i>+24 h</i>	<i>+72 h</i>	<i>+7 t</i>
<b>CAT2</b>	100 (40,0)	105 (76,2)	64,6 (12,9)	64,0 (22,9)	78,9 (40,4)	193 (105) <sup>a</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: a... $P \leq 0,05$  (Mann-Whitney test)

**Graf 13** Expresce CAT2 v plicní tkáni po dávce 20 Gy



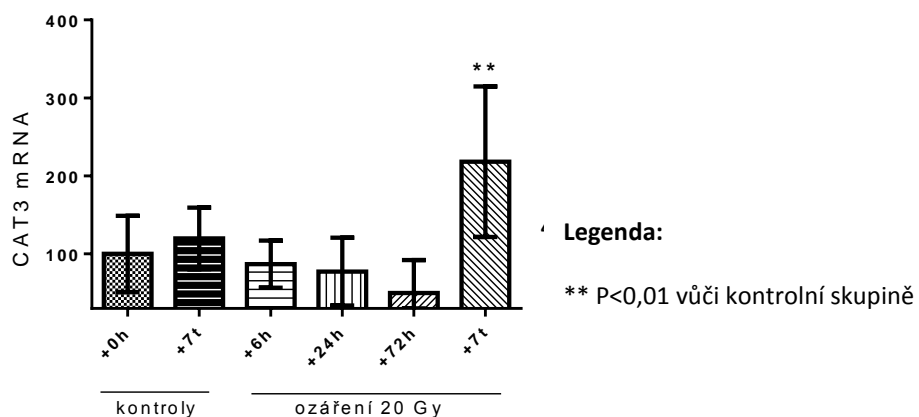
**Legenda:**

\*  $P < 0,05$  vůči kontrolní skupině

**Tabulka 28** Expres CAT3 v plicní tkáni po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

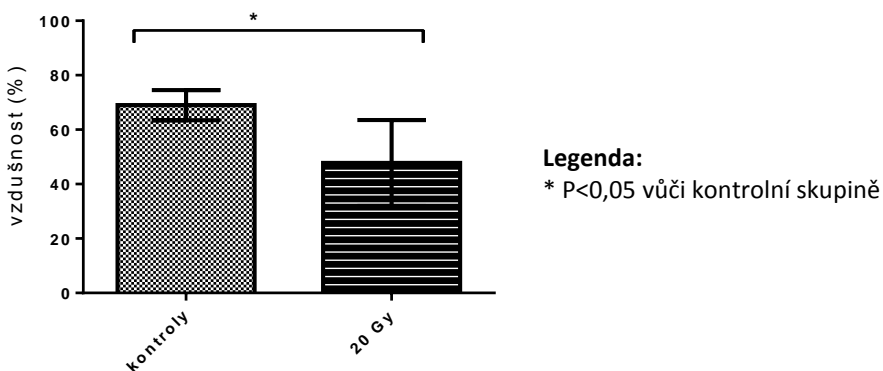
	Kontroly		ozáření 20 Gy			
	+0 h	+7 t	+6 h	+24 h	+72 h	+7 t
<b>CAT3</b>	100 (48,8)	120 (39,4)	86,9 (30,3)	77,4 (43,5)	49,9 (42,2)	218 (96,5) <sup>b</sup>

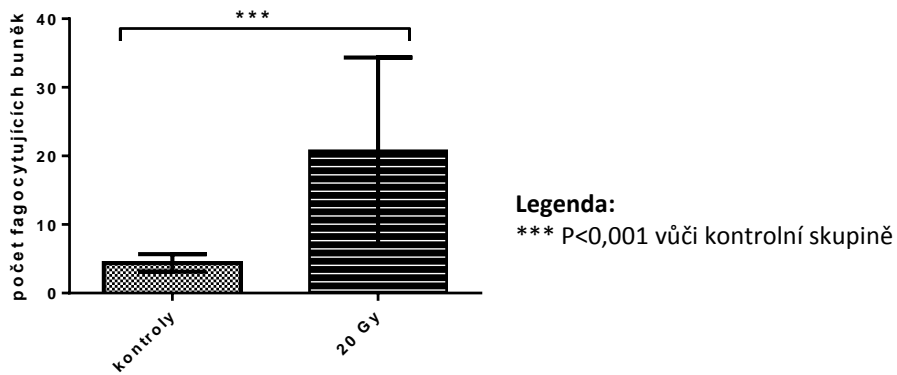
Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině: b... $P \leq 0,01$  (Mann-Whitney test)

**Graf 14** Expres CAT3 v plicní tkáni po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

#### 4.2.1.2.7. Histologické vyšetření plicní tkáně

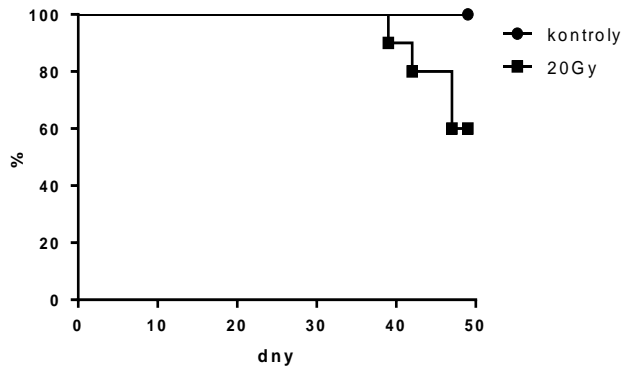
Histologickým vyšetřením plicní tkáně bylo zjištěno, že za 7 týdnů po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy se signifikantně snižuje procentuální vzdušnost plic ( $P \leq 0,05$ ,  $48 \pm 16$ ) ve srovnání s kontrolní skupinou ( $69 \pm 6$ ) (Graf 15). Zároveň se zvýšil počet neutrofilů v plicní tkáni ( $P \leq 0,001$ ,  $21 \pm 14$ ) ve srovnání s kontrolní skupinou ( $4 \pm 1$ ) (Graf 16). To ukazuje na přítomnost radiační pneumonitidy.

**Graf 15** Vzdušnost plicní tkáně v 7. týdnu po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

**Graf 16** Infiltrace zánětlivých buněk v 7. týdnu po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

#### 4.2.1.2.8. Přežívání

Přežívání potkanů v intervalu 7 týdnů po lokálním ozáření hrudníku dávkou 20 Gy bylo hodnoceno pomocí Kaplan-Meierovy metody s následným log-rank testem. Přežívání bylo o 40 % nižší než v kontrolní skupině ( $P=0,09$ ) (Graf 17).

**Graf 17** Přežívání potkanů po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

#### 4.2.2. Sledování radioprotektivního účinku studovaných látek ve fázi radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku potkana kmene Wistar

Čtvrtý pokus byl zaměřen na sledování vlivu potenciálně radioprotektivních látek ALC, L-NAME a AG na rozvoj radiační pneumonitidy. Dále byly sledovány ukazatele oxidačního a nitračního stresu a jejich ovlivnění studovanými látkami a to v 7. týdnu po ozáření hrudníku jakou dávkou.

Pro model radiační pneumonitidy byly použity SPF samice potkana kmene Wistar o hmotnosti 165-272 g (Velaz s.r.o. Česká Republika). Zvířata byla rozdělena do skupin po 10 zvířatech. Zvířatům byly intraperitoneálně (i. p.) aplikovány látky acetyl-L-karnitin (ALC, 250 mg/kg/den, jednou denně po dobu 5 dní), methylester nitro-L-argininu (L-NAME, 100 mg/kg) a aminoguanidin (AG, 400 mg/kg). Jako kontrolní skupina byla zvolena skupina s aplikací fyziologického roztoku (PBS) ve stejném objemu jako aplikovaná radioprotektiva. Pro analgosedaci zvířat před aplikací lokálního ozáření byla použita kombinace látek narkamon (5%, 40 mg/kg) a rometar (2%, 4,8 mg/kg). Na konci experimentu byla provedena anestézie pentobarbitalem sodným (dávka 50 mg/kg i. p.) a zvířata byla následně usmrcena vykrvácením z břišní aorty.

Vliv ionizujícího záření byl sledován pomocí parametrů oxidačního a nitračního stresu. Ve vzorcích plazmy a tekutiny z BAL jsme stanovovali MDA, TP a NOx. V homogenátu plic byla sledována exprese iNOS, eNOS, argináz I a II, CAT1, 2 a 3. Radiační pneumonitida byla prokázána imunohistochemicky pomocí měření vzdušnosti plicní tkáně a detekcí neutrofilů v plicní tkáni. Ukončení experimentu probíhalo v 7. týdnu po ozáření.

##### 4.2.2.1. Projekt pokusu

**Tabulka 29** Rozdělení zvířat do skupin – aplikace radioprotektiv

<i>Dávka (Gy)</i>	<i>Aplikace</i>	<i>počet zvířat</i>	<i>Počet zvířat na konci</i>	<i>Interval</i>
15	PBS ( <i>kontroly</i> )	10	3	7
15	L-NAME	10	5	7
15	ALC	10	7	7
15	AG	10	6	7



#### 4.2.2.2. Výsledky

Výsledky byly srovnávány pomocí Mann-Whitney testu. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr (střední chyba průměru).

Celkové výsledky shrnuje tabulka v příloze (Tabulka 40). Radiační pneumonitida byla prokázána histologicky (Příloha: Obrázek 12).

##### 4.2.2.2.1. Vydechovaný oxid dusnatý

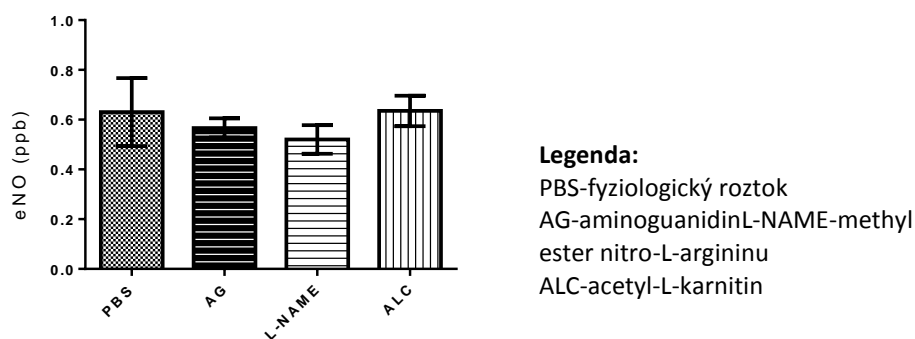
Výsledky měření vydechovaného oxidu dusnatého v 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku byly ve skupinách s aplikací studovaných látek zcela srovnatelné s výsledky v kontrolní skupině potkanů, kterým byl podán PBS (Tabulka 30, Graf 18).

**Tabulka 30** Vliv radioprotektiv na koncentraci vydechovaného oxidu dusnatého v 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy

	<i>PBS (kontroly)</i>	<i>AG</i>	<i>L-NAME</i>	<i>ALC</i>
<b>eNO (ppb)</b>	0,64 (0,13)	0,57 (0,04)	0,52 (0,06)	0,64 (0,06)

Statistika: test neukázal významné rozdíly oproti kontrolní skupině PBS (Mann-Whitney test)

**Graf 18** Vydechovaný oxid dusnatý v 7 týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy



##### 4.2.2.2.2. Výsledky analýz v plazmě

Koncentrace MDA, NO<sub>x</sub> a TP byly ve všech skupinách srovnatelné (Tabulka 31).

**Tabulka 31** Vliv radioprotektiv na koncentrace MDA, NO<sub>x</sub> a TP v plazmě v 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy

	<i>ozáření 15Gy</i>			
	<i>PBS (kontroly)</i>	<i>AG</i>	<i>L-NAME</i>	<i>ALC</i>
<b>MDA (μmol.L<sup>-1</sup>)</b>	1,84 (0,11)	1,83 (0,10)	1,89 (0,27)	2,03 (0,12)
<b>NO<sub>x</sub> (μmol.L<sup>-1</sup>)</b>	21,2 (16,8)	18,4 (7,50)	38,1 (8,07)	17,7 (6,07)
<b>TP (g/l)</b>	64,0 (0,56)	60,4 (3,33)	59,3 (3,19)	59,2 (1,80)

Statistika: test neukázal významné rozdíly oproti kontrolní skupině PBS (Mann-Whitney test)

## 4.2.2.2.3. Výsledky analýz v tkáňovém homogenátu

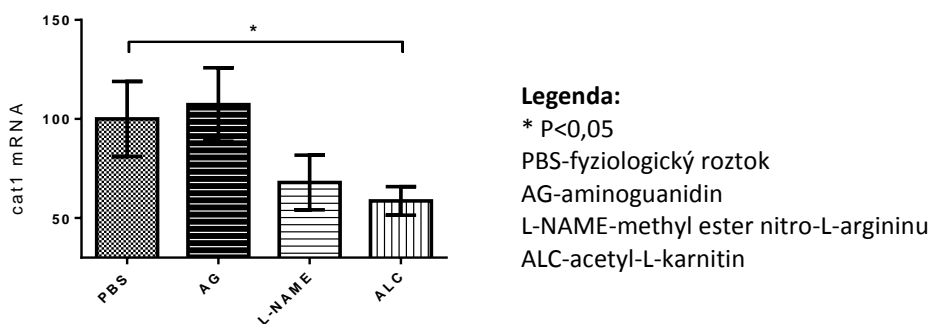
Stanovení genové exprese transportérů pro kationické aminokyseliny CAT na úrovni mRNA pomocí metody RT-PCR ukazují signifikantně sníženou expresi genu pro CAT1 (Tabulka 33, Graf 19) a CAT3 (Tabulka 34, Graf 20) ve skupině ozářených potkanů, kterým byl podán ALC.

**Tabulka 32** Vliv radioprotektiv na expresi CAT1 v plicní tkáni v 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy

	<i>PBS (kontroly)</i>	<i>AG</i>	<i>L-NAME</i>	<i>ALC</i>
<b>CAT1</b>	100 (19)	107 (19)	68 (14)	59 (7) <sup>a</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině PBS: a... $P \leq 0,05$  (Mann-Whitney test)

**Graf 19** Vliv radioprotektiv na expresi CAT1 v plicní tkáni v 7 týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy

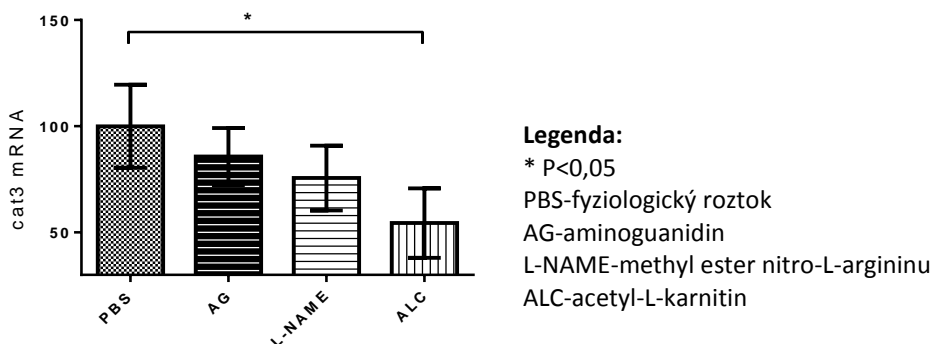


**Tabulka 33** Vliv radioprotektiv na expresi CAT3 v plicní tkáni v 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy

	<i>PBS (kontroly)</i>	<i>AG</i>	<i>L-NAME</i>	<i>ALC</i>
<b>CAT3</b>	100 (20)	86 (13)	76 (15)	53 (16) <sup>a</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině PBS: a... $P \leq 0,05$  (Mann-Whitney test)

**Graf 20** Vliv radioprotektiv na expresi CAT3 v plicní tkáni v 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy



#### 4.2.2.2.4. Histologické vyšetření plicní tkáně

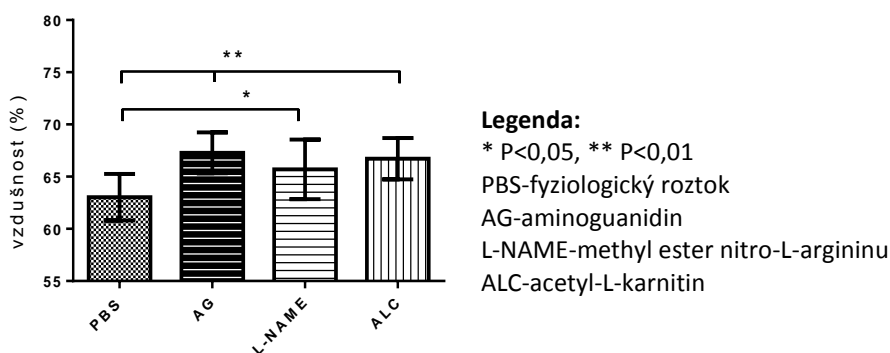
Z výsledků histologického vyšetření vyplývá, že všechny zkoumané látky zvýšily vzdušnost plicní tkáně (Tabulka 35, Graf 21). Aplikace látek ALC a AG vedla ke snížení počtu neutrofilů v plicní tkáni, zatímco látka L-NAME tento účinek neměla (Tabulka 36, Graf 22).

**Tabulka 34** Vliv radioprotektiv na vzdušnost plicní tkáně v 7. týdnu po ozáření hrudníku dávkou 15 Gy

	<b>PBS (kontroly)</b>	<b>AG</b>	<b>L-NAME</b>	<b>ALC</b>
<b>%</b>	63 (2)	67 (2) <sup>b</sup>	66 (3) <sup>a</sup>	67 (2) <sup>b</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině PBS: a... $P \leq 0,05$ , b... $P \leq 0,01$  (Mann-Whitney test)

**Graf 21** Vzdušnost plicní tkáně v 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy

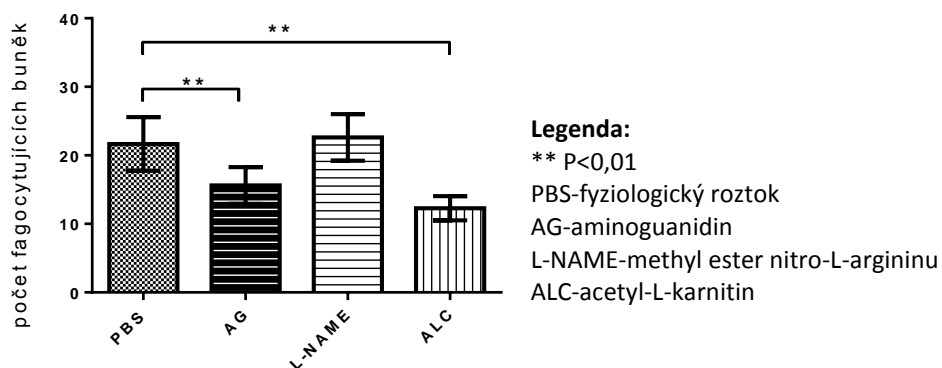


**Tabulka 35** Vliv radioprotektiv na infiltraci zánětlivých buněk do plicní tkáně v 7 týdnu po ozáření dávkou 15 Gy

	<b>PBS (kontroly)</b>	<b>AG</b>	<b>L-NAME</b>	<b>ALC</b>
<b>počet neutrofilů</b>	21 (4)	16 (3) <sup>b</sup>	23 (3)	12 (2) <sup>b</sup>

Statistika: signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině PBS: b... $P \leq 0,01$  (Mann-Whitney test)

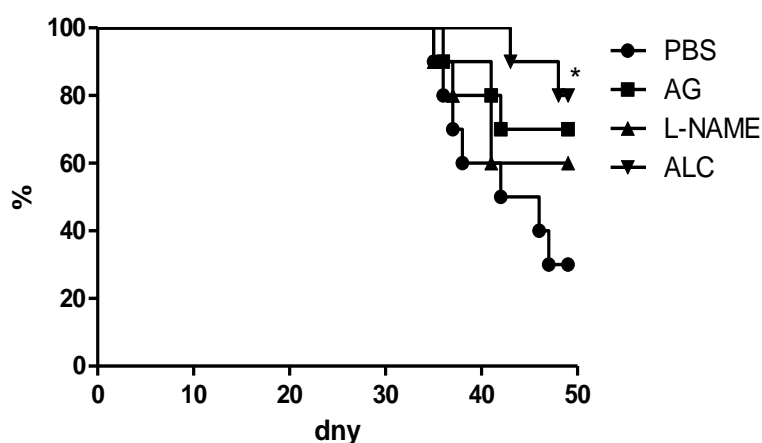
**Graf 22** Infiltrace zánětlivých buněk plicní tkáně v 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy



#### 4.2.2.2.5. Vliv radioprotektiv na přežívání potkanů po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy

Ve třicetidenní studii přežilo po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy nejméně jedinců v nechráněné skupině PBS (30 %). Ve skupinách předléčených radioprotektivy to bylo 60 % (L-NAME), 70 % (AG) a 80 % (ALC). Hodnocení pomocí Kaplan Meierovy metody s následným log-rank testem ukázalo, že u skupiny s aplikací ALC dochází ke staticky významnému zvýšení přežívání ve srovnání s PBS skupinou ( $P < 0,05$ ). Přes patrné zlepšení nedosáhly rozdíly v přežívání mezi skupinami AG a L-NAME a kontrolní skupinou PBS statistické významnosti (Graf 23).

