

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



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

Andrea Nagy

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: *Lékařská chemie a biochemie*

Hradec Králové

2013

Disertační práce byla vypracována v rámci prezenčního a kombinovaného studia doktorského studijního programu Lékařská chemie a biochemie na Ústavu lékařské biochemie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Andrea Nagy (roz. Babicová)
Ústav lékařské chemie
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze

Školitel: doc. Ing. Jaroslav Chládek, Ph.D.
Ústav farmakologie
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Univerzita Karlova v Praze

Oponenti: doc. MUDr. Michal Hofer, CSc.
BFÚ AV ČR
Královopolská 135
61200 Brno

prof. RNDr. Rudolf Štětina, CSc
Katedra toxikologie, FVZ UO HK
Třebešská 1575
50001 Hradec Králové

Obhajoba disertační práce se uskuteční před komisí pro obhajoby disertačních prací DSP Lékařské chemie a biochemie dne 18. 6. 2013 v 12:30 v Zasedací místnosti děkanátu LF (1. patro), Šimkova 870, Hradec Králové.

Tato práce vznikla za podpory grantu MO OVUOFVZ2008, výzkumným záměrem MŠMT 0021620820, vnitřním grantem Roche Lékařské fakulty v Hradci Králové a granty SVV-2011-262901 a SVV-2012- 264901.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

doc. MUDr. Jaroslav Cerman, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Lékařská chemie a biochemie

1 OBSAH

1	OBSAH	4
2	SOUHRN.....	6
3	SUMMARY	7
4	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	8
4.1	Ionizující gama záření, radiační pneumonitida a fibróza	8
4.2	Radioprotekce	9
4.3	Bioindikátory zánětu, oxidačního a nitračního stresu po celotělovém či lokálním ozáření	10
4.3.1	<i>Produkty lipoperoxidace</i>	10
4.3.2	<i>Oxid dusnatý</i>	10
4.3.3	<i>Arginin.....</i>	11
4.4	Experimentální zvířata.....	11
5	CÍL VÝZKUMNÉ PRÁCE	12
6	MATERIÁL A METODIKA	12
6.1	Zvířata	12
6.2	Zdroj záření.....	12
6.3	Ukončení experimentu	12
6.4	Vydechovaný oxid dusnatý.....	12
6.5	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	13
6.5.1	<i>Malondialdehyd</i>	13
6.5.2	<i>Koncentrace dusičnanů/dusitanů (NOx)</i>	13
6.6	RT-PCR	13
6.7	Western blot.....	13
6.8	Histologické vyšetření.....	14
6.9	Statistická analýza.....	14
7	VÝSLEDKY.....	14
7.1	Celotělové ozáření.....	14
7.1.1	<i>Porovnání změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu vyvolaných ionizujícím zářením s účinky bakteriálního LPS u potkana kmene Wistar</i>	14
7.1.2	<i>Sledování vlivu vybraných radioprotektivních látek na potkana po celotělovém ozáření.... Chyba! Záložka není definována.</i>	
7.2	Lokální ozáření.....	17
7.2.1	<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>	17
7.2.2	<i>Sledování radioprotektivního účinku studovaných látek ve fázi radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku potkana kmene Wistar.....</i>	19
8	DISKUZE	20
8.1	Celotělové ozáření.....	20
8.1.1	<i>Porovnání změn v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý a nitračního stresu vyvolaných ionizujícím zářením s účinky bakteriálního LPS u potkana kmene Wistar</i>	20
8.1.2	<i>Sledování ochranného vlivu vybraných radioprotektivních látek proti následkům celotělového ozáření potkana Wistar</i>	21
8.2	Lokální ozáření.....	22
8.2.1	<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>	22
8.2.2	<i>Sledování radioprotektivního účinku studovaných látek ve fázi radiační pneumonitidy po lokálním ozáření hrudníku potkana kmene Wistar.....</i>	22
9	ZÁVĚR	23
10	POUŽITÁ LITERATURA	25
11	PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI	30
11.1	Původní práce publikované v odborných časopisech	30
11.2	Posterová sdělení	30
11.3	Odborné přednášky	30