**Graf 23** Přežívání po dávce 15Gy



**Legenda:**

\*  $p < 0,05$  vůči kontrole PBS

Ochranný vliv jednorázového podání methyl esteru nitro-L-argininu (L-NAME, 100 mg/kg, i.p.), aminoguanidinu (400mg/kg, i.p.) 1 hodinu před ozářením a opakovaného podávání acetyl-L-karnitinu (ALC, 250mg/kg/den, i.p. ) po dobu 5 dní s poslední dávkou 1 hodinu před ozářením.

## 5. KAPITOLA: DISKUZE

### 5.1. Celotělové ozáření

#### 5.1.1. Porovnání změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu vyvolaných ionizujícím zářením s účinky bakteriálního LPS u potkana kmene Wistar

První studie se zaměřila na hodnocení vydechovaného oxidu dusnatého (eNO) jako možného časného biodozimetrického ukazatele u potkana kmene Wistar. Uspořádání studie umožnilo porovnat účinky celotělového ozáření v rozsahu nízkých až letálních dávek s účinky bakteriálního lipopolysacharidu, který mohutně zvyšuje expresi iNOS, koncentrace NO a dalších RNS. Četné literární prameny opakovaně doložily, že po aplikaci LPS potkanům dochází ke zvýšení hladiny vydechovaného NO a koncentrací NO<sub>x</sub> v bronchoalveolární tekutině, plazmě i tkáních (McCluskie, 2004; Ohta, 2007; Pedoto, 2003). Lipopolysacharidový model v naší studii plnil funkci pozitivní kontroly a doložil vhodnost metod použitých k detekci indukce iNOS a zvýšené tvorby NO včetně metabolitů.

Výsledky ukazují, že v průběhu prvních 24 hodin po ozáření, se vydechovaný oxid dusnatý nemění. Také koncentrace dusičnanů a dusitanů (NO<sub>x</sub>) v tekutině z bronchoalveolární laváže a homogenátu plicní tkáně nevykazují žádné změny oproti kontrolní skupině. A tak podporují názor, že indukce NO v dýchacích cestách a plicích v časně fázi po ozáření nedosahuje takových hodnot jako po aplikaci bakteriálního lipopolysacharidu (LPS). S tím souvisí i fakt, že v homogenátu plicní tkáně nebyla detekována indukovatelná forma NOS. V pracích publikovaných jinými autory byl vliv ionizujícího záření zkoumán v delším časovém intervalu po ozáření než v časně fázi, tj. nejdříve za 72 hodin po ozáření. Eroglu a spolupracovníci (Eroglu, 2008) v tomto časovém intervalu pozoroval, že v plicním homogenátu potkana nastává téměř dvojnásobné zvýšení NO<sub>x</sub> po celotělovém ozáření dávkou 8 Gy. Absence zvýšené exprese iNOS a NO v dýchacích cestách a plicích během prvních 24 hodin po ozáření je

v rozporu s akutní odpovědí nalezené v tkáni tenkého střeva po celotělovém ozáření dávkou 10 Gy (MacNaughton, 1998), kde iNOS byla detekována již za 2 hodiny po ozáření. Časový profil a intenzita indukce iNOS a tvorby NO se podle těchto poznatků v různých částech organismu značně liší. V naší studii, ozařování dávkami 2-10 Gy vedlo k dávkově závislému zvýšení plazmatických koncentrací NO<sub>x</sub> v 6. hodině po ozáření. Maximální hodnoty byly 2,5-krát vyšší než koncentrace v kontrolní skupině. Dávky vyšší než 10 Gy již nezpůsobily další zvýšení hodnot. Dávkové závislý vzestup NO<sub>x</sub> v plazmě popsali ve studii na myších i Ohta a kolektiv (Ohta, 2007). Tito autoři pozorovali zvýšené koncentrace NO<sub>x</sub> po dávkách v rozmezí od 19,6 do 28,7 Gy, zatímco vyšší dávky (maximum 31,5 Gy) další zvýšení nezpůsobily.

Limitujícím faktorem, který moduluje produkci NO, je intracelulární koncentrace argininu. Homeostáza argininu je ovlivněna rychlostí jeho syntézy z citrulinu v ornitinovém cyklu, proteinovým katabolismem, spotřebou argininu syntázami NO, arginázami a dalšími enzymy (Ricciardolo, 2004). Koncentrace argininu po ozáření zůstávají beze změny, zatímco po aplikaci LPS dochází k výraznému snížení plazmatické koncentrace argininu. Bylo prokázáno, že hlubokému poklesu plazmatických koncentrací argininu po aplikaci LPS předchází indukce iNOS a že hlavní faktor zodpovědný za rychlý pokles je snížená syntéza argininu v ledvinách (Lortie, 2004; Munger, 2006; Kao, 2009). Odráží-li koncentrace L-argininu v tekutině BAL jeho intracelulární koncentraci v buňkách dýchacích cest, pak z našich výsledků vyplývá, že po aplikaci LPS není ovlivněna jeho biologická dostupnost v plicích. Naše práce jako první přináší výsledky z měření L-argininu v tekutině BAL.

Časový profil a intenzita nárůstu koncentrací NO v dýchacích cestách a plicích jsou výrazně ovlivněny mechanismem poškození. Na rozdíl od ionizujícího záření je akutní poškození plic jinými mechanismy spojeno se značným nárůstem eNO. Zvýšené hladiny eNO byly pozorovány u potkana s akutním poškozením plic po částečném kardiopulmonálním bypassu a následném použití mimotělního oběhu. Bylo zjištěno až 5 násobné zvýšení již ve 4. hodině (Zegdi, 2003). V potkaním modelu ischemie/reperfuze

způsobené okluzí břišní aorty po dobu 3 h, bylo eNO zvýšeno za jednu hodinu po reperfúzi 50-krát (Tassiopoulos, 1997). Vydechovaný NO je ověřený marker alergického zánětu dýchacích cest, používaný nejen u akutních i chronických modelů astmatu (Ahmad, 2009), ale také v praxi při péči o nemocné s astmatem.

### **5.1.2. Sledování ochranného vlivu vybraných radioprotektivních látek proti následkům celotělového ozáření potkana Wistar**

V této části práce byl studován ochranný účinek látek s antioxidačními vlastnostmi a inhibitorů NOS acetyl-L-karnitinu (ALC), methylesteru nitro-L-argininu (L-NAME) a aminoguanidinu (AG) vůči následkům celotělového ozáření dávkou 8 Gy. Bylo hodnoceno přežívání zvířat ve 30 denní studii. Vliv studovaných látek na úroveň oxidačního a nitračního stresu byl sledován pomocí stanovení koncentrace malondialdehydu (MDA) a dusičnanů/dusitanů (NOx) v plazmě.

L-NAME bylo aplikováno v jednorázové dávce 100 mg/kg, ALC v dávce 250 mg/kg po dobu 5 dní s poslední dávkou 1 hodinu před ozářením a AG v jednorázově v dávce 400 mg/kg. Aplikace L-NAME a ALC vedla k podstatnému snížení mortality. Po podání AG se mortalita snížila méně a výsledek byl pouze hraničně signifikantní. L-NAME je nespecifický inhibitor NO syntáz (NOS), který je strukturně podobný přirozenému substrátu NOS argininu. Účinky L-NAME byly zkoumány především ve studiích zabývajících se odpovědí organismu na bakteriální zánět (Eum, 2007; Nagata, 2003). V organismu je L-NAME rychle přeměněn na N (omega)-nitro-L-arginin (L-NA). L-NA především inhibuje nNOS a eNOS, méně iNOS (Alderton, 2001). Intraperitoneální aplikace 100 mg L-NA myším v časech 15 až 60 min před celotělovým ozářením letální dávkou 10 Gy zvyšuje přežívání z 0 % v kontrolní ozářené skupině na 25 % až 70 % s nejvýraznějším účinkem při podání L-NA 45 min před ozářením (Liebmann, 1994). Zatímco L-NAME a L-NA jsou nespecifickými kompetitivními inhibitory, AG je částečně selektivní k iNOS (Alderton, 2001). Aplikace AG v dávce 100 mg/kg 10 a 60 min před ozářením dávkou 23 Gy prodlužuje průměrnou dobu přežívání myši ze 7,6 dní (kontrolní

skupina) na 12, 4 dní (AG skupina) (Ohta, 2007). AG v dávce 50-800 mg/kg aplikován žaludeční sondou 2 hodiny před lokálním ozářením břicha dávkou 12 Gy redukuje průjem a poškození tenkého střeva. Nejvyšší efekt vykazovala právě dávka 400 mg/kg (Huang, 2009). AG se od L-NAME neliší pouze částečnou selektivitou inhibičního účinku na NOS, ale také farmakokinetikou. Zatímco po intravenózní aplikaci L-NAME je biologický poločas eliminace L-NA (metabolit L-NAME inhibující NOS) asi 20 hodin (Piotrovskij, 1993), u AG je poločas výrazně kratší a to pouze 92 min (Beaven, 1969). Proto po jednorázové aplikaci L-NAME přetrvávají plazmatické koncentrace L-NA a jeho inhibiční účinky vůči NOS pravděpodobně po dobu 72 hodin a delší. I přes vysokou dávku AG byl protektivní účinek po jednorázovém podání AG mnohem nižší než u L-NAME, pravděpodobně právě z důvodu rozdílného biologického poločasu. Naše výsledky ukazují, že AG po jednorázovém podání na rozdíl od L-NAME neovlivňuje plazmatické koncentrace NOx v časném období po ozáření. I jiné studie ukazují podobné výsledky. Z našich dalších dosud nepublikovaných dat vyplývá, že na zvýšení koncentrace plazmatických NOx časně po ozáření se podílejí i jiné izoenzymy NOS než jen iNOS, protože po aplikaci vysoce iNOS-selektivního inhibitoru 1400W nedochází k takovému snížení koncentrace NOx v plazmě (koncentrace za 6 h: 11,2  $\mu$ M) jako je tomu po podání L-NAME (koncentrace za 6 h: 8,6  $\mu$ M). Kromě inhibice NOS působí AG také jako antioxidant a inhibitor diaminoxidázy (Nilsson, 1999; Chowdhury, 2009; Polat, 2006; Fan, 2010). Dále bylo prokázáno, že snižuje hladiny konečných produktů glykosylace (Bolton, 2004). Antioxidační účinek AG podaného jednorázově 1 h před ozářením nebyl v naší studii zaznamenán. Naopak, aplikace L-NAME a AG neozářeným potkanům hladinu MDA zvýšila. Mnohé studie dokazují, že ke zvýšení oxidačního stresu v reakci na podání NOS inhibitorů dochází jak na buněčné úrovni, tak *in vivo*. Oxidační stres je pravděpodobně zvyšován několika mechanismy současně, včetně poklesu vychytávání superoxidového radikálu při snížení hladiny NO (Wink, 2001), přímé redukce antioxidační kapacity způsobné NOS inhibitory (Riganti, 2003) a zvýšenou adhezí leukocytů k endoteliálním buňkám a jejich zvýšeným průnikem cévní stěnou, jejíž permeabilitu inhibitory NOS zvyšují (Kurose, 1995).



Z výsledků této práce dále vyplývá, že ALC ve zvoleném dávkovém schématu snižuje hladiny oxidačního stresu vyvolaného ozářením až na úroveň kontrolní neozářené skupiny. K podobným výsledkům dospěly i jiné studie. Například intraperitoneální aplikace ALC v dávce 250 mg/kg po dobu 5 dní s posledním podáním jednu hodinu před celotělovým ozářením dávkou 6 Gy se projevila snížení hladin MDA v plicích a játrech v intervalu 24 hodin po ozáření (Mansour, 2006). Ve stejné práci autoři prokázali významný nárůst aktivity antioxidantních enzymů (superoxid dismutázy a glutathion peroxidázy) a koncentrace redukovaného glutathionu ve srovnání s ozářenou skupinou. Po podání ALC zaznamenali i signifikantní snížení hladin NOx v těchto tkáních. Toto zjištění je v rozporu s našimi výsledky. Plazmatická koncentrace NOx nebyla u ozářených potkanů podáváním ALC snížena, ale byl naopak pozorován trend k jejímu dalšímu zvýšení. Nicméně v literatuře je možné najít také studie dokládající skutečnost, že ALC může způsobovat zvýšení NOx. U potkanů s fyziologickými nebo sníženými koncentracemi NOx v plazmě (Wistar-Kyoto a spontánně hypertenzní potkani) zvyšuje dlouhodobá suplementace L-karnitinu plazmatickou antioxidantní kapacitu a koncentraci NOx (Gómez-Amores, 2007). U pacientů s periferní arteriální nemocí dochází plazmatické hladiny NOx po opakovaném podání propionyl-L-karnitinu a současně i ke snížení plazmatické koncentrace biomarkeru oxidačního stresu 8-hydroxy-2-deoxy-2-deoxyguanosinu (Loffredo, 2007). Plazmatická koncentrace NOx je u zdravých osob zvýšena po perorální podávání glycin propionyl-L-karnitinu (Bloomer, 2009). Fyziologické mechanismy, které vedou ke zvýšení systémové dostupnosti NO po podání karnitinu a jeho esterů nejsou zcela objasněny. Snížená tvorba ROS může vést k menší spotřebě NO nebo k jeho zvýšené produkci enzymem eNOS v cévním endotelu, která je vysvětlována tím, že je tento enzym přítomen ve formě dimeru s vyšší enzymatickou aktivitou než monomer, na který se za podmínek oxidačního stresu zvýšeně rozpadá.

## **5.2. Lokální ozáření**

### **5.2.1. Sledování změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu ve fázi rozvoje radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku u potkana kmene Wistar**

V této studii jsme se zaměřili na změny studovaných parametrů ve fázi radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku dávkou 20 Gy. Při histologickém vyšetření plicní tkáně jsme pozorovali statisticky významné zvýšení počtu neutrofilů ve vzorcích plic ozářených zvířat oproti kontrolní skupině. Na radiační pneumonitidu také poukázala snížená vzdušnost plic. Ke stejným výsledkům dospěl i Österreicher a kolektiv (Österreicher, 2004).

Podle výsledků některých autorů je radiační pneumonitida spjata s vyšší produkcí NOS, NO<sub>x</sub> a dalšími markerů nitračního stresu (Tsuji, 2000; Giaid, 2003). Ačkoliv byla v naší studii radiační pneumonitida prokázána histologicky, hladiny vydechovaného oxidu dusnatého se v průběhu 7 týdnů neměnily. Neinvazivní vyšetření eNO tedy není možné využít jako marker rozvoje a tíže radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku potkana kmene Wistar. Beze změn zůstaly i výsledky vyšetření exprese iNOS pomocí metody Western blot a exprese mRNA iNOS a eNOS ve vzorcích plic. K podobným závěrům dospěl i Zhang a kolektiv, který ve své studii také neprokázal zvýšenou expresi iNOS v intervalu 2-24 týdnů po lokálním ozáření hrudníku potkana dávkou 12 Gy (Zhang, 2011).

Vlivem poškození plicní tkáně a následné zánětlivé odpovědi v důsledku ozáření dochází ke zvýšení permeability alveolokapilární membrány, což má za následek průnik plazmatických bílkovin z do alveolárního prostoru. V 7. týdnu po ozáření byla u ozářených potkanů koncentrace celkové bílkoviny v tekutině z BAL zvýšena 4,3x oproti kontrolní skupině. Ke stejným výsledkům dospěl i Zhang a kolektiv (Zhang, 2008), kteří pozorovali u potkanů ve 4 týdnu po ozáření 3,3x zvýšenou koncentraci bílkoviny v BAL po lokálním ozáření hrudníku dávkou 10 Gy oproti kontrolní skupině.

Přes vysokou ochranu dýchacích cest a plic vůči oxidantům zajišťovanou antioxidantními enzymy a nízkomolekulárními látkami (např. glutathion), lze projevy zvýšeného oxidačního stresu běžně prokázat u chronických zánětlivých respiračních onemocnění, jako jsou průduškové astma a chronická obstrukční plicní nemoc (Kirkham, 2006). V naší práci byl pozorován zvýšený oxidační stres projevující se v 7. týdnu po ozáření nárůstem koncentrace MDA v tekutině BAL. Obdobné výsledky ukazují i studie publikované jinými autory (Calveley, 2010; Christofidou-Solomidou, 2011).

Naše práce přináší první informace o genové a proteinové expresi arginázy II a transportérů kationických aminokyselin CAT v souvislosti s ionizujícím zářením a následnou radiační pneumonitidou u potkana. Zhang a kolektiv (Zhang, 2011) detekovali zvýšenou expresi arginázy I v 1-24 týdnu po lokálním ozáření hrudníku potkana dávkou 12 Gy. V naší studii pozorované zvýšení arginázy I nedosáhlo statistické významnosti. Trend k nárůstu exprese arginázy I a také zvýšená exprese transportérů pro arginin CAT 1, 2 a 3, ke které došlo v 7 týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 20 Gy, by mohla souviset s postupným rozvojem radiační fibrózy, jelikož argináza I může přispívat ke zvýšené syntéze polyaminů a kolagenu v mezibuněčné hmotě (He, 2011). Zvýšená exprese arginázy II v plicích je také dávána do spojitosti s probíhajícím zánětem a hojením tkáně. Publikace autorského kolektivu Kitowska et al. v publikaci zaměřené na metabolismus argininu detekují zvýšenou arginázu II u bleomycinem navozené plicní fibróze. Z jejich výsledků je patrný trend snižování exprese arginázy II v čase po aplikaci (Kitowska, 2008). U našich výsledků můžeme pozorovat podobný trend snižování exprese v čase, i když hodnoty nalezené v 6. hodině po lokálním ozáření hrudníku jsou srovnatelné s kontrolní skupinou, v 7. týdnu dosahují 50 % ve srovnání s počátečními hodnotami.

### **5.2.2. Sledování radioprotektivního účinku studovaných látek ve fázi radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku potkana kmene Wistar**

V návaznosti na předchozí studii zaměřenou na časnou fázi po celotělovém ozáření a aplikaci radioprotektiv byl hodnocen ochranný efekt stejných látek, tj. ALC, AG a L-NAME proti rozvoji radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy. Studie se zaměřila především na acetyl-L-karnitin, který je běžně používán jako doplněk stravy, je velmi dobře tolerován organismem a lze jej užívat orálně.

Podle našich výsledků ALC snižuje následky lokálního ozáření dávkou 15 Gy na oblast hrudníku při hodnocení v časovém intervalu 7 týdnů, ve kterém dochází k rozvoji radiační pneumonitidy. Stejně jako v přechodí krátkodobé studii s celotělovým ozářením i v tomto experimentu působila radioprotektivně také látka L-NAME a to ve smyslu zvyšování přežívání. AG statisticky významný vliv na přežívání neměl, podobně jako při 30 denním sledování mortality po celotělovém ozáření.

Výsledky dvou recentních studií provedených na pracovištích radiační onkologie texaské univerzity a Baylor College of Medicine v Texasu ukázaly, že u nemocných s karcinomem jícnu a plic došlo v reakci na radioterapii k nárůstu koncentrace vydechovaného NO u těch nemocných, u kterých se v pozdějším období rozvinula závažnější radiační pneumonitida (McCurdy, 2011; Guerrero, 2011). Poměr hodnoty FeNO (frakce koncentrace oxidu dusnatého ve vydechovaném vzduchu) vyšetřené technikou výdechu ústy kontrolovanou rychlostí 50 ml/s po ukončení radioterapie k hodnotě před léčbou byl u 7 nemocných s radiační pneumonitidou druhého a třetího stupně tíže  $3.0 \pm 1.8$  (průměr  $\pm$  SD) oproti  $0.78 \pm 0.29$  u nemocných s pneumonitidou stupně 0 (tj. bez plicního zánětu) a 1 ( $P=0.006$ ). Výsledek obou studií ale vyžaduje další ověření, protože z převážné části se jednalo o stejný soubor nemocných a počet nemocných se závažnější pneumonitidou byl velmi nízký. V naší studii nebyl na potkaním modelu radiační pneumonitidy vzestup koncentrací vydechovaného NO pozorován, i když byla histologicky prokázána radiační pneumonitida. Mezi člověkem a potkanem existují rozdíly v koncentraci NO v dýchacích cestách (velká u člověka, malá u potkana),

v anatomické lokalizaci zdrojů NO i v regulaci exprese iNOS. Horní dýchací cesty jsou největším zdrojem NO v dýchacích cestách člověka a vyšších primátů. U hlodavců vydechovaný NO pochází výhradně z dolních dýchacích cest a plic. (Matute-Bello, 2008). Zhang a kolektiv (Zhang, 2011) ve své studii také neprokázali vzestup exprese iNOS u potkana kmene Wistar potkanů v intervalu 2-24 týdnů po lokálním ozáření hrudníku dávkou 12 Gy. Tento závěr je v souladu s našimi pilotními výsledky 7 týdenního měření eNO po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy a s výsledky analýz exprese mRNA indukovatelné formy NOS, které neukázaly žádné změny mezi skupinami

Pokud je možné přijmout hypotézu, že zvýšená exprese arginázy I a také transportérů pro arginin CAT 1 a 3 zjištěná po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy je molekulární marker počáteční fáze radiační pneumonitidy, pak její snížení po aplikaci ALC by mohlo signalizovat, že ALC ovlivňuje zánětlivou odpověď v časně fázi po ozáření a mohl by také snížit riziko rozvoje fibrózy. Tato hypotéza ale vyžaduje další výzkum.

Při histologickém vyšetření plicní tkáně jsme pozorovali ochranný vliv proti následkům lokálního ozáření hrudníku u všech tří aplikovaných látek. Při hodnocení zánětu pomocí detekce fagocytujících buněk měl pozitivní efekt ALC a AG, které shodně snížily počet neutrofilů v plicní tkáni. Při sledování biochemických parametrů oxidačního a nitračního stresu byl zaznamenán pokles celkové koncentrace dusičnanů/dusitanů v tekutině BAL u ALC skupiny a to 1,3x a u skupiny L-NAME 1,1x. Vzhledem k tomu, že exprese obou zkoumaných forem NOS (iNOS a eNOS) a hodnoty exhalovaného oxidu dusnatého nebyly ovlivněny, zůstává důvod snížení nejistý. Důvodem by mohl být fakt, že ALC i L-NAME zvyšují vzdušnost plic a tím snižuje množství exsudátu v plicích, což by mohlo mít za následek nižší koncentraci dusičnanů/dusitanů v tekutině BAL.

## 6. KAPITOLA: ZÁVĚRY

Předkládaná práce přinesla poznatky týkající se účinků ionizujícího záření při celotělovém ozáření a lokálním ozáření hrudníku potkana Wistar se zaměřením na metabolickou dráhu arginin-oxid dusnatý a markery oxidačního a nitračního stresu ve vztahu k patofyziologickým změnám v časně fázi (do 72 h) a ve fázi radiační pneumonitidy (7 týdnů).

Z výsledků lze vyvodit následující závěry:

1. Změny v metabolické dráze arginin-NO v prvních 24 hodinách po celotělovém ozáření jsou malé ve srovnání s aplikací bakteriálního lipopolysacharidu. Po dávkách 2-50 Gy nejsou v plicích a dýchacích cestách přítomny známky výraznějšího nitračního stresu. Koncentrace exhalovaného NO ozářených a kontrolních potkanů se neliší v časně fázi po celotělovém ozáření (do 24 h) ani při sledování po dobu 7 týdnů po ozáření v oblasti hrudníku. To vylučuje využití této neinvazivní techniky v biodozimetrii u potkanů. Koncentrace dusitanů/dusičnanů se po celotělovém ozáření (2-50 Gy) zvyšují v tekutině z bronchoalveolární laváže jen mírně a bez vztahu k dávce záření a v homogenátu plic jsou beze změny. V plazmě dochází v 6. h po celotělovém ozáření k dávkově závislému nárůstu koncentrací dusitanů/dusičnanů v rozsahu 2-10 Gy. Maximální hodnoty jsou 2,5-krát vyšší než koncentrace v kontrolní skupině a vyšší dávky nevyvolávají další zvýšení.
2. Látka L-NAME podaná v jedné dávce a ALC podávaný opakovaně po dobu 5 dní před ozářením působí radioprotektivně. Podstatně zvyšují přežívání potkanů v intervalu 30 dní po celotělovém ozáření dávkou 8 Gy. L-NAME snižuje nitrační stres (dusitany/dusičnany v plazmě), zatímco ALC snižuje oxidační stres (malondialdehyd v plazmě). Jednorázové podání AG před ozářením neovlivňuje oxidační a nitrační stres a vliv na přežívání je oproti L-NAME a ALC menší.

3. Exhalovaný NO nelze použít jako prediktivní marker radiační pneumonitidy. Jeho hodnoty měřené po dobu 7 týdnů po ozáření hrudníku (20 Gy) nevykazují žádné změny u potkanů s histochemicky potvrzenou radiační pneumonitidou. Zvýšená exprese arginázy I a transportérů pro kationické aminokyseliny CAT v 7. týdnu po ozáření by mohla být považována za indikátor rozvoje radiační pneumonitidy. Zvýšený transport argininu a jeho intenzivnější metabolická přeměna na ornitin arginázou I podporují tvorbu glutamátu a zejména prolinu potřebných k syntéze kolagenu. Uvedené nálezy tak mohou odrážet hojení plicní tkáně.
4. Z výsledků sledování účinků látek ALC, L-NAME a AG po dobu 7 týdnů u potkanů vystavených ozáření dávkou 15 Gy lokálně na hrudník vyplývá, že pouze ALC působí na organismus radioprotektivně. Pětidenní aplikace látky před ozářením zvyšuje přežívání potkanů. Dále pak redukuje zánětlivý infiltrát v plicní tkáni a také zvyšuje vzdušnost plic v 7. týdnu po ozáření. Snížená exprese arginázy I a transportérů pro kationické aminokyseliny CAT1 a CAT3 ve srovnání s ozářenými potkany nechráněnými ALC by mohla být signálem, že tato látka snižuje zánětlivou odpověď vedoucí k poškození tkáně a tím klesají i nároky na dostupnost argininu potřebného k jejímu hojení.

---

## Literatura

ADHVARYU, MR et al. A comparative study of radioprotection by four Indian medicinal herbs against genotoxicity induced by sub-lethal gamma irradiation in Swiss albino mice. *Iran. J. Radiat. Res.* 2008, 6, s. 19-30.

AHMAD, T et al. Exhaled nitric oxide estimation by a simple and efficient noninvasive technique and its utility as a marker of airway inflammation in mice. *J Appl Physiol.* 2009, 107, 295-301.

ALDERTON, WK; COOPER, CE; KNOWLES, RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*, 2001, 357, s. 593-615.

AUGUSTINE, AD et al. Animal Models for Radiation Injury, Protection and Therapy. *Radiat Res.* 2005, 164, s. 100-109.

BABICOVÁ, A et al. Effect of acetyl-L-carnitine pretreatment on radiation pneumonitis and L-Arginine-NO metabolic pathway. *Military Medical Science Letters.* 2012, 81, s. 119-28.

BARNHAM, KJ; MASTERS, CL; BUSH AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress.

BASU, AK; MARNETT, LJ. Molecular requirements for the mutagenicity of malondialdehyde and related acroleins. *Cancer Res.* 1984, 44, s. 2848-2854.

BEAVEN, MA et al. A specific and sensitive assay for aminoguanidine: its application to a study of the disposition of aminoguanidine in animal tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 1969, 165, s. 14-22.

BENKOVIĆ, V et al. Radioprotective effects of propolis and quercetin in gamma-irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. *Phytomedicine.* 2008, 15, s. 851-858.

BEN-SHAUL, V et al. The effect of natural antioxidants, NAO and apocynin, on oxidative stress in the rat heart following LPS challenge. *Toxicol Lett.* 2001, 123, s. 1-10.

BETTERIDGE, DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000, 49, s. 3-8.

BEUTLER, B. Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Curr Opin Microbiol.* 2000, 3, 23-8.

BLOOMER, RJ; TSCHUME, LC; SMITH, WA. Glycine propionyl-L-carnitine modulates lipid peroxidation and nitric oxide in human subjects. *Int J Vitam Nutr Res.* 2009, 79, s. 131-41.



- BLUM, RH; CARTER, SK; AGRE, K. A clinical review of bleomycin--a new antineoplastic agent. *Cancer*. 1973, 31, s. 903-914.
- BÖGER, RH. Live and let die: asymmetric dimethylarginine and septic shock. *Crit Care*. 2006, 10, s. 169.
- BOLTON, WK et al. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 2004, 24, s. 32-40.
- BRAISER, AR. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol*. 2006, 6, s. 111-130.
- BUGA, GM; IGNARRO, LJ. *Nitric Oxide*: Academic Press, 2000. Nitric Oxide and Cancer , s. 895-920.
- BULAU, P et al. Analysis of methylarginine metabolism in the cardiovascular system identifies the lung as a major source of ADMA. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007, 292, s. 18-24.
- CALVELEY, VL et al. Genistein can mitigate the effect of radiation on rat lung tissue. *Radiat Res*. 2010, 173, s. 602-611.
- CARRÍ, MT. et al. Neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis: the role of oxidative stress and altered homeostasis of metals. *Brain Res Bull*. 2003, 61, s. 365-374.
- CLARK, RA. Oxidative stress and "senescent" fibroblasts in non-healing wounds as potential therapeutic targets. *J Invest Dermatol*. 2008, 128, s. 2361-2364.
- CLAUDE, L et al. A prospective study on radiation pneumonitis following conformal radiation therapy in non-small-cell lung cancer: clinical and dosimetric factors analysis. *Radiother Oncol*. 2004, 71, s. 175-181.
- CLOSS, EI et al. Substrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters. *Mol Pharmacol*. 2000, 57, s. 68-74.
- COGGLE, JE; LAMBERT, BE; MOORES, SR. Radiation effects in the lung. *Environ Health Perspec*. 1986, 70, s. 261-291.
- CORBETT, JA; MCDANIEL, ML. The Use of Aminoguanidine, a Selective iNOS Inhibitor, to Evaluate the Role of Nitric Oxide in the Development of Autoimmune Diabetes. *Methods*. 1996, 10, s. 21-30.
- CORNELISSEN, R et al. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) after thoracic radiotherapy for breast carcinoma. *Radiat Oncol*. 2007, 2, s. 2-7.

- CORRADI, M et al. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001, 163, s. 854-858.
- DAS, S et al. Structural studies of the side chain of outer membrane lipopolysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola* W-43. *J Bacteriol.* 1994, 176, s. 6550-6557.
- DRÖGE, W; BREITKREUTZ, R. Glutathione and immune function. *Proc Nutr Soc.* 2000, 59, s. 595-600.
- DU, J et al. A Newly Found Gasotransmitter, Hydrogen Sulfide, in the Pathogenesis of Hypertension and Other Cardiovascular Diseases. *Curr Hypertens Rev.* 2006, 2, s. 123-126.
- ENDO, M et al. Induction of arginase I and II in bleomycin-induced fibrosis of mouse lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003, 285, s. 313-321.
- ERBIL, Y et al. Nitric oxide and radiation enteritis. *Eur J Surg.* 1998, 164, s. 863-868.
- EROGLU, C et al. Aminoguanidine ameliorates radiation-induced oxidative lung damage in rats. *Clin Invest Med.* 2008, 31, s. E182-188.
- ESPOSTI, D et al. Modulation of melatonin secretion by acetyl-L-carnitine in adult and old rats. *J Pineal Res.* 1994, 17, s. 132-136.
- EUM, HA et al. Role of nitric oxide in the expression of hepatic vascular stress genes in response to sepsis. *Nitric Oxide.* 2007, 17, s. 126-133.
- FAN, ZK et al. The effect of aminoguanidine on compression spinal cord injury in rats. *Brain Res.* 2010, 1342, s. 1-10.
- FINAUD, J; LAC, G; FILAIRE, E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med.* . 2006, 36, s. 327-358.
- FINKEL, T; HOLBROOK, NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000, 408, s. 239-247.
- FURCHGOTT, RF; ZAWADZKI, JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980, 288, s. 373-376.
- GADINA, M et al. Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol.* 2001, 13, s. 363-373.
- GHAFOURIFAR, P; CADENAS, E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci.* 2005, 26, s. 190-195.

- GIAID, A et al. Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine in Mice With Radiation-Induced Lung Damage. *Am J Clin Oncol*. 2003, 26, s. 67-72.
- GILMORE, TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006, 25, s. 6680-6684.
- GÓMEZ-AMORES, L et al. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *J Nutr Biochem*. 2007, 18, s. 533-540.
- GROOVER, TA; CHRISTIE, AC; MERRITT, EA. Observations on the Use of the Copper Filter in the Roentgen Treatment of Deep-Seated Malignancies. *South Med J*. 1922, 15, s. 440-443.
- GROSS, NJ. Pulmonary effects of radiation therapy. *Ann Intern Med*. 1977, 86, s. 81-92.
- GUERRERO, T et al. Elevation in Exhaled Nitric Oxide Predicts for Radiation Pneumonitis. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2011. Article in Press.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci*. 2006, 78, s. 803-811.
- HAGHDOOST, S. *Biomarkers of oxidative stress and their application for assessment of individual radiosensitivity*. Stockholm, 2005. 43 s. Dizertační práce. Stockholm University.
- HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006, 141, s. 312-322.
- HANSON, P et al. Acute corticosteroid myopathy in intensive care patients. *Muscle Nerve*. 1997, 20, s. 1371-1380.
- HAWIGER, J ET AL. IkappaB kinase complex is an intracellular target for endotoxic lipopolysaccharide in human monocytic cells. *Blood*. 1999, 94, 1711-1716.
- HAYASHI, T et al. Evaluation of systemic markers of inflammation in atomic-bomb survivors with special reference to radiation and age effects. *FASEB J*. 2012, 26, s. 4765-4573.
- HE, Z et al. The interaction between different types of activated RAW 264.7 cells and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Radiat Oncol*. 2011, 6, s. 1-7.
- HESSLINGER, CH et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in respiratory diseases. *Biochem Soc Trans*. 2009, 37, s. 886-891.
- HOLLOWAY, AF; RAO, S; SHANNON, FM. Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. *Mol Immunol*. 2002, 38, s. 567-580.

- HOPKINS, SJ. The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine*. 2003, 5, s. 45-57.
- HUANG, EY et al. Aminoguanidine alleviates radiation-induced small-bowel damage through its antioxidant effect. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009, 74, 237-244.
- CHOWDHURY, M, P; SOULSBY, ME; SCOTT, JL. Effects of aminoguanidine on tissue oxidative stress induced by hindlimb unloading in rats. *Ann Clin Lab Sci* 2009, 39, s. 64-70.
- CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M et al. Dietary flaxseed administered post thoracic radiation treatment improves survival and mitigates radiation-induced pneumonopathy in mice. *BMC Cancer*. 2011, 11, s. 1-15.
- INOUE, A et al. Radiation pneumonitis in lung cancer patients: a retrospective study of risk factors and the long-term prognosis. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2001, 49, s. 649–655.
- INOUE, M et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*. 2003, 10, s. 2495-2505.
- ITO, K; GROUDINE, M. A new member of the cationic amino acid transporter family is preferentially expressed in adult mouse brain. *J Biol Chem*. 1997, 272, s. 26780-26786.
- JACK, CI et al. Indicators of free radical activity in patients developing radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996, 34, s. 149-154.
- JAGETIA, GCH; BALIGA, MS. Polyherbal extract of septilin protects mice against whole body lethal dose of gamma radiation. *Phytother Res*. 2004, 18, s. 619-623.
- JANICKA, M et al. Isoprostanes-Biomarkers of Lipid Peroxidation: Their Utility in Evaluating Oxidative Stress and Analysis. *Int J Mol Sci*. 2010, 11, s. 4631-4659.
- JANTZ, MA; SAHN, SA. Corticosteroids in acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999, 160, s. 1079-1100.
- JOHNSTON, CJ et al. Pulmonary cytokine and chemokine mRNA levels after inhalation of lipopolysaccharide in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci*. 1998, 46, s. 300-307.
- KAO, CC et al. Arginine, citrulline and nitric oxide metabolism in sepsis. *Clin Sci (Lond)*. 2009, 117, 23-30.
- KATSUYAMA, K et al. Role of nuclear factor-kappaB activation in cytokine- and sphingomyelinase-stimulated inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. 1998, 135, s. 4506-4512.

- KEVIN, LG; NOVALIJA, E; STOWE, DF. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevance to anesthesia practice. *Anesth Analg*. 2005, 101, s. 1275-1287.
- KIM, TH et al. Dose-volumetric Parameters for Predicting Severe Radiation Pneumonitis after Three-dimensional Conformal Radiation Therapy for Lung Cancer. *Radiology*. 2005, 235, s. 208-215.
- KINNULA, VL et al. Oxidative stress in pulmonary fibrosis: a possible role for redox modulatory therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005, 15, s. 417-422.
- KIRKHAM, P; RAHMAN, I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther*. 2006, 111, s. 476-494.
- KITOWSKA, K et al. Functional role and species-specific contribution of arginases in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008, 294, s. 34-45.
- KLENER, P et al. *Cytokiny ve vnitřním lékařství*. Praha : Grada Publishing, 1997. 260 s.
- KNOWLES, RG. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem Soc Trans*. 1996, 24, s. 875-878.
- KOSLOWSKI, R et al. Cathepsins in bleomycin-induced lung injury in rat. *Eur Respir J*. 2003, 22, s. 427-435.
- KRINSKY, NI. Membrane antioxidants. *Ann N Y Acad Sci*. 1988, 551, s. 17-32.
- KUROSE, I et al. Microvascular responses to inhibition of nitric oxide production. Role of active oxidants. *Circ Res*. 1995, 76, s. 30-39.
- LIEBMANN, J et al. In vivo radiation protection by nitric oxide modulation. *Cancer Res*. 1994, 54, s. 3365-3368.
- LINDELL, SE et al. The effect of enzyme inhibitors on histamine catabolism in man. *Br J Pharmacol Chemother*. 1960, 15, s. 351-355.
- LOFFREDO, L et al. Oxidative-stress-mediated arterial dysfunction in patients with peripheral arterial disease. *Eur Heart J*. 2007, 28, 608-612.
- LOPES, G et al. L- and DL-carnitine induce tetanic fade in rat neuromuscular preparation. *Braz J Med Biol Res*. 2003, 36, s. 1255-1262.
- LORTIE, MJ et al. Production of arginine by the kidney is impaired in a model of sepsis: early events following LPS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004, 287, s. 1434-1440.

MACNAUGHTON, WK et al. Expression, activity and cellular localization of inducible nitric oxide synthase in rat ileum and colon post-irradiation. *Int J Radiat Biol.* 1998, 74, s. 255–264.

MAGAÑA, E; CROWELL, RE. Radiation pneumonitis successfully treated with inhaled corticosteroids. *South Med J.* 2003, 96, s. 521-524.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?. *Crit Care.* 2006, 10, s. 208.

MANSOUR, HH. Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. *Pharmacol Res.* 2006, 54, 165-171.

MARITIM, AC; SANDERS, RA; WATKINS, JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003, 17, s. 24-38.

MARNETT, LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology.* 2002, 181-182, s. 219-222.

MARTIN, M; LEFAIX, JL; DELANIAN, S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target?. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000, 47, s. 277-290.

MARUSYK, A et al. Irradiation selects for p53-deficient hematopoietic progenitors. *PLoS Biol.* 2010, 8, s. 1-17.

MATUTE-BELLO, G; FREVERT, CHW; MARTIN, TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008, 295, s. 379-399.

MAURYA, DK; DEVASAGAYAM, TPA; NAIR, CHKK. Some novel approaches for radioprotection and the beneficial effect of natural products. *Indian J Exp Biol.* 2006, 44, s. 93-114.

MCCARTY, MJ; LILLIS, P; VUKELJA, SJ. Azathioprine as a steroid-sparing agent in radiation pneumonitis. *Chest.* 1996, 109, s. 1397-1400.

MCCLUSKIE, K et al. Nitric oxide as a noninvasive biomarker of lipopolysaccharide-induced airway inflammation: possible role in lung neutrophilia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004, 311, 625-33.

MCCURDY, MR et al. Exhaled nitric oxide predicts radiation pneumonitis in esophageal and lung cancer patients receiving thoracic radiation. *Radiother Oncol.* 2011, 101, s. 443-448.

MIHÁL, V et al. Radiační pneumonitida jako diagnostické dilema. *Pediatr. pro Praxi.* 2007, 8, s. 315-316.

- MONTUSCHI, P et al. 8-Isoprostane as a Biomarker of Oxidative Stress in Interstitial Lung Diseases. *AM J RESPIR CRIT CARE MED*. 1998, 158, s. 1524–1527.
- MORGAN, GW; BREIT, SN. Radiation and the lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury.. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995, 15, s. 361-369.
- MOVSAS, B et al. Pulmonary Radiation Injury. *Chest*. 1997, 111, s. 1061-1076.
- MUNGER, KA; BLANTZ, RC; LORTIE, MJ. Acute renal response to LPS: impaired arginine production and inducible nitric oxide synthase activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006, 291, s. 684-691.
- MURAOKA, T et al. Corticosteroid refractory radiation pneumonitis that remarkably responded to cyclosporin A. *Intern Med*. 2002, 41, s. 730-733.
- NAGATA, K et al. Effect of inhaled NG-nitro-L-arginine methyl ester on Candida-induced acute lung injury. *Chest*. 2003, 124, s. 2293-2301.
- NAIR, CHKK; PARIDA, DK; NOMURA, T. Radioprotectors in radiotherapy. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2001, 42, s. 21-37.
- Nat Rev Drug Discov*. 2004, 3, s. 205-14.
- NETEA, MG et al. Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol*. 2002, 23, s. 135-9.
- NICHOLSON, B et al. Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *J Biol Chem*. 2001, 276, s. 15881-5.
- NILSSON, BO. Biological effects of aminoguanidine: an update. *Inflamm Res*. 1999, 48, s. 509-15.
- NISHIKORI, M. Classical and Alternative NF- $\kappa$ B Activation Pathways and Their Roles in Lymphoid Malignancies. *J.Clin.Exp.Hematopathol*. 2005, 45, s. 15-24.
- NOVO, E; PAROLA, M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008, 1, s. 5.
- OHTA, S et al. The role of nitric oxide in radiation damage. *Biol Pharm Bull*. 2007, 30, s. 1102-7.
- OPAL, SM; DEPALO, VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000, 117, s. 1162-1172.
- ÖSTERREICHER, J et al. Role of type II pneumocytes in pathogenesis of radiation pneumonitis: dose response of radiation-induced lung changes in the transient high vascular permeability period. *Exp Toxicol Pathol*. 2004, 56, s. 181-7.