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AG	<u>A</u> minoguanidine
ADMA	<u>a</u> symetrický <u>d</u> imethylarginin
ALC	acetyl-L-karnitin (<u>a</u> cetyl – <u>L</u> – <u>c</u> arnitine)
ARDS	syndrom akutní respirační tísně (<u>a</u> cute <u>r</u> espiratory <u>d</u> istress <u>s</u> yndrom)
BAL	tekutina z <u>b</u> roncho <u>a</u> lveolární <u>l</u> aváže
CAT	transportér pro kationické aminokyseliny (<u>c</u> ationic <u>a</u> mino acid <u>t</u> ransporter)
DRF	redukční faktor dávky (<u>d</u> ose <u>r</u> eduction <u>f</u> actor)
DSB	dvojláčkové zlomy DNA (<u>d</u> ouble- <u>s</u> trand <u>b</u> reaks)
eNOS	<u>e</u> ndoteliální <u>N</u> OS
HPLC	vysokotlaká/vysokoučinná kapalinová chromatografie (<u>h</u> igh <u>p</u> ressure/ <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
IL	<u>I</u> nterleukin
iNOS	<u>i</u> nducibilní <u>N</u> OS, NOS II (<u>i</u> nducible <u>n</u> itric <u>o</u> xide <u>s</u> ynthase)
LD	<u>l</u> etální <u>d</u> ávka
LD50	střední letální dávka
L-NAME	metylester nitro- L-argininu (NG - <u>L</u> - <u>a</u> rginin <u>m</u> ethylester)
L-NMMA	L- monomethylarginin (NG-monomethyl L-arginine)
LPS	<u>L</u> ipopolysacharid
MDA	<u>M</u> alondialdehyd
mRNA	<u>m</u> ediátorová <u>R</u> NA
mtNOS	<u>m</u> itochondriální <u>N</u> OS
NADPH, NADP⁺	kofaktor nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
nNOS	<u>n</u> euronální <u>N</u> OS
NOHA	<u>N</u> omega <u>h</u> ydroxy-L- <u>a</u> rginin
NO	oxid dusnatý (<u>n</u> itric <u>o</u> xide)
NOS	syntáza oxidu dusnatého (<u>n</u> itric <u>o</u> xide <u>s</u> ynthase)
PBS	pufrovaný fyziologický roztok (<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PPB	počet částic na bilion (<u>p</u> arts <u>p</u> er <u>b</u> illion)
PRMT	<u>p</u> rotein-arginin <u>m</u> etyl <u>t</u> ransferáza
RF	<u>r</u> adiační <u>f</u> ibróza
RNS	reaktivní formy dusíku (<u>r</u> eactive <u>n</u> itrogen <u>s</u> pecies)
ROS	reaktivní formy kyslíku (<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies)
RP	<u>r</u> adiační <u>p</u> neumonitida
RT-PCR	PCR v reálném čase (<u>R</u> eal <u>T</u> ime <u>P</u> CR)
SSB	jednovláčkové zlomy DNA (<u>s</u> ingle- <u>s</u> trand <u>b</u> reaks)
TGF-β	transformující růstový faktor β (<u>t</u> ransforming growth <u>f</u> actor β)
TNF-α	<u>t</u> umor <u>n</u> ekrotizující <u>f</u> aktor <u>α</u>

2 SOUHRN

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

Úvod

Radiační pneumonitida a fibróza limitují intenzitu radioterapie, zvyšují morbiditu a zhoršují kvalitu života nemocných s nádory plic a prsu, či Hodgkinovou nemocí. Radiační pneumonitida je akutní zánětlivá reakce, která ustupuje spontánně nebo po léčbě kortikosteroidy. Při jejím vzniku se významně uplatňují volné radikály. V závislosti na dávce vyvolávají lipoperoxidaci, poškození DNA, aktivaci proapoptotických dějů a změny aktivity enzymů. Na zánětlivou reakci iniciované volnými radikály se podílejí především epiteliální buňky a buňky zánětu, které uvolňují řadu cytokinů (TNF- α , IL-1, IL-6, TGF- β , aj.). Radiační fibróza plic se rozvíjí jako pozdní následek radioterapie (> 3 měsíce). Může vyústit do chronické respirační insuficience a způsobit smrt. Makroskopickým nálezem je proliferace fibroblastů, ukládání kolagenu a destrukce plicního parenchymu.