- ÖSTERREICHER, J; VÁVROVÁ, J. *Přednášky z radiobiologie*. Praha: Manus, 2003. 111 s.
- OUYANG, W et al. Essential roles of PI-3K/Akt/IKKbeta/NFkappaB pathway in cyclin D1 induction by arsenite in JB6 Cl41 cells. *Carcinogenesis*. 2006, 27, s. 864-873.
- PEDOTO, A et al. Beneficial effect of hyperbaric oxygen pretreatment on lipopolysaccharide-induced shock in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003, 30, s. 482-8.
- PETTEGREW, JW; LEVINE, J; MCCLURE, RJ. Acetyl-L-carnitine physical-chemical, metabolic, and therapeutic properties: relevance for its mode of action in Alzheimer's disease and geriatric depression. *Mol Psychiatry*. 2000, 5, s. 616-632.
- PILZ, J; MEINEKE, I; GLEITER, CH. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2000, 742, s. 315-25.
- PIOTROVSKIJ, VK et al. NG-nitro-L-arginine pharmacokinetics in rats after a single intravascular and oral dose: an appearance of secondary concentration time peaks. *Drug Metab Dispos*. 1993, 21, s. 962-4.
- POLAT, A et al. Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta Histochem*. 2006, 108, s. 365-71.
- PRATO, FS, et al. The incidence of radiation pneumonitis as a result of single fraction upper half body irradiation. *Cancer*. 1977, 39, s. 71-78
- PUNITHAVATHI, D; VENKATESAN , N; BABU, M. Curcumin inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Br J Pharmacol*. 2000, 131, s. 169-172.
- RAETZ, CR; WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2002, 71, 635-700.
- RANCATI, T et al. Factors predicting radiation pneumonitis in lung cancer patients: a retrospective study. *Radiother Oncol*. 2003, 67, s. 275-283.
- REITER, RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*. 1995, 9, s. 526-533.
- RICCIARDOLO, FL et al. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *Eur J Pharmacol*. 2006, 533, s. 240-252.
- RIGANTI, C et al. Nitroarginine methyl ester and canavanine lower intracellular reduced glutathione. *Free Radic Biol Med*. 2003, 35, 1210-6.
- RIMA, G et al. A Review on the Radioprotective Activity of organogermanium and Organosilicon Compounds. *Met Based Drugs*. 1999, 6, s. 49-60.



RODRIGUES, G et al. Prediction of radiation pneumonitis by dose - volume histogram parameters in lung cancer--a systematic review. *Radiother Oncol*. 2004, 71, s. 127-138.

RÜBE , CE et al. Dose-dependent induction of transforming growth factor beta (TGF-beta) in the lung tissue of fibrosis-prone mice after thoracic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000, 47, s. 1033-1042.

RÜBE , CE et al. The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005, 61, s. 1482-1492.

RUBIN, P et al. A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995, 33, s. 99-109.

RUMPT, TJ et al. Acetyl-L-carnitine protects neuronal function from alcohol-induced oxidative damage in the brain. *Free Radic Biol Med*. 2010, 49, s. 1494-1504.

SEYMOUR, RM; HENDERSON, Brian. Pro-inflammatory--anti-inflammatory cytokine dynamics mediated by cytokine-receptor dynamics in monocytes. *IMA J Math Appl Med Biol*. 2001, 18, s. 159-192.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993, 215, s. 213-219.

SIMMONS, WW et al. Cytokines and insulin induce cationic amino acid transporter (CAT) expression in cardiac myocytes. Regulation of L-arginine transport and no production by CAT-1, CAT-2A, and CAT-2B. *J Biol Chem*. 1996, 271, s. 1694-702.

SINGH, VK; YADAV, VS. Role of cytokines and growth factors in radioprotection. *Exp Mol Pathol*. 2005, 78, s. 156-169.

SRINIVAS, R; AGARWAL, R; AGGARWAL, AN. A deferred dilemma. *Am J Med*. 2007, 120, s. 594-597.

STEJSKAL, J et al. Porovnání dozimetrické a biologické predikce akutní toxicity při léčbě. XXXI. Brněnské onkologické dny a XXI. Konference pro sestry a laboranty. Brno: 2007. s. 272-274.

STEVENS, BR et al. Induced nitric oxide synthesis is dependent on induced alternatively spliced CAT-2 encoding L-arginine transport in brain astrocytes. *J Biol Chem*. 1996, 271, s. 24017-22.

TAPKIRE, R; KATHIRESAN, N; SATHEESAN, B. Bleomycin induced urethral stricture in Hodgkin's disease. *Indian J Urol*. 2009, 25, s. 398-400.

TASSIOPOULOS, AK et al. Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities. *J Vasc Surg*. 1997, 26, s. 647-656.

TATEDA, K et al. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infect Immun.* 1996, 64, s. 769-74.

TEERLINK, T et al. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 2002, 303, s. 131-7.

TRAVIS, EL; TUCKER, SL. The relationship between functional assays of radiation response in the lung and target cell depletion. *Br J Cancer Suppl.* 1986, 7, s. 304-319.

TROTT, KR; HERRMANN, T; KASPER, M. Target cells in radiation pneumopathy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004, 58, s. 463-469.

TSOUTSOU, PG; KOUKOURAKIS, MI. Radiation pneumonitis and fibrosis: mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006, 66, s. 1281-1293.

TSUJI, C et al. Increased production of nitrotyrosine in lung tissue of rats with radiation-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000, 278, s. L719-25.

TURNBULL, AV; RIVIER, CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev.* 1999, 79, s. 1-71.

VAIJAPURKAR, SG et al. Gamma-irradiated onions as a biological indicator of radiation dose. *Radiat Meas.* 2001, 33, s. 833-6.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007, 39, s. 44-84.

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004, 266, s. 37-56.

VALLYATHAN, V; SHI, X. The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung diseases. *Environ Health Perspect.* 1997, 105, s. 165-177.

WALLACE, HM; FRASER, AV; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* 2003, 376, s. 1-14.

WANG, X; QUINN PJ. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Prog Lipid Res.* 2010, 49, 97-107.

WARD, JF et al. Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *Br. J. Cancer.* 1987, 55, s. 105-112.

WEI, X et al. A phosphoinositide 3-kinase-gamma inhibitor, AS605240 prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010, 397, s. 311-317.

WILLIAMS, JP et al. Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. *Radiat Res*. 2010, 173, s. 557-578.

WINK, DA et al. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxid Redox Signal*. 2001, 3, s. 203-13.

WOITZIK, J; ABROMEIT, N; SCHAEFER, F. Measurement of nitric oxide metabolites in brain microdialysates by a sensitive fluorometric high-performance liquid chromatography assay. *Anal Biochem*. 2001; 289, s. 10-7.

WONG, GHW. Protective roles of cytokines against radiation: induction of mitochondrial MnSOD. *Biochim Biophys Acta*. 1995, 1271, s. 205-209.

WOODCOCK, JM; BAGLEY, CHJ; LOPEZ, AF. Receptors of the cytokine superfamily: mechanisms of activation and involvement in disease. *Baillieres Clin Haematol*. 1997, 10, s. 507-524.

XAVIER, S et al. Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone.. *J Biol Chem*. 2004, 279, s. 15167-15176.

XIA, Y et al. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem*. 1998, 273, s. 25804-8.

YASUI, F et al. Effects of chronic acetyl-L-carnitine treatment on brain lipid hydroperoxide level and passive avoidance learning in senescence- accelerated mice. *Neurosci Lett*. 2002, 16, s. 177-180.

YERAMIAN, A et al. Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages. *J Immunol*. 2006, 176, s. 5918-24.

YI, ES et al. Keratinocyte growth factor ameliorates radiation- and bleomycin-induced lung injury and mortality. *Am J Pathol*.. 1996, 149, s. 1963-1970.

ZEGDI, R. et al. Exhaled nitric oxide and acute lung injury in a rat model of extracorporeal circulation. *Shock*. 2003, 20, s 569-74.

ZELKO, IN; FOLTZ, RJ. Extracellular superoxide dismutase attenuates release of pulmonary hyaluronan from the extracellular matrix following bleomycin exposure. *FEBS Lett*. 2010, 584, s. 2947-2952.

---

ZHANG, H et al. The development of classically and alternatively activated macrophages has different effects on the varied stages of radiation-induced pulmonary injury in mice. *J Radiat Res.* 2011, 52, s. 17-26.

ZHANG, R et al. Structural and functional alterations in the rat lung following whole thoracic irradiation with moderate doses: injury and recovery. *Int J Radiat Biol.* 2008, 84, s. 487-497.

ANDREA NAGY

---

## Příloha

### *Celotělové ozáření*

**Porovnání změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu vyvolaných ionizujícím zářením s účinky bakteriálního LPS u potkana kmene Wistar**

### Souhrn výsledků

**Tabulka 36** Porovnání změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu vyvolaných ionizujícím zářením s účinky bakteriálního LPS u potkana kmene Wistar

	kontroly	Ozáření				PBS kontroly	LPS	
		5 Gy		50 Gy			+6 h	+24 h
		+6 h	+24 h	+6 h	+24 h			
<b>eNO (ppb)</b>	2.1 (0.53)	0.74 (0.26) <sup>a</sup>	1.3 (0.34)	0.89 (0.46) <sup>a</sup>	0.93 (0.21)	0.94 (0.39)	57 (22) <sup>c</sup>	9.4 (7.4) <sup>c</sup>
<b>plazma NO<sub>x</sub> (μM)</b>	7.5 (1.7)	17 (2.3) <sup>c</sup>	22 (10) <sup>c</sup>	23 (8.8) <sup>c</sup>	29 (15) <sup>c</sup>	9.9 (2.8)	81 (32) <sup>c</sup>	340 (280) <sup>c</sup>
<b>plazma arginin (μM)</b>	196 (41)	207 (8.6)	179 (15)	190 (13)	207 (24)	184 (38)	53 (21) <sup>b</sup>	135 (52)
<b>BAL NO<sub>x</sub> (μM)</b>	2.1 (0.50)	1.7 (0.09)	3.6 (1.5) <sup>c</sup>	1.8 (0.29)	2.7 (0.45) <sup>a</sup>	2.5 (1.1)	6.4 (2.2) <sup>c</sup>	14 (4.5) <sup>c</sup>
<b>BAL arginin (nM)</b>	225 (69)	241 (23)	225 (43)	240 (140)	329 (84)	223 (55)	229 (70)	273 (64)
<b>plíce NO<sub>x</sub> (μmol.g protein<sup>-1</sup>)</b>	0.38 (0.22)	0.44 (0.14)	0.55 (0.19)	0.48 (0.17)	0.45 (0.16)	0.52 (0.24)	1.6 (0.62) <sup>c</sup>	2.4 (0.83) <sup>c</sup>
<b>játra NO<sub>x</sub> (μmol.g protein<sup>-1</sup>)</b>	0.37 (0.18)	0.69 (0.27)	0.79 (0.54)	0.94 (0.51) <sup>a</sup>	0.48 (0.15)	0.53 (0.26)	1.2 (0.21) <sup>c</sup>	1.9 (0.75) <sup>c</sup>

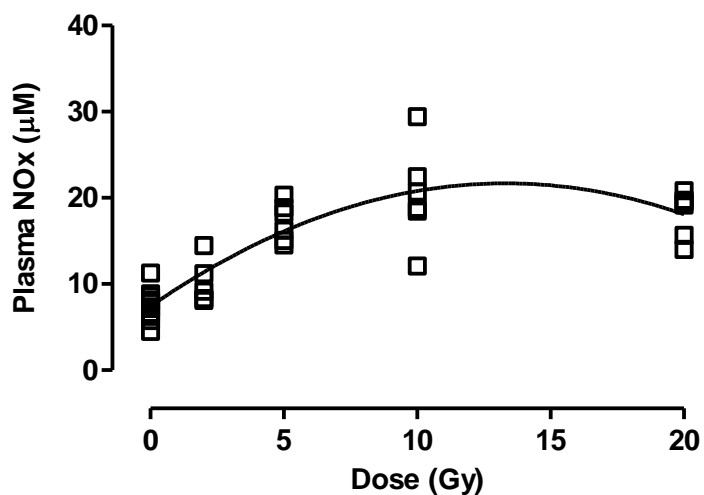
Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr (směrodatná odchylka)

Legenda: PBS-fyziologický roztok; LPS-lipopolysacharid; eNO-vydechovaný oxid dusnatý; BAL-tekutina z bronchoalveolární laváže; NO<sub>x</sub>-celková koncentrace dusičnanů/dusitanů;

Statistika: a=P≤0,05; b=P≤0,01; c=P≤0,001

## Lineárně-kvadratický model dávkové závislosti

Tabulka 37 Lineárně-kvadratický model dávkové závislosti



$B_0$	7.399
$B_1$	2.145
$B_2$	-0.08055
<b>SE:</b>	
$B_0$	0.8021
$B_1$	0.2610
$B_2$	0.01285
<b>95% CI:</b>	
$B_0$	5.765 - 9.034
$B_1$	1.614 - 2.677
$B_2$	-0.1067 až -0.05436
<b>Goodness of Fit:</b>	
$R^2$	0.7617

Vztah mezi dávkou ionizujícího záření a koncentrace NOx v plazmě.

Plná čára představuje lineárně- kvadratický model

( $Y = B_0 + B_1 \cdot X + B_2 \cdot X^2$ ).

## Sledování ochranného vlivu vybraných radioprotektivních látek proti následkům celotělového ozáření potkana Wistar

### Souhrn výsledků

**Tabulka 38** Sledování ochranného vlivu vybraných radioprotektivních látek proti následkům celotělového ozáření potkana Wistar

	<i>Kontroly</i>				<i>ozáření 8Gy</i>			
	<i>PBS</i>	<i>AG</i>	<i>L-NAME</i>	<i>ALC</i>	<i>PBS</i>	<i>AG</i>	<i>L-NAME</i>	<i>ALC</i>
<b>plazma MDA (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	2,49 (1,73-3,57)	4,32 (3,89-4,80) <sup>c</sup>	4,37 (3,78-5,04) <sup>c</sup>	2,34 (1,73-3,57)	4,40 (3,89-4,80) <sup>c</sup>	3,45 (2,93-4,10) <sup>a</sup>	4,25 (3,79-4,76) <sup>c</sup>	1,85 (1,67-2,04) <sup>c</sup>
<b>plazma NO<sub>x</sub> (<math>\mu\text{M}^1</math>)</b>	9,60 (6,81-13,5)	9,57 (5,62-16,3)	6,88 (5,24-9,03) <sup>b</sup>	12,4 (9,33-16,6)	18,4 (11,4-29,8) <sup>a</sup>	16,7 (10,5-26,7) <sup>a</sup>	8,61 (7,36-10,1)	24,9 (16,8-36,8) <sup>b</sup>

Výsledky jsou vyjádřeny jako geometrický průměr (95 % interval spolehlivosti pro g. průměr)

Legenda: PBS-fyziologický roztok; AG-aminoguanidin; L-NAME-methyl ester nitro-L-argininu; ALC-acetyl-L-karnitin; MDA-malondialdehyd; BAL-tekutina z bronchoalveolární laváže; NO<sub>x</sub>-celková koncentrace dusičnanů/dusitanů;

Statistika: a= $P \leq 0,05$ ; b= $P \leq 0,01$ ; c= $P \leq 0,001$



## Lokální ozáření

### Sledování změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu ve fázi rozvoje radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku u potkana kmene Wistar

#### Souhrn výsledků

**Tabulka 39** Sledování změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu ve fázi rozvoje radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku u potkana kmene Wistar

	Kontroly		ozáření 20 Gy			
	+0 h	+7 t	+6 h	+24 h	+72 h	+7 t
plazma MDA ( $\mu\text{M}$ )	3,36 (0,41)	3,51 (0,42)	3,18 (0,66)	3,53 (0,48)	3,59 (0,33)	3,70 (0,41)
plazma NO <sub>x</sub> ( $\mu\text{M}$ )	6,94 (1,42)	9,49 (1,58)	13,52 (2,37)	8,34 (5,16)	7,35 (3,28)	9,34(3,89)
plazma TP (g/l)	63,5 (4,08)	63,8 (3,10)	67,4 (3,84)	61,2 (2,23)	55,5 (5,86)	53,4 (13,8)
BAL MDA (nM)	237 (50,3)	227 (62,4)	251 (24,4)	231 (84,8)	253 (82,4)	394 (142) <sup>a</sup>
BM NO <sub>x</sub> ( $\mu\text{M}$ )	1,40 (0,15)	1,29 (0,23)	3,20 (0,86) <sup>b</sup>	1,54 (0,38)	1,86 (0,69)	1,44 (0,20)
BAL TP(mg/l)	139 (18,9)	114 (21,4)	128 (18,7)	138 (26,7)	144 (31,4)	604 (326) <sup>b</sup>

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr (směrodatná odchylka)

Legenda: MDA-malondialdehyd; BAL-tekutina z bronchoalveolární laváže; NO<sub>x</sub>-celková koncentrace dusičnanů/dusitanů; TP-celková bílkovina

Statistika: a= $P \leq 0,05$ ; b= $P \leq 0,01$

## Výsledky RT-PCR

Tabulka 40 Výsledky RT-PCR u dávky 20 Gy

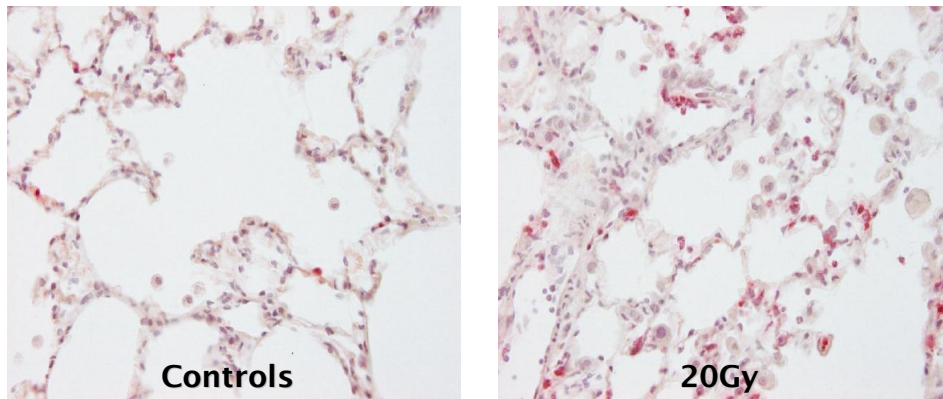
	<i>Kontroly</i>		<i>ozáření 20 Gy</i>			
	<i>+0 h</i>	<i>+7 t</i>	<i>+6 h</i>	<i>+24 h</i>	<i>+72 h</i>	<i>+7 t</i>
<b>iNOS</b>	100 (163)	66,8 (44,7)	185 (187)	55,3 (35,9)	45,7 (46,2)	136 (157)
<b>eNOS</b>	100 (32,9)	171 (122)	99,8 (135)	94,8 (23,0)	70,0 (24,5)	65,3 (63,4)
<b>Argináza I</b>	100 (22,0)	156 (78,8)	118 (131)	69,7 (25,3)	102 (17,1)	184 (154)
<b>Argináza II</b>	100 (43,4)	216 (124)	99,9 (134)	63,3 (18,2)	65,1 (34,2)	49,8 (29,6)
<b>CAT1</b>	100 (21,7)	120 (26,3)	116 (129)	84,1 (18,8)	92,9 (19,3)	206 (127) <sup>a</sup>
<b>CAT2</b>	100 (40,0)	105 (76,2)	64,6 (12,9)	64,0 (22,9)	78,9 (40,4)	193 (105) <sup>a</sup>
<b>CAT3</b>	100 (48,8)	120 (39,4)	86,9 (30,3)	77,4 (43,5)	49,9 (42,2)	218 (96,5) <sup>b</sup>

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr (směrodatná odchylka)