Cíle práce a použité metody

Předložená práce se zaměřila na změny v metabolické dráze arginin-oxid dusnatý vyvolané v dýchacích cestách a v jiných částech organismu ionizujícím gama zářením a to v časně fázi (do 72 h) a ve fázi radiační pneumonitidy (7 týdnů) po celotělové expozici i lokálním ozařování hrudníku potkana Wistar. Byly zkoumány možnosti využití bioindikátorů oxidačního a nitračního stresu při biodozimetrii a predikci rozvoje radiační pneumonitidy. Koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého (eNO) byla vyšetřována neinvazivně chemiluminiscenční metodou. Arginin, dusitany a dusičnany (NO_x) a malondialdehyd (MDA) byly stanoveny vysoce účinnou kapalinovou chromatografií ve vzorcích plazmy, tekutiny z bronchoalveolární laváže (BAL) a v homogenátu plicní tkáně. Ve vzorcích plicní tkáně byla hodnocena exprese indukovatelné formy syntázy oxidu dusnatého (iNOS) metodou Western blot a genová exprese iNOS, argináz a transportérů pro arginin (CAT) metodou RT-PCR. Radiační pneumonitida byla prokazována histochemicky (vzdušnost plic a počet neutrofilů v plicní tkáni). V další části práce byly hodnoceny radioprotektivní účinky vybraných látek s vlastnostmi antioxidantů a inhibitorů NOS [methylester nitro-L-argininu (L-NAME), aminoguanidin (AG), acetyl-L-karnitin (ALC)].

Výsledky

V intervalu 72 h po celotělovém ozáření (2-50 Gy) nedošlo v dýchacích cestách k významnější indukci tvorby NO a projevům nitračního stresu. Exprese iNOS v plicích ozářených potkanů nebyla zachycena a v játrech se nelišila od neozářených kontrol. Koncentrace eNO ozářených a kontrolních potkanů byly srovnatelné jak v časně fázi po celotělové expozici tak ve fázi radiační pneumonitidy po ozáření hrudníku. V rozmezí 2-10 Gy bylo zaznamenáno dávkově závislé zvýšení NO_x v plazmě na čtyřnásobek kontrolní hodnoty (P<0,001). Jednorázová aplikace L-NAME a pětidenní podávání ALC před celotělovým ozářením (8 Gy) zlepšily přežívání potkanů v období 30 dnů po expozici z 35% na 75% (P<0,005). Látka L-NAME potlačila nárůst NO_x, zatímco látka ALC zabránila zvýšení MDA v plazmě ozářených potkanů. V 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku (20 Gy) byla v BAL potkanů s histologicky dokumentovanou radiační pneumonitidou vyšší koncentrace bílkoviny (5-krát, P<0,01) a MDA (1,8-krát, P<0,05). Dále došlo k nárůstu genové exprese arginázy I a transportérů CAT 1, 2 a 3 (P<0,05). Všechny studované látky zvýšily vzdušnost plic a/nebo snížily zánětlivý infiltrát v plicní tkáni v 7. týdnu po ozařování hrudníku (15 Gy). Aplikace ALC navíc zlepšila přežívání potkanů z 30% na 80% (P<0,05) a snížila expresi arginázy I a transportérů CAT1 a CAT3 v plicní tkáni (P<0,05).

Závěry

Výsledky práce ukazují, že neinvazivní vyšetření eNO není možné použít jako biodozimetrický ukazatel ani jako prediktor rozvoje radiační pneumonitidy u potkana. Změny v metabolické dráze L-arginin-NO vyvolané ionizujícím zářením v dýchacích cestách potkana jsou mírné. Látky L-NAME a ALC mají radioprotektivní účinek vůči celotělovému ozáření dávkou 8 Gy. Při hodnocení v intervalu 7 týdnů po ozáření hrudníku dávkou 15 Gy má ze srovnávaných potenciálních radioprotektiv nejlepší ochranný účinek látka ALC. Snížení exprese arginázy I a transportérů CAT1 a CAT3 u ozářených potkanů chráněných ALC by mohlo být signálem, že látka snižuje zánětlivou odpověď vedoucí k poškození plicní tkáně a tím klesají i nároky na dostupnost argininu a polyaminů potřebných k jejímu hojení.