Statistika: a= $P \leq 0,05$ ; b= $P \leq 0,01$

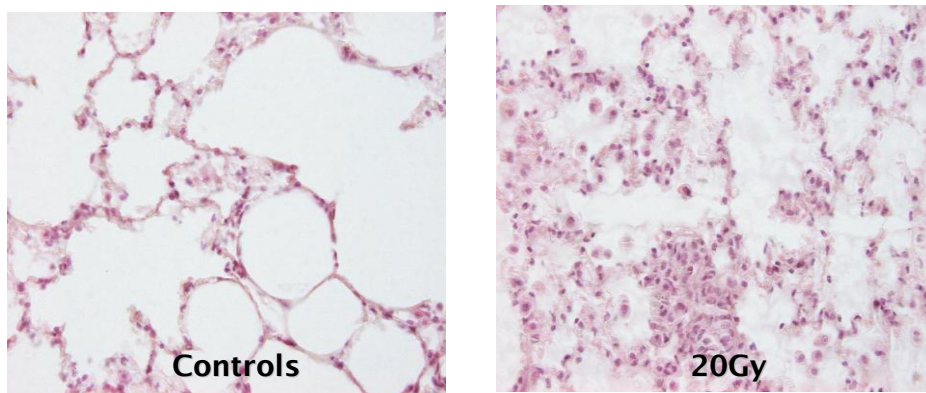
### Infiltrace zánětlivými buňkami

**Obrázek 9** Infiltrace zánětlivými buňkami po lokálním ozáření hrudníku dávkou 20 Gy



### Vzdušnost plicní tkáně

**Obrázek 10** Vzdušnost plicní tkáně po lokálním ozáření hrudníku dávkou 20 Gy



## Sledování radioprotektivního účinku studovaných látek ve fázi radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku potkana kmene Wistar

### Souhrn výsledků

**Tabulka 41** Sledování radioprotektivního účinku studovaných látek ve fázi radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku potkana kmene Wistar

	<i>ozáření 15 Gy</i>			
	<i>PBS</i>	<i>AG</i>	<i>L-NAME</i>	<i>ALC</i>
<b>eNO (ppb)</b>	0,64 (0,13)	0,57 (0,04)	0,52 (0,06)	0,64 (0,06)
<b>plazma MDA (<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	1,84 (0,11)	1,83 (0,10)	1,89 (0,27)	2,03 (0,12)
<b>plazma NO<sub>x</sub> (<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	21,2 (16,8)	18,4 (7,50)	38,1 (8,07)	17,7 (6,07)
<b>plazma TP (g/l)</b>	64,0 (0,56)	60,4 (3,33)	59,3 (3,19)	59,2 (1,80)
<b>BAL MDA (nM)</b>	236 (52,0)	245 (33,1)	452 (108)	408 (81,6)
<b>BM NO<sub>x</sub> (<math>\mu\text{mol.L}^{-1}</math>)</b>	6,29 (0,15)	5,96 (0,23)	5,62 (0,04) <sup>a</sup>	4,88 (0,12) <sup>a</sup>
<b>BAL TP(mg/l)</b>	490 (335)	440 (103)	2150 (1178)	1090 (280)

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr (střední chyba průměru)

Legenda: PBS-fyziologický roztok; AG-aminoguanidin; L-NAME-methyl ester nitro-L-argininu; ALC-acetyl-L-karnitin; MDA-malondialdehyd; BAL-tekutina z bronchoalveolární laváže; NO<sub>x</sub>-celková koncentrace dusičnanů/dusitanů; TP-celková bílkovina;

Statistika: a=P≤0,05

## Výsledky RT-PCR

Tabulka 42 Výsledky RT-PCR u dávky 15 Gy

	<b>ozáření 15 Gy</b>			
	<i>PBS (kontroly)</i>	<i>AG</i>	<i>L-NAME</i>	<i>ALC</i>
<b>iNOS</b>	100 (49)	91 (36)	152 (45)	138 (60)
<b>eNOS</b>	100 (16)	167 (33)	77 (18)	99 (25)
<b>Argináza I</b>	100 (64)	53 (9)	64 (12)	57 (9)
<b>Argináza II</b>	100 (14)	67 (11)	67 (14)	86 (28)
<b>CAT1</b>	100 (19)	107 (19)	68 (14)	59 (7) <sup>a</sup>
<b>CAT2</b>	100 (14)	134 (13)	65 (10)	64 (14)
<b>CAT3</b>	100 (20)	86 (13)	76 (15)	53 (14) <sup>a</sup>

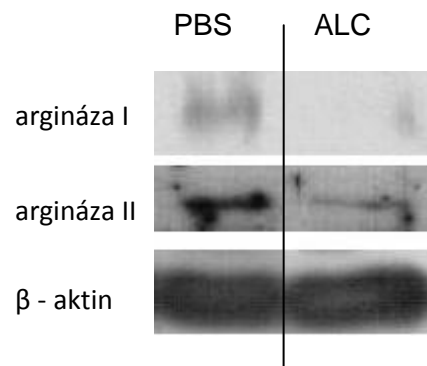
Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr (střední chyba průměru)

Legenda: PBS-fyziologický roztok; AG-aminoguanidin; L-NAME-methyl ester nitro-L-argininu; ALC-acetyl-L-karnitin;

Statistika: a= $P \leq 0,05$

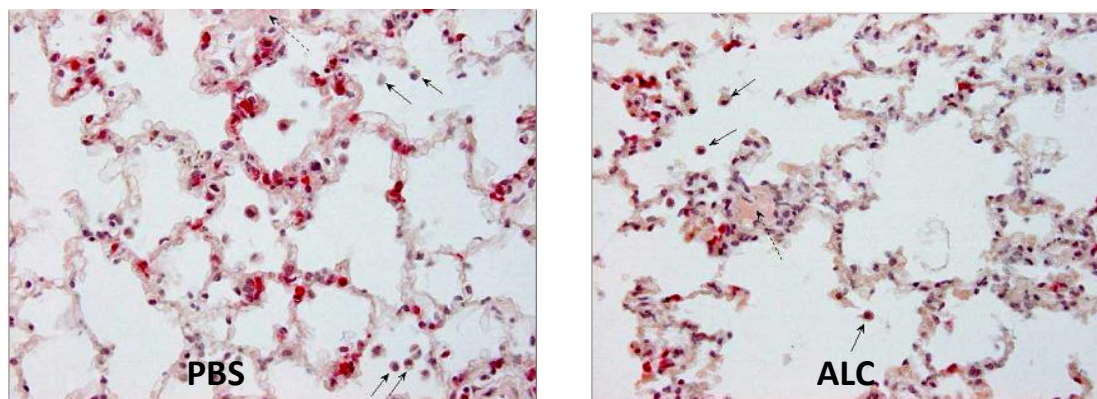
## Expresa argináza v plicní tkáni u skupiny ALC v 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy

Obrázek 11 Expresa argináza v plicní tkáni u skupiny ALC v 7. týdnu po ozáření dávkou 15 Gy



## Infiltrace zánětlivými buňkami

Obrázek 12 Infiltrace zánětlivými buňkami po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy



## ***Publikace***

## Early changes in L-arginine-nitric oxide metabolic pathways in response to the whole-body gamma irradiation of rats

Andrea Babicova<sup>1</sup>, Zuzana Havlinova<sup>2</sup>, Jaroslav Pejchal<sup>3</sup>, Ales Tichy<sup>3</sup>, Martina Rezacova<sup>1</sup>, Jirina Vavrova<sup>3</sup> & Jaroslav Chladek<sup>1,2</sup>

Departments of <sup>1</sup>Medical Biochemistry and <sup>2</sup>Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové, and <sup>3</sup>Department of Radiobiology, University of Defence in Brno, Faculty of Military Health Sciences, Hradec Králové, Czech Republic

### Abstract

**Purpose:** Nitric oxide (NO), a reactive radical, is formed in higher amounts from L-arginine by inducible NO synthase (iNOS) during early response to ionizing radiation presumably as a part of signal transduction pathways. This study investigated the changes in L-arginine-NO metabolic pathways within a 24-hour period after whole-body gamma irradiation of rats with the range of low to supra-lethal doses.

**Materials and methods:** Young adult female Wistar rats received either 0–50 Gy whole-body irradiation or an intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide (LPS, 10 mg/kg). Exhaled NO was monitored using chemiluminescence, nitrite + nitrate (NO<sub>x</sub>) and L-arginine were assayed by high-performance liquid chromatography, and expression of iNOS was determined using Western blot.

**Results:** Irradiation resulted in a dose-dependent increase of plasma NO<sub>x</sub> to maximum levels which were 4-fold higher compared to controls ( $p < 0.001$ ). The NO<sub>x</sub> levels increased less in the bronchoalveolar lavage fluid (BAL) (1.7-fold,  $p < 0.001$ ) and liver homogenate (2.5-fold,  $p < 0.05$ ), respectively, and were dose-independent. Exhaled NO, lung NO<sub>x</sub>, plasma and BAL L-arginine, and the expression of iNOS in lung and liver tissues of irradiated rats and controls were similar. LPS caused a considerable increase ( $p < 0.001$ ) in exhaled NO (61-fold), NO<sub>x</sub> levels (plasma 34-fold, BAL 6-fold, lung 5-fold, liver 4-fold), and in iNOS expression, respectively.

**Conclusion:** In contrast to the LPS treatment of rats, the radiation-induced changes in L-arginine-NO metabolic pathways are modest, particularly in the airways and lungs. Noninvasive measurement of exhaled NO within a 24-h period following the exposure of rats to ionizing radiation has no value for biodosimetry.

**Keywords:** Nitric oxide, L-arginine, gamma irradiation, rat

### Introduction

Lung injury following exposure to ionizing radiation has been well documented especially in patients after the radiotherapy

of haematological malignancies or tumours in the thoracic region. Its clinical signs involve radiation pneumonitis, i.e., acute inflammatory reaction which develops several weeks following irradiation, and radiation fibrosis manifesting after 6–12 months (Abid et al. 2001, Mehta 2005). During the last few years, investigations of the mechanisms of radiation injury on the cellular and molecular level helped to improve our knowledge of the various cascades of events which proceed during a period of clinically silent pulmonary injury. It is presumed that the crucial cause of radiation pneumonitis/fibrosis development is the activation of proinflammatory (interleukin-1 [IL-1], interleukin-6 [IL-6], tumour necrosis factor-alpha [TNF- $\alpha$ ], interferon-gamma [IFN- $\gamma$ ]) and profibrotic (transforming growth factor beta [TGF- $\beta$ ], fibroblast growth factors [FGF]) cytokine cascades (Tsoutsou and Koukourakis 2006).

Ionizing radiation damages the cells either directly or indirectly through the radiolysis of water and production of reactive oxygen species (ROS). Nitric oxide (NO), a reactive radical, is formed in higher amounts from L-arginine by inducible NO synthase (iNOS) in response to ionizing radiation. The mechanisms of its release in the murine macrophage cell line RAW264.7 were studied by Ibuki et al. (2003). In their study, nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) activation was dose-dependently increased 1 h after gamma-irradiation. Signal transduction involved the activation of poly(ADP-ribose) polymerase through DNA damage leading to NF $\kappa$ B activation with the subsequent induction of iNOS and synthesis of NO. Bacterial lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$ , and oxidative stress have been shown to induce iNOS expression in different cell types by activating NF- $\kappa$ B (Pautz et al. 2010). Some theories propose that ROS are initiators and NO and other reactive nitrogen species (RNS) are effectors activating particular cytosolic signal transduction pathways in response to ionizing radiation (Mikkelsen and Wardman 2003).

Published animal studies indicate an increased formation of NO in various organs after ionizing radiation. Due



to the short half-life of NO and other RNS, the investigators followed the changes in the expression of iNOS mRNA and protein, and used biochemical methods and/or immunohistochemistry to evaluate the concentrations of stable metabolic end-products of NO such as nitrites/nitrates ( $\text{NO}_x$ ) and nitrotyrosine (Nozaki et al. 1997, Tsuji et al. 2000, Giaid et al. 2003). However, NO can also be detected in the exhaled air using sensitive methods like chemiluminescence (Gustafsson et al. 1991). The use of this non-invasive approach for evaluation of enhanced NO production in small animal models of acute lung injury, asthma and chronic obstructive pulmonary disease has been described by several groups (Lee et al. 2001, Zegdi et al. 2003, Chen et al. 2008, Ahmad et al. 2009). However, no study has so far adopted this method in animal experiments for the measurement of exhaled NO (eNO) after exposure to ionizing radiation.

The present study investigates changes in L-arginine-NO metabolic pathways in rats which occur within 24 h after whole-body irradiation with the range of low to supralethal doses (2–50 Gy). Evaluation of eNO is performed together with traditional methods for assessment of NO formation, such as measurements of the  $\text{NO}_x$  concentrations in the lung tissue, bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and plasma and the evaluation of iNOS protein expression in the lung and liver tissue by Western blot. The concentration of L-arginine in the plasma and BAL is determined. The results are compared with data obtained in LPS-treated rats as a positive control, since LPS is a well-known inducer of iNOS and NO formation (Bachetti et al. 2003, Birrell et al. 2006).

## Materials and methods

### Animals

Female, specific pathogen free, Wistar rats (Velaz s.r.o., Prague, Czech Republic), weighing 200–250 g, were used throughout the study. Animals were fed with standard feed and water *ad libitum*. The daily cycle was automatically regulated at 12-h intervals (light/dark). All experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Medicine in Hradec Kralove and the University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic.

### Chemicals

LPS from *Escherichia coli* (H55:O5), nitrate reductase from *Aspergillus niger*, glucose-6-phosphate dehydrogenase, glucose-6-phosphate and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Primary and secondary antibodies used for Western blots were as follows: iNOS polyclonal antibody (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), monoclonal anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma-Aldrich), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins and HRP-conjugated polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark). iNOS electrophoresis standard was obtained from Cayman Chemical. The other chemicals were of the analytical grade.

### Irradiation

Whole-body gamma irradiation with respective doses of 5 and 50 Gy were delivered to two groups of irradiated rats using a  $^{60}\text{Co}$  gamma-ray source (Chirana, Prague, Czech Republic) with a dose-rate of 1 Gy/min. Non-anesthetized animals were restrained in separate chambers of a well ventilated Plexiglas container. Another group of rats (Controls) underwent all procedures in the same manner as the irradiated groups without being exposed to irradiation. If dose-related changes in the indicators of NO formation under study were detected, additional experiments with doses 2, 10 and 20 Gy were conducted to fully characterize the dose-response relationship.

### Lipopolysaccharide challenge

LPS-treated rats received 5 mg/kg LPS in 0.9% (w/v) sterile saline using an intraperitoneal (i.p.) injection. Saline-treated controls received only vehicle.

### Serial measurements of exhaled nitric oxide

The concentration of eNO was measured with a CLD 88 chemiluminescence analyzer (Ecomedics, Duernten, Switzerland) using the procedure described for mice by Ahmad et al. (2009) with minor modifications. Rats were individually placed into a sealed plastic box with a volume of 3 L (P-LAB Ltd, Prague, Czech Republic). The box was flushed for approximately 3 min with NO-free air from the Denox module of the analyzer. Thereafter, air from the box was sampled to confirm zero baseline. The box was tightly closed and after 10 min, air was sucked from the box into the analyzer at a rate of 330 ml/min being replaced by NO-free air from the Denox. An initial stable concentration of eNO was recorded. Serial measurements of eNO were performed over 24 h in rats irradiated with 5 and 50 Gy ( $n = 5$  for each group) and, in control rats ( $n = 4$ ).

### Measurements of nitrites/nitrates in BAL fluid, plasma, lung and liver tissue

Two groups of irradiated rats (5 and 50 Gy) and a control group were examined at 6 h and 24 h intervals ( $n = 6$  for each group and interval). Animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.). Blood was collected from abdominal aorta into a 9-ml S-monovette  $\text{K}_3$ -ethylenediaminetetraacetic acid (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and rats were killed by exsanguination. The lungs were lavaged with 10 ml of 0.9% w/v saline solution through the tracheostomy. The blood and BAL fluid were centrifuged at 2,000 g force for 10 min at 4°C; livers and lungs were removed and snap-frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

The sum of nitrite and nitrate concentrations ( $\text{NO}_x$ ) in biological fluids and tissue homogenates was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection as described by Woitzik et al. (2001). The method is based on enzymatic reduction of nitrates by nitrate reductase and on the determination of nitrites after derivatization with 2, 3-diaminonaphtalene. Tissues were immersed in liquid nitrogen and pulverized in the mortar. The tissue powder was mixed with ammonium acetate buffer (25 micromol/l, pH = 4.5) and the resulting suspension was

centrifuged (15,000 g force, 15 min, 4°C). The supernatant was ultrafiltered (15 min, 4°C, 10,000 g force) to remove proteins using Microcon YM-30 Centrifugal Filter Units (Millipore Corp., Billerica, MA, USA) and the ultrafiltrate was used for the determination of NO<sub>x</sub>.

#### Assay for L-arginine in BAL fluid and plasma

L-arginine was assayed in BAL fluid and plasma using HPLC with fluorescence detection according to Teerlink et al. (2002) with minor modifications. Briefly, L-arginine and the internal standard N-ethylarginine were extracted from the plasma and BAL using a solid-phase cartridge Oasis MCX (Waters, Prague, Czech Republic) and derivatized with o-phthalaldehyde. After separation on the Zorbax Eclipse XDB C18 column, 150 mm length × 4.6 mm inner diameter, 5 µm particle size (HPST, Prague, Czech Republic), the derivatives were quantified by fluorescence (excitation wavelength 335 nm, emission wavelength 450 nm).

#### Western blot analysis of iNOS

Lung and liver samples were homogenized in a cold homogenizing buffer (4°C, the ratio of tissue to buffer 1:5, weight/volume) using homogeniser Ultra Turrax (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) and the crude homogenate was centrifuged (1,000 g force, 10 min, 4°C). The determination of expression was carried out by Western blot of the supernatant collected after a second centrifugation (30 min, 4°C, 19,000 g force). Total protein concentration in the supernatant was determined using the bicinchoninic acid protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Pooled samples were prepared from tissue homogenates of all animals in the respective groups using the volumes of the supernatants containing the same amount of total protein. Proteins were separated by sodium dodecyl sulphate (10%) polyacrylamide gel electrophoresis using 30 µg of protein per sample. iNOS electrophoresis standard was included as a positive control. Resultant proteins were electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes (Bio-Rad Laboratories s.r.o., Prague, Czech Republic). After blotting, membranes were incubated for 1 h at room temperature in blocking solution (5% non-fat dry milk added to 0.05% Tween 20 in tris(hydroxymethyl) aminomethane-buffered saline [TBS/T]). The resultant blot was washed three times in 0.05% TBS/T and incubated overnight with an iNOS antibody (4°C, dilution 1:500). Blots were washed three times in 0.05% TBS/T and incubated for 1 h with secondary antibodies, a HRP-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulin for iNOS detection (dilution 1:2,000) and polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins for beta-actin detection (dilution 1:25,000). The blots were washed three times with TBS buffer and developed with enhanced electrochemiluminescence (Roche s.r.o., Prague, Czech Republic).

#### Statistical analysis

The results of serial measurements of eNO were analyzed by two-way Analysis Of Variance (ANOVA) for repeated measurements. Post hoc analysis was performed by the Bonferroni test. Within-group changes of eNO from the baseline were evaluated by one-way ANOVA for repeated measurements.

Between-group differences in NO<sub>x</sub> and L-arginine levels were analysed by one-way ANOVA. Dunnett's multiple comparison test was used for post hoc analysis. Calculations were performed using Statistica 8.0 software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Significance was assumed when the *p* value was < 0.05. The data are shown as the mean and standard deviation (SD).

## Results

### Effect of irradiation on the availability of NO and L-arginine in the airways and lung and on iNOS expression

Figure 1 shows the results of serial measurements of eNO performed over a 24-h period in rats irradiated with 5 and 50 Gy, and in control rats. Two-way analysis of variance for repeated measures revealed that eNO was significantly influenced by the factors Group (*p* < 0.02) and Time (*p* < 0.001), respectively. The eNO vs. time curves differed between groups: No significant changes from the baseline (0 h) were detected by Dunnett's multiple comparison test in controls and in rats irradiated with 50 Gy, respectively, while the lower dose of 5 Gy resulted in a transient elevation of eNO at 2 hours (2.2-fold compared to the baseline, *p* < 0.001). However, post hoc comparison of eNO between groups indicated that the amounts exhaled by controls were higher at 0 h and 6 h and at no time point following irradiation did the eNO levels of irradiated groups exceed those of controls (Figure 1).

A small to moderate increase in BAL NO<sub>x</sub> was observed in irradiated rats (Table I). Maximum elevation (1.7-fold above the level of controls) was found at 24 h following irradiation with 5 Gy (Table I). Investigation extended to doses of 2, 10 and 20 Gy revealed that the effect of irradiation on BAL NO<sub>x</sub> was not dose-dependent (Figure 2). L-arginine concentration in BAL fluid of irradiated rats did not show any statistical differences when compared with the control group (Table I).

Irradiation exerted no effect on NO<sub>x</sub> levels in the lung homogenate evaluated at 6 and 24 h (Table I). Finally, there was little-to-no change of iNOS expression in the lung tissue (Figure 3).

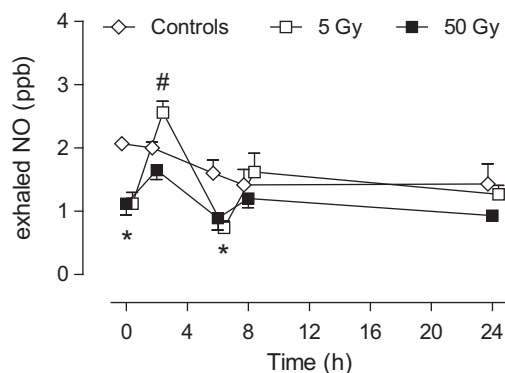


Figure 1. Serial measurement of exhaled NO in rats irradiated with 5 and 50 Gy, and in control rats (0 Gy). Values represent mean concentrations ± SEM for *n* = 4–5 rats/group. The two-way ANOVA for repeated measurements indicated the main effects of Time (*p* < 0.001), Group, and Group × Time (*p* < 0.01). \*Significant differences between irradiated rats and controls were detected by Bonferroni post tests: *p* ≤ 0.05. #within-group comparison of eNO against the base-line (0 h) by Dunnett's multiple comparison test: 5 Gy at 2 h: *p* < 0.001.

Table I. Exhaled NO, nitrite and nitrate (NO<sub>x</sub>) in bronchoalveolar lavage fluid (BAL), plasma and tissues, and plasma and BAL arginine in rats after whole body irradiation (5 and 50 Gy) and lipopolysaccharide (LPS) administration (10 mg/kg intraperitoneally).

	Irradiated rats						LPS-treated rats	
	Controls	5 Gy		50 Gy		Saline-treated controls	+6 h	+24 h
		+6 h	+24 h	+6 h	+24 h			
Exhaled NO (ppb)	2.1 (0.53)	0.74 (0.26) <sup>a</sup>	1.3 (0.34)	0.89 (0.46) <sup>a</sup>	0.93 (0.21)	0.94 (0.39)	57 (22) <sup>c</sup>	9.4 (7.4) <sup>c</sup>
BAL NO <sub>x</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )	2.1 (0.50)	1.7 (0.09)	3.6 (1.5) <sup>c</sup>	1.8 (0.29)	2.7 (0.45) <sup>a</sup>	2.5 (1.1)	6.4 (2.2) <sup>c</sup>	14 (4.5) <sup>c</sup>
Lung NO <sub>x</sub> (μmol.g protein <sup>-1</sup> )	0.38 (0.22)	0.44 (0.14)	0.55 (0.19)	0.48 (0.17)	0.45 (0.16)	0.52 (0.24)	1.6 (0.62) <sup>c</sup>	2.4 (0.83) <sup>c</sup>
Plasma NO <sub>x</sub> (μmol.l <sup>-1</sup> )	7.5 (1.7)	17 (2.3) <sup>c</sup>	22 (10) <sup>c</sup>	23 (8.8) <sup>c</sup>	29 (15) <sup>c</sup>	9.9 (2.8)	81 (32) <sup>c</sup>	340 (280) <sup>c</sup>
Liver NO <sub>x</sub> (μmol.g protein <sup>-1</sup> )	0.37 (0.18)	0.69 (0.27)	0.79 (0.54)	0.94 (0.51) <sup>a</sup>	0.48 (0.15)	0.53 (0.26)	1.2 (0.21) <sup>c</sup>	1.9 (0.75) <sup>c</sup>
BAL arginine (nmol.l <sup>-1</sup> )	225 (69)	241 (23)	225 (43)	240 (140)	329 (84)	223 (55)	229 (70)	273 (64)
Plasma arginine (μmol.l <sup>-1</sup> )	196 (41)	207 (8.6)	179 (15)	190 (13)	207 (24)	184 (38)	53 (21) <sup>c</sup>	135 (52)

Data are presented as mean (SD),  $n = 6$  rats/group/time point. Significant differences between irradiated rats and controls: <sup>a</sup> $p \leq 0.05$ ; <sup>c</sup> $p \leq 0.01$ . Significant differences between LPS-treated rats and saline-treated controls: <sup>a</sup> $p \leq 0.05$ ; <sup>c</sup> $p \leq 0.01$ .

### Plasma and liver NO<sub>x</sub> and plasma L-arginine after irradiation

Irradiation resulted in a dose-dependent increase in plasma NO<sub>x</sub> at 6 h with a maximum concentration observed after irradiation by 50 Gy being 3-fold higher compared to controls. Within the range of doses from 2–20 Gy, the relationship between plasma NO<sub>x</sub> and the dose was well described ( $r^2 = 0.76$ ) by a linear quadratic model  $\text{Plasma NO}_x = B_0 + B_1 \times \text{Dose} - B_2 \times \text{Dose}^2$  with the following estimates (SD) for the best-fit parameters  $B_0$ ,  $B_1$  and  $B_2$ : 7.4 (0.8), 2.15 (0.26), and  $-0.081$  (0.013), respectively (Figure 4). Measurements at 24 h documented that plasma NO<sub>x</sub> further increased in all irradiated groups but the inter-individual variability augmented as well and the difference from the mean value at 6 h reached significance only after 2 Gy (Figure 4). The concentration of NO<sub>x</sub> in the liver homogenate displayed a trend towards a moderate increase. However, high inter-individual differences were observed and the elevation above the levels of controls was significant only 6 h after a dose of 50 Gy (Table I). Ionising radiation did not significantly change expression of iNOS protein (Figure 3). Finally, plasma L-arginine levels of irradiated and control rats were comparable (Table I).

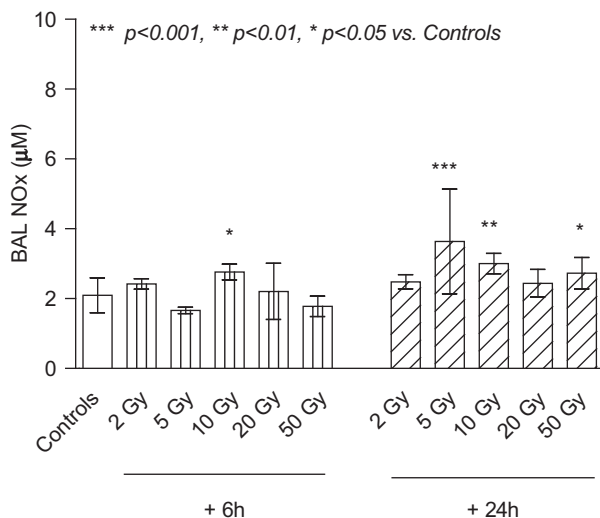


Figure 2. Concentrations of nitrites and nitrates (NO<sub>x</sub>) in the bronchoalveolar lavage fluid (BAL) of irradiated rats 6 h and 24 h after 2–50 Gy doses of whole-body gamma irradiation. Bars represent mean concentrations and error bars indicate the standard deviation (SD) for  $n = 6$  rats/group. The one-way ANOVA proved the effect of Group ( $p < 0.001$ ). Significant differences between irradiated rats and controls (0 Gy) found by Dunnett's multiple-comparison test are indicated.

### Effect of LPS challenge on the availability of NO and L-arginine in the airways and lung and on iNOS expression

Unlike ionising radiation, all selected characteristics of NO formation displayed a considerable increase after LPS administration (Table I). Compared with saline-treated animals, eNO was 61-fold and 10-fold higher ( $p \leq 0.001$ ) 6 h and 24 h after LPS application, respectively. The NO<sub>x</sub> concentrations assayed in BAL at 6 h were 3-fold higher when compared to those of controls and further increased at 24 h (a 5-fold elevation) (Table I). Thus, the highest concentrations of NO<sub>x</sub> in BAL were observed later in time when compared to eNO. Despite a considerable increase in both characteristics of NO formation in the airways, the concentration of the iNOS substrate L-arginine in the BAL fluid of LPS-treated rats was comparable to that of saline-treated controls. Administration of LPS caused a marked increase of iNOS protein expression in the lung tissue (Figure 3).

### Plasma and liver NO<sub>x</sub> and plasma L-arginine following LPS challenge

At 6 and 24 h following LPS injection, the plasma NO<sub>x</sub> was increased 8-fold and 34-fold above the level of saline-treated controls (Table I). In addition, LPS significantly decreased the plasma concentration of L-arginine at 6 h post-injection to 29% of the concentration found in saline-treated controls ( $p < 0.01$ ). After 24 h, the concentration partially recovered to 73% of the control value (Table I). Moreover, a significant increase was observed in iNOS expression and NO<sub>x</sub> concentration in the liver homogenate. Expression of iNOS peaked in 6 h interval (Figure 3) while maximal elevation of liver NO<sub>x</sub> (3.6-fold) was detected 24 h after LPS administration.

### Discussion

The present study examined the changes in L-arginine-NO metabolic pathways during an initial phase following whole-body gamma irradiation of rats. For the first time, the investigation included eNO, i.e., the biomarker used previously in various rodent models of inflammation and acute lung injury. Another novel aspect of this study is the use of LPS-treatment as a positive control. The results show that within the first 24 h following sub-lethal to lethal doses, radiation-induced generation of NO is modest, particularly in the airways and lungs. The eNO levels did not exceed those of non-irradiated controls. The concentrations of NO<sub>x</sub> produced by oxidative

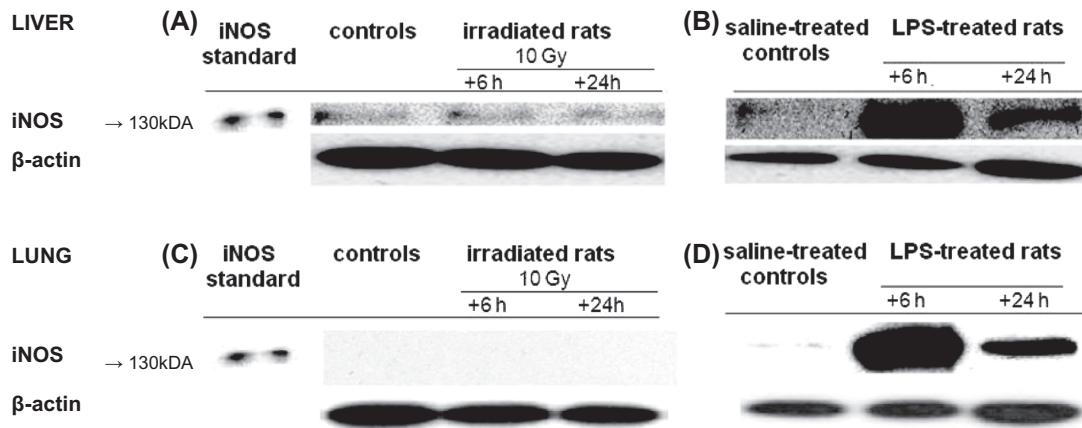


Figure 3. The expression of inducible NO synthase (iNOS) protein in rat liver (A, B) and lung (C, D) after whole body irradiation with 10 Gy (A, C) and, after an intraperitoneal injection of 10 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) (B, D).

metabolism of NO were either similar (lung homogenate) or moderately elevated (BAL fluid). The expression of the iNOS protein in the lung homogenate remained unchanged. Importantly, all characteristics of NO formation augmented considerably after LPS providing an internal control that the methods were sufficiently sensitive.

Numerous other reports show that systemically administered or inhaled bacterial LPS is able to induce iNOS and increase eNO and NO<sub>x</sub> concentrations in the BAL fluid, plasma, and tissues of rats (Lee et al. 2001, Bachetti et al. 2003, Birrell et al. 2006, Su et al. 2007). The high level of NO is necessary for an efficient immune response and cytotoxicity of host cells to kill invading pathogens (Ricciardolo et al. 2006). An early increase in eNO was also found in various rat models of acute lung injury such as after extracorporeal circulation (Zegdi et al. 2003), infusion of oleic acid (Chen et al. 2008), and ischemia-reperfusion caused by occlusion of the infrarenal aorta (Tassiopoulos et al. 1997). It seems to be surprising that the airways and lung show a rapid and marked increase in iNOS expression and NO formation after LPS challenge and, to a lesser extent, in response to acute lung injury while the NO inducing effect of gamma irradiation is delayed in time and relatively limited. Supposing that oxidative stress is an important trigger for iNOS induction, its effect in the airways and lung after ionizing irradiation can be limited for two reasons. First, the lung has a large reserve of antioxidant agents such as glutathione and superoxide dismutase and, second, the oxidative stress after radiation is mild if compared to the rates of superoxide radical release in the respiratory chain and other metabolic reactions (Mikkelsen and Wardman 2003).

The absence of significant up-regulation of iNOS expression and NO formation in the airways and lung contrasts with the acute response to ionizing radiation documented in the circulation and in other organs, namely the ileum and jejunum. In this study, plasma NO<sub>x</sub> displayed a dose-dependent increase at 6 h reaching a plateau after 10 Gy and higher doses (a 3-fold elevation compared to controls). Huang et al. (2009) found similar plasma levels of NO<sub>x</sub> in rats 4 h and 8 h after whole-abdominal irradiation with 12 Gy. In contrast, lower effect of whole-body irradiation was observed in rats by Clarençon et al. (1999). Plasma nitrates increased by 36%

at 24 h after 15 Gy and blood levels of NO detected by differential pulse voltametry at 90 min and 24 h showed a dose-dependent elevation by 26% as the maximum (Clarençon et al. 1999). Messenger RNA, protein expression and the activity of iNOS in the ileum increased within 2 h following whole-body exposure of rats with 10 Gy (MacNaughton et al. 1998). Huang et al. (2009) noted that whole-abdominal irradiation with 12 Gy caused an increased immunohistochemical staining of iNOS and 3-nitrotyrosine in the jejunum of rats at 4 h. Taken together, these data largely confirm the view that induction of iNOS expression after irradiation is cell- and organ-specific (Pautz et al. 2010).

In most studies, the biochemistry of NO in the airways and lung of rats was investigated during later periods after irradiation. The rationale was to perform these investigations after lung injury has been proved using various criteria (Shioya et al. 1997, Kawana et al. 1997). The transcription factor NF-κB was activated only transiently during the first 24 h after irradiation of the rat lung but it remained continuously activated over several months. Its maximum DNA binding activity was detected when radiation-induced pneumonitis and fibrosis was manifest (Haase et al. 2003). Nozaki et al. (1997) were able to document an increased mRNA expression for iNOS in the rat lung by real-time polymerase chain reaction performed on day 3 following unilateral thoracic irradiation. In situ hybridization showed an augmented expression of iNOS mRNA on alveolar and airway epithelium. Nitrite production by alveolar macrophages increased between 7 and 56 days after irradiation (Nozaki et al. 1997). Tsuji et al. (2000) observed an augmented expression of iNOS mRNA in the lung two weeks after irradiation of the left hemithorax of rats with 20 Gy. At the same time, the concentration of protein-bound nitrotyrosine was elevated in lung tissue and NO<sub>x</sub> augmented in BAL fluid (Tsuji et al. 2000). The inducing effect of thoracic irradiation of BALBc mice on iNOS expression in the airway and alveolar epithelium and vascular endothelium is also delayed up to 15–30 days following exposure (Giaid et al. 2003). Thus, the possibility exists that elevation of eNO also occurs during later periods following irradiation of rats and reflects the onset and severity of radiation pneumonitis.

Besides transcriptional regulation of iNOS, the intracellular concentration of its substrate L-arginine may modulate

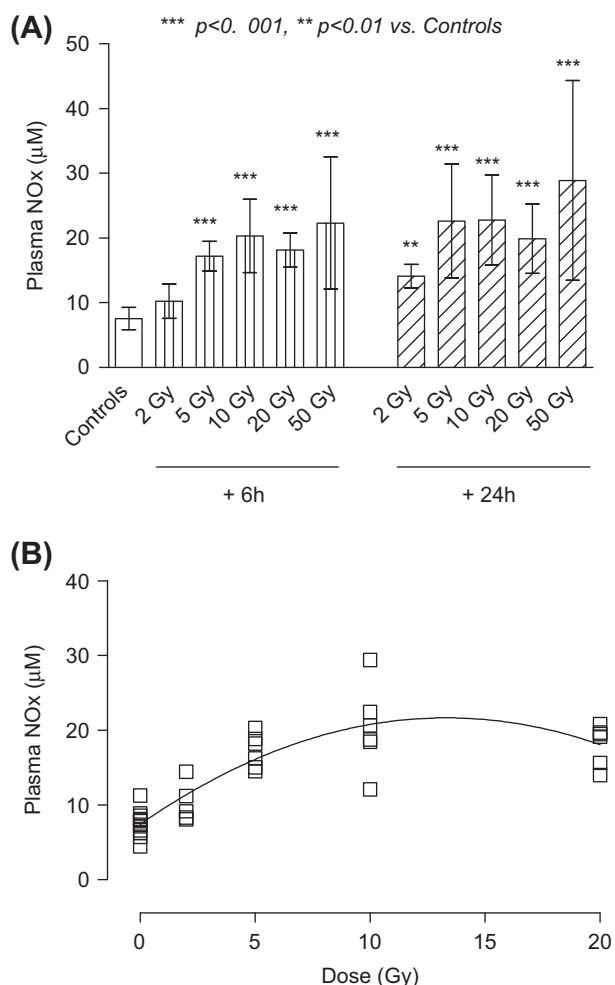


Figure 4. (A) Concentrations of nitrites and nitrates (NO<sub>x</sub>) in the plasma of irradiated rats 6 h and 24 h after whole-body gamma irradiation delivered to total doses from 2–50 Gy. Bars represent mean concentrations and error bars indicate the standard deviation (SD) for  $n = 6$  rats/group. The one-way ANOVA detected the effect of Group ( $p < 0.0001$ ). Significant differences between irradiated rats and controls (0 Gy) found by Dunnett's multiple-comparison test are indicated by asterisks. (B) Plasma NO<sub>x</sub> at 6 h following irradiation with the doses from 0–20 Gy. Solid line represents the fit of the linear quadratic model to the data (Plasma NO<sub>x</sub> =  $7.4 + 2.15 \times \text{Dose} - 0.081 \times \text{Dose}^2$ ).

the release of NO. L-arginine homeostasis is influenced by the rate of its synthesis from citrulline, protein catabolism, consumption of L-arginine by NO synthases, arginases and other enzymes, its cellular uptake via cationic amino acid transporters, and other processes (Ricciardolo et al. 2005). These facts prompted the measurements of L-arginine concentrations in the plasma and BAL fluid both after irradiation and LPS challenge of rats. The levels of L-arginine were unaffected by irradiation. Contrary to that, LPS caused a substantial decrease in plasma L-arginine. It has been shown previously that depletion of plasma L-arginine after LPS precedes induction of iNOS and that the major factor responsible for the rapid decrease is an impaired production of L-arginine by the kidney (Lortie et al. 2004, Munger et al. 2006, Kao et al. 2009). Supposing that L-arginine levels in BAL reflect its intracellular concentrations in the inflammatory and structural cells in the airways, the results of this study argue against a diminished bioavailability of L-arginine in the airways after LPS despite a markedly augmented production of NO. To our

best knowledge, no similar study reporting the measurement of L-arginine in BAL of rats has been published so far.

In conclusion, the results of the present study confirm the view that the induction of iNOS expression is cell- and stimulus-specific (Pautz et al. 2010). Within the first 24 h following whole-body gamma irradiation of rats with sublethal to lethal doses, radiation-induced generation of NO in the airways and lung which is considered a part of signal transduction pathways is marginal compared to the effects of LPS. Non-invasive and rapid measurement of eNO fails as an early biomarker of radiation exposure of rats. Irradiation causes a dose-dependent increase of plasma NO<sub>x</sub> to maximum levels which are 4-fold higher compared to controls. The elevation of NO<sub>x</sub> in BAL fluid is modest and dose-independent. Lung NO<sub>x</sub>, plasma and BAL L-arginine, and expression of iNOS in lung and liver tissues remain unchanged. Future studies should evaluate whether or not concentrations of eNO or related nitrogenous compounds in biological fluids sampled from the airways change during later intervals after thoracic irradiation and are predictive of the onset and severity of radiation pneumonitis.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the Ministry of Defence of the Czech Republic (project OVUFVZ200806) for the financial support.

## Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- Abid SH, Malhotra V, Perry MC. 2001. Radiation-induced and chemotherapy-induced pulmonary injury. *Current Opinion in Oncology* 13:242–248.
- Ahmad T, Mabalirajan U, Joseph DA, Makhija L, Singh VP, Ghosh B, Agrawal A. 2009. Exhaled nitric oxide estimation by a simple and efficient noninvasive technique and its utility as a marker of airway inflammation in mice. *Journal of Applied Physiology* 107:295–301.
- Bachetti T, Pasini E, Suzuki H, Ferrari R. 2003. Species-specific modulation of the nitric oxide pathway after acute experimentally induced endotoxemia. *Critical Care Medicine* 31:1509–1514.
- Birrell MA, McCluskie K, Hardaker E, Knowles R, Belvisi MG. 2006. Utility of exhaled nitric oxide as a noninvasive biomarker of lung inflammation in a disease model. *The European Respiratory Journal* 28:1236–1244.
- Chen HI, Hsieh NK, Kao SJ, Su CF. 2008. Protective effects of propofol on acute lung injury induced by oleic acid in conscious rats. *Critical Care Medicine* 36:1214–1221.
- Clarençon D, Lestaevl P, Laval JD, Multon E, Gourmelon P, Buguet A, Cespuglio R. 1999. Voltammetric measurement of blood nitric oxide in irradiated rats. *International Journal of Radiation Biology* 75:201–208.
- Giaid A, Lehnert SM, Chehayeb B, Chehayeb D, Kaplan I, Shenouda G. 2003. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in mice with radiation-induced lung damage. *American Journal of Clinical Oncology* 126:67–72.
- Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, Wiklund NP, Moncada S. 1991. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 181:852–857.
- Haase MG, Klawitter A, Geyer P, Alheit H, Baumann M, Kriegel TM, Kasper M, Baretton GB. 2003. Sustained elevation of NF-kappaB DNA binding activity in radiation-induced lung damage in rats. *International Journal of Radiation Biology* 79:863–877.