Klíčová slova: ionizující záření, radiační pneumonitida, radioprotekce, vydechovaný oxid dusnatý

3 SUMMARY

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

Introduction

Radiation pneumonitis and fibrosis limit the intensity of radiotherapy, increase morbidity and worsen quality of life of patients with lung and breast cancer or Hodgkin's disease. Radiation pneumonitis is an acute inflammatory reaction that resolves either spontaneously or after treatment with corticosteroids. Free radicals play an important role in its etiology. They cause dose-dependent induction of lipoperoxidation, DNA damage, activation of proapoptotic events and changes in activity of enzymes. The inflammatory reaction initiated by free radicals affects primarily epithelial and inflammatory cells, which release a number of cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, TGF- β , etc.). Radiation fibrosis of lung develops as a late consequence of radiotherapy (> 3 months). It can lead to chronic respiratory failure and death. Macroscopic findings include fibroblast proliferation, collagen deposition and destruction of lung parenchyma.

Aims and methodology

This work was focused on the changes in the arginine-nitric oxide metabolic pathway induced in the airways, lung and other parts of the body by ionizing gamma radiation in the early phase (within 72 h) as well as in the phase of radiation pneumonitis (7 weeks) following exposure to whole-body and local chest irradiation of Wistar rats. The value was evaluated of the oxidative and nitrosative stress biomarkers for radiation biodosimetry and prediction of the onset of radiation pneumonitis. The concentration of exhaled nitric oxide (eNO) was measured noninvasively using chemiluminescence. Arginine, nitrites/nitrates (NO_x) and malondialdehyde (MDA) were determined by high performance liquid chromatography in the plasma, bronchoalveolar lavage fluid (BAL) and lung tissue homogenate. Expression of an inducible form of nitric oxide synthase (iNOS) was studied in samples of lung tissue by Western blotting and gene expression of iNOS, arginases and arginine transporters (CAT) was assessed by RT-PCR. The presence of radiation pneumonitis was verified histochemically (airiness of the lung and neutrophil count in the lung tissue). Moreover, radioprotective effects of selected antioxidants and inhibitors of NOS [L-N-nitroarginine methyl ester (L-NAME), aminoguanidine (AG), acetyl-L-carnitine (ALC)] were evaluated.

Results

In the interval of 72 h following whole-body irradiation (2-50 Gy), the changes in the concentrations of NO and other nitrosative stress markers in the airways were either modest or absent. The iNOS protein was not detected in the lungs and its expression was comparable in the liver of irradiated rats and non-irradiated controls. Concentrations of eNO exhaled by irradiated and control rats were comparable during both the early phase after whole-body exposure (72 h) and the radiation pneumonitis phase following chest irradiation. Whole-body irradiation with 2-10 Gy caused a dose-dependent increase in plasma NO_x up to the maximum level four times above the control value ($P < 0.001$). Single injection with L-NAME and five-day pretreatment of rats with ALC before whole-body irradiation (8 Gy) improved the survival of rats in the period of 30 days after exposure from 35% to 75% ($P < 0.005$). In irradiated rats, L-NAME suppressed plasma NO_x while ALC prevented the increase of plasma MDA. Seven weeks following thorax irradiation (20 Gy), an increased concentration of protein (5-fold, $P < 0.01$) and MDA (1.8-fold, $P < 0.05$) was found in BAL of rats with histologically proven radiation pneumonitis. Furthermore, there was an increased gene expression of arginase I and CAT transporters 1, 2 and 3, respectively, in the lung of irradiated animals ($P < 0.05$). All compounds under the study increased the airiness of the lung and/or reduced the inflammatory infiltrate seven weeks after thoracic irradiation (15 Gy). In addition, ALC significantly improved survival of rats from 30% to 80% ($P < 0.05$) and decreased the expression of arginase I, CAT1 and CAT3 in the lung tissue of irradiated rats ($P < 0.05$).

Conclusion

The results show that noninvasive measurement of eNO cannot be used as a biodosimetric indicator or predictor of radiation pneumonitis in rats. Changes in the metabolic pathway of L-arginine-NO caused by ionizing radiation in the airways are mild. L-NAME and ALC exert protective effects against whole-body irradiation of rats. The results of the seven-week assessment following thoracic irradiation with 15 Gy document that ALC is the best radioprotector among the compounds under study. The reduced expression of arginase I and arginine transporters CAT1 and CAT3 in the lung of the ALC-pretreated and irradiated rats might indicate that the compound reduces the intensity of radiation pneumonitis thereby decreasing the demands on the pulmonary availability of arginine and polyamines necessary for its healing.