- Huang EY, Wang FS, Lin IH, Yang KD. 2009. Aminoguanidine alleviates radiation-induced small-bowel damage through its antioxidant effect. *International Journal of Radiation Biology* 74:237-244.
- Ibuki Y, Mizuno S, Goto R. 2003. Gamma-irradiation-induced DNA damage enhances NO production via NF-kappaB activation in RAW264.7 cells. *Biochim Biophys Acta* 1593:159-167.
- Kao CC, Bandi V, Guntupalli KK, Wu M, Castillo L, Jahoor F. 2009. Arginine, itrulline and nitric oxide metabolism in sepsis. *Clinical Science* 117:23-30.
- Kawana A, Shioya S, Katoh H, Tsuji C, Tsuda M, Ohta Y. 1997. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 on alveolar macrophages in the acute stage of radiation-induced lung injury in rats. *Radiation Research* 147:431-436.
- Lee RP, Wang D, Kao SJ, Chen HI. 2001. The lung is the major site that produces nitric oxide to induce acute pulmonary oedema in endotoxin shock. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 28:315-320.
- Lortie MJ, Satriano J, Gabbai FB, Thareau S, Khang S, Deng A, Pizzo DP, Thomson SC, Blantz RC, Munger KA. 2004. Production of arginine by the kidney is impaired in a model of sepsis: early events following LPS. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287:1434-1440.
- MacNaughton WK, Aurora AR, Bhamra J, Sharkey KA, Miller MJ. 1998. Expression, activity and cellular localization of inducible nitric oxide synthase in rat ileum and colon post-irradiation. *International Journal of Radiation Biology* 74:255-264.
- Mehta V. 2005. Radiation pneumonitis and pulmonary fibrosis in non-small-cell lung cancer: Pulmonary function, prediction, and prevention. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 63:5-24.
- Mikkelsen RB, Wardman P. 2003. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 22:5734-5754.
- Munger KA, Blantz RC, Lortie MJ. 2006. Acute renal response to LPS: impaired arginine production and inducible nitric oxide synthase activity. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 291:684-691.
- Nozaki Y, Hasegawa Y, Takeuchi A, Fan ZH, Isobe KI, Nakashima I, Shimokata K. 1997. Nitric oxide as an inflammatory mediator of radiation pneumonitis in rats. *American Journal of Physiology* 272:651-658.
- Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. 2010. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23:75-93.
- Ricciardolo FL, Zaagsma J, Meurs H. 2005. The therapeutic potential of drugs targeting the arginase pathway in asthma. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 14:1221-1231.
- Ricciardolo FL, Di Stefano A, Sabatini F, Folkerts G. 2006. Reactive nitrogen species in the respiratory tract. *European Journal of Pharmacology* 533:240-252.
- Shioya S, Tsuji C, Kurita D, Katoh H, Tsuda M, Haida M, Kawana A, Ohta Y. 1997. Early damage to lung tissue after irradiation detected by the magnetic resonance T2 relaxation time. *Radiation Research* 148:359-364.
- Su CF, Yang FL, Chen HI. 2007. Inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates acute endotoxin-induced lung injury in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34:339-346.
- Tassiopoulos AK, Carlin RE, Gao Y, Pedoto A, Finck CM, Landas SK, Tice DG, Marx W, Hakim TS, McGraw DJ. 1997. Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities. *Journal of Vascular Surgery* 26:647-656.
- Teerlink T, Nijveldt RJ, de Jong S, van Leeuwen PA. 2002. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 303:131-137.
- Tsoutsou PG, Koukourakis MI. 2006. Radiation pneumonitis and fibrosis: Mechanisms underlying its pathogenesis and implications for future research. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 66:1281-1293.
- Tsuji C, Shioya S, Hirota Y, Fukuyama N, Kurita D, Tanigaki T, Ohta Y, Nakazawa H. 2000. Increased production of nitrotyrosine in lung tissue of rats with radiation-induced acute lung injury. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 278:719-725.
- Woitzik J, Abromeit N, Schaeffer F. 2001. Measurement of nitric oxide metabolites in brain microdialysates by a sensitive fluorometric high-performance liquid chromatography assay. *Analytical Biochemistry* 289:10-17.
- Zegdi R, Fabre O, Cambillau M, Fornès P, Tazi KA, Shen M, Hervé P, Carpentier A, Fabiani JN. 2003. Exhaled nitric oxide and acute lung injury in a rat model of extracorporeal circulation. *Shock* 20:569-574.

## ORIGINAL ARTICLE

# EFFECT OF ACETYL-L-CARNITINE PRETREATMENT ON RADIATION PNEUMONITIS AND L-ARGININE-NO METABOLIC PATHWAY

Andrea Babicova<sup>1</sup>, Jaroslav Pejchal<sup>2</sup>, Zuzana Havlinova<sup>3</sup>, Martina Rezacova<sup>1</sup>, Klara Kubelkova<sup>2</sup>, Jaroslav Chladek<sup>3</sup>, Ales Tichy<sup>4</sup>, Jirina Vavrova<sup>4</sup>, Lenka Zarybnicka<sup>4</sup>, Eva Novotna<sup>2</sup>, Kamil Kuca<sup>2</sup>, Zuzana Sinkorova<sup>4</sup>✉

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Simkova 870, 500 38 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>2</sup> Center of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University in Prague, Simkova 870, 500 38 Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>4</sup> Department of Radiation Biology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

Received 20<sup>th</sup> August 2012.

Revised 27<sup>th</sup> August 2012.

Published 7<sup>th</sup> September 2012.

### Summary

**Purpose:** The purpose of our study is to examine the effect of acetyl-L-carnitine (ALC) pretreatment on radiation pneumonitis and L-arginine-nitric oxide (NO) metabolic pathway after local chest irradiation.

**Materials and methods:** Female Wistar rats were pretreated with either phosphate buffer saline or ALC and locally irradiated by a dose of 15 Gy onto the chest. Samples were collected 7 weeks after irradiation. Exhaled NO was monitored using chemiluminescence method. In plasma and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>) and malondialdehyde were measured by high-performance liquid chromatography. Total protein concentration was assayed colorimetrically. In lungs, inducible and endothelial nitric oxide synthase (iNOS, eNOS), arginase (Arg) I and II, cationic amino acid transporter (CAT) 1, 2 and 3 relative mRNA expression were measured by RT-PCR. Expression of Arg I and II was also evaluated by Western blot. Histochemical analysis was used to measure air/tissue ratio and neutrophil infiltration.

**Results:** ALC pretreatment increased survival rate of irradiated rats. It also decreased NO<sub>x</sub> concentration in BAL, while in lungs, we observed increased air/tissue ratio, reduced neutrophil infiltration, decreased CAT 1 and CAT 3 mRNA expression, and reduced Arg I and Arg II expression.

**Conclusions:** ALC pretreatment improves clinical prognosis and seems to reduce intensity of post-radiation changes on a molecular and microscopic level.

*Key words:* ionising radiation; acetyl-L-carnitine; NO, NO synthase; arginase; cationic amino acid transporter; lung

✉ University of Defence, Faculty of Military Health Sciences, Department of Radiation Biology, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, Czech Republic

✉ sinkorova@pmfhk.cz

☎ +420 973253219

☎ +420 495513018

### ABBREVIATIONS

ALC – acetyl-L-carnitine; Arg – arginase; BAL – bronchoalveolar lavage; CAT – cationic amino acid transporter; eNOS – endothelial nitric oxide synthase; iNOS – inducible nitric oxide synthase; NO – nitric oxide; RP – radiation pneumonitis; SPF – specific pathogen free

## INTRODUCTION

Radiation pneumonitis (RP) is one of the major dose-limiting complications during radiotherapy to the thoracic region. RP is an acute inflammatory reaction that is characterized by alveolar cell depletion, interstitial oedema and inflammatory cell accumulation and develops within weeks after irradiation. It occurs in 5-15% of patients treated with thoracic radiotherapy, especially in children or when a more aggressive approach such as combined chemoradiotherapy is used [1 - 4].

Measurement of exhaled nitric oxide (NO) is a noninvasive method used to predict onset of radiation pneumonitis in irradiated patients and generally, a method used to assess inflammatory status and response to therapy in many acute and chronic lung diseases [5 - 8]. NO is a small gas molecule with many various biological functions [9]. The synthesis of NO is carried out from L-arginine by nitric oxide synthases. In lungs, NO is constitutively produced by endothelial nitric oxide synthase (eNOS), but when exposed to proinflammatory cytokines or lipopolysaccharide, the NO production rises via inducible nitric oxide synthase (iNOS) in epithelial and inflammatory cells [10 - 12]. One of the factors that might affect NO synthesis is L-arginine cellular uptake, which is regulated by cationic amino acid transporter (CAT) [13]. So far, three members of the CAT family participating in L-arginine cellular uptake have been identified, CAT 1, 2 and 3 [14]. CAT 1 is constitutively expressed, while CAT 2 is the inducible transporter and its expression is upregulated in macrophages upon immune activation [15, 16]. The importance of CAT 3 remains unknown [14, 17]. Other factors that may limit NO synthesis are arginases. There are two isoforms of arginases in mammalian cells: arginase I (Arg I) is a cytosolic enzyme abundant in liver, and arginase II (Arg II) is a mitochondrial enzyme with widespread tissue distribution [18]. Arginases compete for L-arginine substrate by metabolizing it to L-ornithine within the urea cycle and this competition seems to help regulate the inflammatory process [19 - 22].

The aim of our work is to evaluate the effect of acetyl-L-carnitine (ALC, 3-hydroxy-4-trimethylammoniumbutyric acid) pretreatment on radiation pneumonitis and L-arginine-NO metabolic pathway 7 weeks after local chest irradiation. Exhaled NO is evaluated in the context of nitrite/nitrate, malondialdehyde and total protein concentration measurements in plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and expression of genes and proteins participating in NO production in lungs.

## MATERIAL AND METHODS

### *Animals*

Specific pathogen free 12-16 month old female Wistar rats weighing 165-272g (Velaz Ltd, Prague, Czech Republic) were used during the experiments. Animals were fed with standard feed ST-1 (Velaz Ltd, Prague, Czech Republic) and water *ad libitum*. The rats were kept in an air-controlled room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $50 \pm 10\%$  relative humidity) with a 12hour light/dark cycle with light from 7:00 to 19:00 h. All procedures were approved by the Ethical Committee of the Faculty of Military Health Sciences Hradec Kralove (Czech Republic).

### *Pretreatment*

The animals were divided into 2 groups of 10 animals: a control group administered with phosphate buffer saline (PBS, Sigma Aldrich, Prague, Czech Republic), and a group administered with acetyl-L-carnitine (ALC, Sigma Aldrich). ALC was dissolved in PBS and intraperitoneally (i.p.) administered 5 days before irradiation at 5 single doses of 250 mg/kg ( $5 \times 250$  mg/kg). The last dose was applied 1 hour before irradiation.

### *Irradiation*

The animals were irradiated using a  $^{60}\text{Co}$  unit (Chirana, Prague, Czech Republic) at a dose rate of  $2.61 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$  with a target distance of 0.5 m. Dosimetry was performed using an ionization chamber (Dosemeter PTW Unidos 1001, Serial No. 11057, with ionization chamber PTW TM 313, Serial No. 0012; RPD Inc., Albertville, MN, USA). Before irradiation, the rats were analgesedated with ketamine (5%, 40 mg/kg) and xylazine (2%, 4.8 mg/kg) (both BIOVETA, Ivanovice na Hane, Czech Republic). Under analgesedation, the animals were fastened onto a Plexiglas underlay (VLA JEP, Hradec Kralove, Czech Republic) to assure consistent unilateral back-front exposure onto the chest with the rest of the body shielded with lead. The chest was irradiated with a single dose of 15 Gy (1 animal was irradiated each time).

### *Sample collection*

At the end, 7 weeks after irradiation, animals were i.p. anaesthetized with sodium pentobarbital sodium salt at a dose of 50 mg/kg (Sigma Aldrich). Blood was collected into the 9-mL S-monovette



K3EDTA (Sarstedt Ltd, Prague, Czech Republic) from abdominal aorta. The whole blood was centrifuged (2000 g force, 10 min, 4°C; Rotina 46R Hettich zentrifugen, Hettich Laborapparate AG, Bäch, Germany) and plasma was stored in -80°C for further analysis. After exsanguination, bronchoalveolar lavage fluid (BAL) was obtained by instilling 10 ml of 0.9% saline solution (Sigma Aldrich) through the tracheostomy. BAL was centrifuged (2000 g force, 10 min, 4°C; Rotina 46R Hettich zentrifugen) and supernatant was stored in -80°C for further analysis. Finally, lungs were removed; left lungs were immediately frozen in liquid nitrogen (Linde gas Ltd., Prague, Czech Republic) and stored in -80°C for western blot analysis and RT-PCR. Right lungs were carefully fixed with 10% neutral buffered formalin (Chemapol, Prague, Czech Republic) for histological analysis.

#### *Measurement of exhaled nitric oxide (eNO)*

Before the final sample collection, exhaled nitric oxide (eNO) was measured using a chemiluminescence analyzer (CLD 88, EcoMedics, Deutern, Switzerland) with a sensitivity of 0.1–5000 ppb. The method is a procedure described for mice by Ahmad et al. with minor modifications [23]. Briefly, rats were individually put into a sealed plastic box with a volume of 3 L (P-Lab, Prague, Czech Republic). The box was ventilated for approximately 3 min with NO-free air from the Denox module of the analyzer. Thereafter, air from the box was sampled to confirm zero baseline. The box was tightly closed and after 10 min, air was sucked from the box into the analyzer at a rate of 330 ml/min being replaced by NO-free air from the Denox and an initial stable concentration of eNO was recorded.

#### *Measurements of nitrate/nitrite concentration in plasma and BAL*

The sum nitrate and nitrite concentration (NO<sub>x</sub>), an indicator of NO concentration, was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection (Agilent, Santa Clara, CA, USA) as described by Woitzik et al. [24]. The method is based on enzymatic reduction of nitrates by nitrate reductase (from *Aspergillus niger*; Sigma Aldrich) and on the determination of nitrites after derivatization with 2,3-diaminonaphthalene (Sigma Aldrich).

#### *Measurements of malondialdehyde (MDA) concentration in plasma and BAL*

The concentration of malondialdehyde, an indicator of oxidative stress in organism, was measured using a non-enzymatic method by Pilz et al. [25]. In brief, plasma or BAL samples were mixed with 6 M sodium hydroxide (Sigma Aldrich) for alkaline hydrolysis (60°C, 30min). Subsequently, perchloric acid (Sigma Aldrich) was added for deproteinization. After centrifugation (15000 g force, 10 min, 4°C, thermo scientific IEC CL31R Multispeed Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), the supernatant was mixed with 2,4 dinitrophenylhydrazine (Sigma Aldrich) to form hydrazine, which was analyzed using HPLC system with ultraviolet detection (Agilent).

#### *Measurements of total protein concentration in plasma and BAL*

Total protein concentration in plasma and BAL was measured colorimetrically using BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) in 96-well microplate (40 µL sample/180 µL BCA working reagent, 37°C/30 min incubation, and 570 nm). The standards were prepared from a stock solution of BSA (Sigma Aldrich).

#### *Measurement of iNOS, eNOS, Arg I, Arg II, CAT I, CAT 2, and CAT 3 expression using RT-PCR method*

Frozen lung tissue was homogenized using the homogenizer MagNA Lyser (Roche) in RLT buffer (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendations. The total RNA was isolated from lung tissue using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) as per the manufacturer's instructions. Concentration and purity of isolated RNA was measured by spectrophotometer NanoDrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). RNA was reversely transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA). The reaction was carried out at 25°C for 10 min, at 32°C for 120 min, at 85°C for 5 s and terminated at 4°C (2720 Thermal Cycler; Life Technologies Corporation). For the quantitative analysis, we used 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies Corporation). Primers and probes for target genes (Table I) labeled with the reporter dye molecule FAM were synthesized by Applied Biosystems (Life Technologies Corporation).

**Table I:** Target genes.

target genes	gene symbol	gene name	assay ID
iNOS	Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible	Rn00561646_m1
eNOS	Nos3	nitric oxide synthase 3, endothelial cell	Rn02132634_s1
ARG I	ArgI	arginase, liver	Rn00567522_m1
ARG II	ArgII	arginase type II	Rn00569814_m1
CAT 1	Slc7a1	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	Rn00565399_m1
CAT 2	Slc7a2	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2	Rn01488325_m1
CAT 3	Slc7a3	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 3	Rn00500256_m1
GAPDH	Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Rn01775763_g1

Every PCR contained 2X TaqMan Universal PCR Master Mix, 20X TaqMan Assay Mix (Life Technologies Corporation), and 30 ng of cDNA template and was conducted according to this amplification protocol: 1 cycle for initial denaturation (3 min, 95°C), followed by 50 amplification cycles of denaturation (10 s, 95°C), annealing and extension (10 s, 60°C). Housekeeping RT-PCR was performed to determine the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Life Technologies Corporation). The relative expression ratio was then calculated from the  $\Delta Ct_{\text{target}}$  and  $\Delta Ct_{\text{housekeeping}}$  values as described previously [26](Fuksa et al. 2010).

#### *Western Blot analysis of Arg I and Arg II expression in lung tissue*

Frozen lungs were homogenized with homogenizer Ultra Turrax (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany) in 5 volume of cold homogenization buffer [50 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1.5  $\mu$ M Aprotinin, 14.5  $\mu$ M Pepstatin A (all Sigma Aldrich) and 23.4  $\mu$ M Leupeptin (Serva, Heidelberg, Germany)]. Supernatant was collected after centrifugation (1000 g force, 10 min, 4°C; Rotina 46R Hettich zentrifugen) and ultracentrifugation (19000 g force, 30 min, 4°C; Sorvall centrifuges Discovery M120Se Hitachi). Total protein concentration in the supernatant was determined using BCA protein assay kit (Pierce). Pooled samples were prepared from tissue homogenates of all animals in the respective groups using the volumes of the supernatants containing the same amount of total protein. Proteins were separated by 12% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis using 30  $\mu$ g of protein per sample. Resultant proteins were electroblotted onto polyvinylidenedifluoride membranes (Bio-Rad

Laboratories, Prague, Czech Republic). After blotting, membranes were incubated for 1 h at room temperature in blocking solution [5% nonfat dry milk (Bio-Rad Laboratories) added to 0.05% Tween 20 in tris-(hydroxymethyl)aminomethane-buffered saline (TBS/T, both Sigma Aldrich)]. After blocking, the membranes were washed three times in 0.05% TBS/T and incubated overnight (4°C) with primary antibodies: mouse monoclonal anti-Arg I antibody (1:1000, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA), rabbit polyclonal anti-Arg II antibody (1:500, H-64, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin antibody (1:20000, Sigma Aldrich). Subsequently, the membranes were washed three times in 0.05% TBS/T and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies at room temperature for 1 h: goat polyclonal anti-mouse antibody (1:25000; Dako, Glostrup, Denmark) was used for Arg I and  $\beta$ -actin primary antibodies and swine polyclonal anti-rabbit antibody (1:2000; Dako, Denmark A/S, Denmark) was used for Arg II primary antibody. The blots were washed three times with TBS buffer and developed with enhanced electrochemiluminescence (Roche, Prague, Czech Republic).

#### *Histological examination of lung tissue*

After formalin fixation, lung samples were embedded into paraffin (Paramix, Holic, Czech Republic). Tissue sections 5  $\mu$ m thick were cut (Microtome model SM2000 R, Leica, Heidelberg, Germany) and stained with haematoxylin-eosin (both Merck, Prague, Czech Republic) for the air/tissue ratio measurement and with Naphthol AS-D Chloroacetate (Specific Esterase) Kit (Sigma Aldrich) to detect neutrophil granulocytes. The air/tissue ratio and neutrophil granulocytes were measured in 15 randomly selected viewing

fields per sample at 400-fold magnification using a BX-51 microscope (Olympus, Prague, Czech Republic) and ImagePro 5.1 computer image analysis system (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

#### Statistical analysis

The Mann-Whitney (SigmaStat 3.1, Systat Software Inc., Erkhart, Germany) test was used for the statistical analysis giving mean  $\pm 2 \times$  SE (standard error of mean). Mortality rates were estimated by the Kaplan-Meier method and

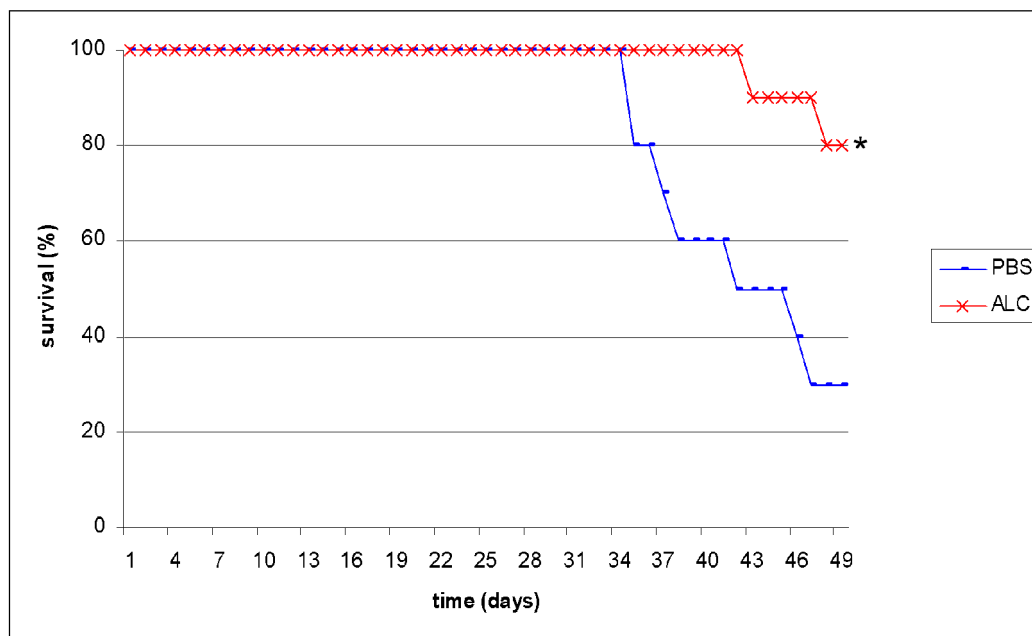
compared by a log-rank test (SigmaStat 3.1). The differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

#### Survival

Our results show significantly increased survival rate in ALC treated group (80%,  $p \leq 0.05$ ) when compared with PBS pretreated animals (30%). (Figure 1)

**Figure 1.** Animal survival



Significant differences between control and ALC groups: \*  $p \leq 0.05$ .

#### Effect of ALC pretreatment on NO concentration in exhaled air (eNO)

In comparison with control animals, we did not observe any significant effect of ALC pretreatment on eNO concentration 7 weeks after local chest irradiation. (Table 1)

**Table 1.** Average values of eNO concentration  $\pm 2 \times$  SE.

	PBS (control)	ALC
eNO, parts per billion	$0.64 \pm 0.26$	$0.64 \pm 0.12$

#### Effect of ALC pretreatment on nitrate/nitrite, malondialdehyde and total protein concentration in plasma and BAL

When compared with control values, we measured significantly decreased nitrate/nitrite concentration in BAL of ALC pretreated rats. Nitrate/nitrite concentration decreased by 22% ( $p \leq 0.05$ ). On the other hand, ALC pretreatment did not show any significant effect on nitrate/nitrite concentration in plasma and malondialdehyde and total protein concentration in both plasma and BAL 7 weeks after local chest irradiation by a dose of 15 Gy. (Table 2)

**Table 2.** Average values of nitrate/nitrite (NO<sub>x</sub>), malondialdehyde (MDA) and total protein concentrations (TP) in plasma and BAL  $\pm 2 \times$  SE.

	PBS (control)	ALC
Plasma		
NO <sub>x</sub> , $\mu$ mol/L	21.2 $\pm$ 27.4	17.7 $\pm$ 11.1
MDA, $\mu$ mol/L	1.84 $\pm$ 0.20	2.03 $\pm$ 0.22
TP, g/L	64.0 $\pm$ 0.92	59.2 $\pm$ 3.30
BAL		
NO <sub>x</sub> , $\mu$ mol/L	6.29 $\pm$ 0.24	4.88 $\pm$ 0.21 *
MDA, nmol/L	236 $\pm$ 85	408 $\pm$ 151
TP, mg/L	490 $\pm$ 550	1090 $\pm$ 520

Significant differences between control and ALC groups:  
\*  $p \leq 0.05$ .

*Effect of ALC pretreatment on iNOS, eNOS, Arg I, Arg II, CAT 1, CAT 2, and CAT 3 mRNA expressions in lungs*

Our results indicate significantly decreased CAT 1 and CAT 3 mRNA expression in pretreated animals with values being decreased by 41% ( $p \leq 0.05$ ) and 47% ( $p \leq 0.05$ ), respectively. Expressions of iNOS, eNOS, Arg I, Arg II, and CAT 2 in ALC pretreated group were not significantly changed. (Table 3)

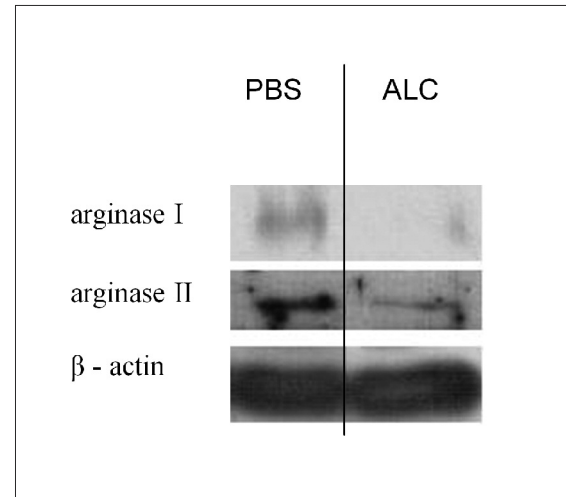
**Table 3.** Average values of iNOS, eNOS, arginase I and II and cationic amino acid transporter (CAT) 1, 2 and 3 relative mRNA expression in lungs  $\pm 2 \times$  SE.

	Relative mRNA expression, %	
	PBS (control)	ALC
iNOS	100 $\pm$ 80	138 $\pm$ 111
eNOS	100 $\pm$ 26	99 $\pm$ 46
Arginase I	100 $\pm$ 105	57 $\pm$ 16
Arginase II	100 $\pm$ 22	86 $\pm$ 51
CAT 1	100 $\pm$ 31	59 $\pm$ 13 *
CAT 2	100 $\pm$ 23	64 $\pm$ 27
CAT 3	100 $\pm$ 20	53 $\pm$ 23 *

Significant differences between control and ALC groups:  
\*  $p \leq 0.05$ .

*Effect of ALC on Arg I and Arg II protein expression in lungs*

In the Western blotting experiments, we detected decreased both Arg I and Arg II protein expression in ALC pretreated group. (Figure 2)

**Figure 2.** Results of western blot analysis of arginase I and II expression in lung tissue.

*Effect of ALC on neutrophil infiltration and air/tissue ratio*

When compared with PBS treated animals, we observed a significantly higher air/tissue ratio and a reduced number of neutrophil granulocytes in rat lungs in ALC pretreated group. (Table 4)

**Table 4.** Average values of neutrophil infiltration and air/tissue ratio in lungs  $\pm 2 \times$  SE per microscopic field.

	PBS (control)	ALC
Air/tissue ratio, %	63 $\pm$ 2	67 $\pm$ 2 *
Number of neutrophils	21 $\pm$ 3	12 $\pm$ 1 *

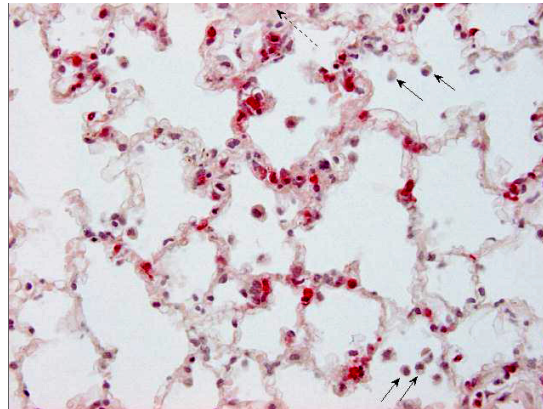
Significant differences between control and ALC groups:  
\*  $p \leq 0.001$ .

## DISCUSSION

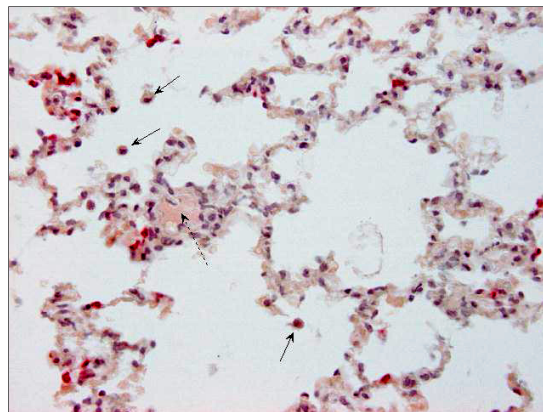
ALC is a small water-soluble molecule, which facilitates the transfer of long-chain fatty acids into the mitochondria and is crucial for mitochondrial energy production [27, 28]. It also stimulates acetylcholine production, protein and phospholipid

synthesis, and has been shown to have an anti-oxidative effect [27]. ALC protects cells from oxidative damage by a few different mechanisms, including stabilization of mitochondrial function, stabilization of superoxide dismutase activity and damaged cell membranes, reduction of reactive oxygen species formation produced by the xanthine/xanthine oxidase system, and

enhancement of capacity of non-enzymatic antioxidants [29 - 32]. In lungs, ALC pretreatment decrease oxidative stress early after irradiation [33], which, according to our results, seems to improve clinical prognosis 7 weeks after irradiation and seems to reduce the intensity of post-radiation changes during an initial phase of radiation pneumonitis on a microscopic level (Fig 3, 4).



**Figure 3.** Sample of rat lungs irradiated by 15 Gy and collected 7 weeks after irradiation. Red colour (chloroacetate esterase positivity) indicates neutrophil granulocytes. In the microphotograph, unspecific signs of radiation damage can be observed, including neutrophil granulocyte infiltration, pneumocyte desquamation (solid arrow), and fluid exudation (dashed arrow).



**Figure 4.** Sample of rat lungs pretreated with acetyl-L-carnitine, irradiated by 15 Gy, and collected 7 weeks after irradiation. Unspecific signs of radiation damage [neutrophil granulocyte infiltration, pneumocyte desquamation (solid arrow), and fluid exudation (dashed arrow)] can be still observed, nevertheless, the amount of neutrophil granulocytes decreased.

In humans, radiation pneumonitis has been associated with increased exhalation of NO [7]. Moreover, the elevation of eNO on the last day of radiotherapy predicts subsequent symptomatic radiation pneumonitis weeks to months after treatment [7]. The SPF Wistar rat model appears to

be different. Zhang et al. did not find any significant change of iNOS expression in SPF Wistar rats 2 - 24 weeks after local chest irradiation by 12 Gy [34]. This correlates with our unpublished data showing no significant change of eNO concentration 1 - 7 weeks after local chest irradiation by 15 Gy. It seems

that local high-dose irradiation onto the chest does not affect iNOS expression and eNO concentration in SPF Wistar rats during the initial phase of radiation pneumonitis. It may, therefore, be the reason why we did not measure any effect of ALC pretreatment on both parameters. Interestingly, we found decreased nitrate/nitrite concentration in BAL of ALC pretreated animals. Since the expression of both nitric oxide synthases and NO production were not changed, the mechanisms/reason reducing nitrate/nitrite concentration in BAL of ALC pretreated rats remains uncertain. Possibly, it could be related to the different intensity of acute inflammatory reaction observed between the two groups – a higher air/tissue ratio in ALC treated group might indicate a lower volume of fluid exudation into lung alveoli and consequently, a lower amount of nitrates and nitrites collected into BAL.

In comparison to uninfluenced NO production in SPF rats, ionizing radiation affects other molecules participating in arginine-NO metabolism. Zhang et al. measured increased Arg I protein expression 1 – 24 weeks after irradiation [34]. And although we have not found any relevant information on the relation between ionizing radiation and Arg II, CAT 1, 2, or 3 expression in SPF rats, for instance, Arg II is strongly induced during experimental asthma and ovalbumin-induced airway inflammation in mice [35, 36]. Moreover, according to our unpublished data, local chest irradiation by a dose of 20 Gy increases CAT 1 and 3 expressions 2.1- and 7.4-fold, respectively. This indicates that increased both arginase protein expression and CAT 1 and 3 mRNA expression in irradiated lungs could be considered as molecular signs during the initial phase of radiation pneumonitis. Consistently with this assumption, decreased Arg I and II protein expression and CAT 1 and 3 mRNA expression in ALC pretreated group could be related to lower intensity of inflammatory reaction observed on a microscopic level.

## CONCLUSION

This study shows that after high-dose local chest irradiation, ALC pretreatment significantly improves clinical prognosis and seems to reduce intensity of post-radiation changes on a molecular and microscopic level. With respect to its high tolerance, low toxicity and possible oral administration [26, 32], ALC supplementation may significantly contribute to force protection in radiation risk situations.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Ministry of Defence of the Czech Republic by the grant FVZ UO – MŠMT SV, č. 907010030281, the grant „Health Problems of Weapons of Mass Destruction, and the grant SVV–2012-264901.

## DECLARATION OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## REFERENCE

1. Osterreicher, J.; Pejchal, J.; Skopek, J.; Mokřý, J.; Vilasová, Z.; Psutka, J.; Vávrová, J.; Mazurová, Y. Role of type II pneumocytes in pathogenesis of radiation pneumonitis: dose response of radiation-induced lung changes in the transient high vascular permeability period. *Exp Toxicol Pathol.* **2004**, 56, 181-187.
2. Rancati, T.; Ceresoli, G.L.; Gagliardi, G.; Schipani, S.; Cattaneo, G.M. Factors predicting radiation pneumonitis in lung cancer patients: a retrospective study. *Radiother Oncol.* **2003**, 67, 275-283.
3. Shi, H.S.; Gao, X.; Li, D.; Zhang, Q.W.; Wang, Y.S.; Zheng, Y.; Cai, L.L.; Zhong, R.M.; Rui, A.; Li, Z.Y.; Zheng, H.; Chen, X.C.; Chen, L.J. A systemic administration of liposomal curcumin inhibits radiation pneumonitis and sensitizes lung carcinoma to radiation. *Int J Nanomedicine.* **2012**, 7, 2601-2611.
4. Yu, T.K.; Whitman, G.J.; Thames, H.D.; Buzdar, A.U.; Strom, E.A.; Perkins, G.H.; Schechter, N.R.; McNeese, M.D.; Kau, S.W.; Thomas, E.S.; Hortobagyi, G.N.; Buchholz, T.A. Clinically relevant pneumonitis after sequential paclitaxel-based chemotherapy and radiotherapy in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* **2004**, 96, 1676-1681.
5. Gustafsson, L.E.; Leone, A.M.; Persson, M.G.; Wiklund, N.P.; Moncada, S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea-pigs and humans. *Biochem Biophys Res Commun.* **1991**, 181, 852-857.
6. Kharitonov, S.A.; Barnes, P.J. Exhaled biomarkers. *Chest.* **2006**, 130, 1541-1546.

7. McCurdy, M.R.; Wazni, M.W.; Martinez, J.; McAleer, M.F.; Guerrero, T. Exhaled nitric oxide predicts radiation pneumonitis in esophageal and lung cancer patients receiving thoracic radiation. *Radiother Oncol.* **2011**, *101*, 443-448.
8. Taylor, D.R.; Smith, A.D.; Cowan, J.O.; Brassett, K.P.; Herbison, G.P. Use of exhaled nitric oxide measurements to guide treatment in chronic asthma. *N Engl J Med.* **2005**, *352*, 2163-2173.
9. Nakagawa, H.; Ikota, N.; Ozawa, T.; Kotake, Y. Dose- and time-dependence of radiation-induced nitric oxide formation in mice as quantified with electron paramagnetic resonance. *Nitric Oxide.* **2001**, *5*, 47-52.
10. Babicova, A.; Havlinova, Z.; Pejchal, J.; Tichy, A.; Rezacova, M.; Vavrova, J.; Chladek, J. Early changes in L-arginine-nitric oxide metabolic pathways in response to the whole-body gamma irradiation of rats. *Int J Radiat Biol.* **2011**, *87*, 1067-1073.
11. Everett, A.D.; Le Cras, T.D.; Xue, C.; Johns, R.A. eNOS expression is not altered in pulmonary vascular remodeling due to increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol.* **1998**, *274*, 1058-1065.
12. Watkins, D.N.; Peroni, D.J.; Basclain, K.A.; Garlepp, M.J.; Thompson, P.J. Expression and activity of nitric oxide synthases in human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **1997**, *16*, 629-639.
13. Closs, E.I.; Mann, G.E. Membrane transport of L-arginine and cationic amino acid analogs. In Ignarro, L.J. (ed.): *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, Acad. Press, San Diego, **2000**, p 225-241.
14. Verrey, F.; Closs, E.I.; Wagner, C.A.; Palacin, M.; Endou, H.; Kanai, Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch.* **2004**, *447*, 532-542.
15. Nicholson, B.; Manner, C.K.; Kleeman, J.; MacLeod, C.L. Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *J Biol Chem.* **2001**, *276*, 15881-15885.
16. Martín, L.; Comalada, M.; Martí, L.; Closs, E.I.; MacLeod, C.L.; Martín del Río, R.; Zorzano, A.; Modolell, M.; Celada, A.; Palacín, M.; Bertran, J. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases L-arginine transport through the induction of CAT2 in bone marrow-derived macrophages. *Am J Physiol Cell Physiol.* **2006**, *290*, 1364-1372.
17. Closs, E.I.; Simon, A.; Vékony, N.; Rotmann, A. Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr.* **2004**, *134*, 2752S-2759.
18. Lewis, N.D.; Asim, M.; Barry, D.P.; Singh, K.; de Sablet, T.; Boucher, J.L.; Gobert, A.P.; Chaturvedi, R.; Wilson, K.T. Arginase II restricts host defense to *Helicobacter pylori* by attenuating inducible nitric oxide synthase translation in macrophages. *J Immunol.* **2010**, *184*, 2572-2582.
19. Boucher, J.L.; Moali, C.; Tenu, J.P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci.* **1999**, *55*, 1015-1028.
20. Efron, D.T.; Barbul, A. Modulation of inflammation and immunity by arginine supplements. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* **1998**, *1*, 531-538.
21. Mori, M.; Gotoh, T. Relationship between arginase activity and nitric oxide production. In Ignarro, L.J. (ed.): *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, Acad. Press, San Diego, **2000**, p 199-208.
22. Maarsingh, H.; Pera, T.; Meurs, H. Arginase and pulmonary diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **2008**, *378*, 171-184.
23. Ahmad, T.; Mabalirajan, U.; Joseph, D.A.; Makhija, L.; Singh, V.P.; Ghosh, B.; Agrawal, A. Exhaled nitric oxide estimation by a simple and efficient noninvasive technique and its utility as a marker of airway inflammation in mice. *J Appl Physiol.* **2009**, *107*, 295-301.
24. Woitzik, J.; Abromeit, N.; Schaefer F. Measurement of nitric oxide metabolites in brain microdialysates by a sensitive fluorometric high-performance liquid chromatography assay. *Anal Biochem.* **2001**, *289*, 10-17.
25. Pilz, J.; Meineke, I.; Gleiter, C.H. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4 dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **2000**, *742*, 315-325.
26. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 45.
27. No authors listed. Acetyl-L-carnitine. *Altern Med Rev.* **1999**, *4*, 438-441.
28. Swamy-Mruthinti, S.; Carter, A.L. Acetyl-L-carnitine decreases glycation of lens proteins: in vitro studies. *Exp Eye Res.* **1999**, *69*, 109-115.
29. Haorah, J.; Floreani, N.A.; Knipe, B.; Persidsky, Y. Stabilization of superoxide dismutase by acetyl-L-carnitine in human brain endothelium during alcohol exposure: novel protective approach. *Free Radic Biol Med.* **2011**, *51*, 1601-1609.
30. Di Giacomo, C.; Latteri, F.; Fichera, C.; Sorrenti, V.; Campisi, A.; Castorina, C.; Russo, A.; Pinturo, R.; Vanella, A. Effect of acetyl-L-carnitine on lipid peroxidation and xanthine oxidase activity in rat skeletal muscle. *Neurochem Res.* **1993**, *18*, 1157-1162.

31. Arockia Rani, P.J.; Panneerselvam, C. Carnitine as a free radical scavenger in aging. *Exp Gerontol.* **2001**, *36*, 1713-1726.
32. Esposti, D.; Mariani, M.; Demartini, G.; Lucini, V.; Fraschini, F., Mancina, M. Modulation of melatonin secretion by acetyl-L-carnitine in adult and old rats. *J Pineal Res.* **1994**, *17*, 132-136.
33. Mansour; H.H. Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. *Pharmacol Res.* **2006**, *54*, 165-171.
34. Zhang, H.; Han, G.; Liu, H.; Chen, J.; Ji, X.; Zhou, F.; Zhou, Y.; Xie, C. The development of classically and alternatively activated macrophages has different effects on the varied stages of radiation-induced pulmonary injury in mice. *J Radiat Res.* **2011**, *52*, 717-726.
35. Kenyon, N.J.; Bratt, J.M.; Linderholm, A.L.; Last, M.S.; Last, J.A. Arginases I and II in lungs of ovalbumin-sensitized mice exposed to ovalbumin: sources and consequences. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2008**, *230*, 269-275.
36. Zimmermann, N.; Rothenberg, M.E. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *Eur J Pharmacol.* **2006**, *533*, 253-262.