Key words: exhaled nitric oxide, ionizing radiation, radiation pneumonitis, radioprotection

4 ÚVOD DO PROBLEMATIKY

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 zdlouhavé 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 vydechovaný 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 stadia 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.

4.1 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 (Haghdooost, 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 dvojitvzáknové 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 plice 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 plice 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).

Incidence 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- β 1, který proces fibrózy ovlivňuje (Martin, 2000).

4.2 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 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 zabírající vstup radiojodu do štítné žlázy a absorpci dalších radionuklidů jakými jsou např. ^{137}Cs , ^{90}Sr či ^{239}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 i 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 nespĺňuje všechna kritéria pro ideální radioprotektivum.

Radioprotektivní účinek dané látky je posuzován podle redukčního faktoru dávky, DRF. Pro výpočet je možné použít zjednodušený postup: poměr LD50 počtu přežitých jedinců chráněných radioprotektivní látkou k počtu nechráněných jedinců (Rima, 1999). Látky má radioprotektivní účinek dosáhne-li uvedený poměr hodnoty vyšší než 1. Validní hodnocení DRF testované látky vyžaduje sledování letality nejméně 30 dní (LD50/30) 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 syntéza 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 antioxidantní vlastnosti, neselektivního inhibitoru NO syntáz L-NAME a na účinky aminoguanidinu, látky s antioxidantním 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 β -oxidace mastných kyselin (Yasui, 2002). ALC působí jako antioxidant a jeho úkolem je chránit látky bílkovinné povahy před oxidačním poškozením, např. antioxidantní enzymy (Gülçin, 2006). Mnohé studie prokázaly i pozitivní vliv ALC na mozkovou činnost (Pettegrew, 2000; Rumpft, 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 ω -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 pimgedin, 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.

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

4.3.1 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).

4.3.2 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý, ale i další reaktivní formy dusíku (RNS) jsou jedny z nejméně studovaných endogenních látek v organismu. Ještě před několika lety byl NO považován pouze za škodlivinu, která přispívá ke znečištění 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.

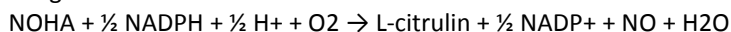
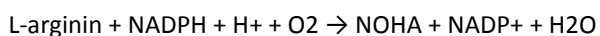
NO je plynná signální molekula, dalšími jsou sirovodík a oxid uhelnatý (Du, 2006).

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) (Buga, 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 vydechovaném 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 ω -hydroxy-L-arginin (NOHA), jenž je inhibítozem argináz.

Sumární chemická rovnice je následující:



Byly popsány čtyři izoformy NOS, které se liší molekulovou hmotností, závislostí na koncentraci intracelulárního Ca $^{2+}$, ale také lokalizací exprese (viz tabulka 5). Konstitutivní izoformy eNOS (endoteliální, NOS3) a nNOS (neuronální, NOS1) jsou řízeny koncentrací intracelulárního Ca $^{2+}$, 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 NF κ B. Komplex Ca $^{2+}$ -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- α – tumor-nekrotizující faktor α , IL-1 β - interleukin-1 β , IFN- γ – interferon- γ) a bakteriální lipopolysacharid (LPS).

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

4.3.3 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), γ^+ 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. Izoformy se liší tkáňovou distribucí, substrátovou afinitou a transportní kapacitou (Ito, 1997; Yeramian, 2006; Closs, 2000). CAT1 je konstitutivně exprimována ve všech tkáních vyjma jaterní tkáně 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). Izoforma CAT2a je lokalizována v játrech, k argininu má vysokou transportní kapacitu a nízkou afinitu. Izoforma 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, arginázami (ARG) na ornitin, arginin:glycin-amidnotransferázou (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.

4.4 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).

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 plísně *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).

5 CÍL VÝZKUMNÉ PRÁCE

1. Posoudit možnost využití vydechovaného oxidu dusnatého jako potenciálního prediktivního časného markeru celkové expozice organismu ionizujícím 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

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 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±2 °C, 50±10 % relativní vlhkost, světlo od 07⁰⁰ do 19⁰⁰ hodin), krmena dietou standardní 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.

6.2 Zdroj záření

V experimentech byl k ozáření použit kobaltový (⁶⁰Co) 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.

6.3 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 zamrazeny při teplotě -80 °C.

6.4 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 vydechaného 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).

6.5 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

6.5.1 Malondialdehyd

detektor: UV/VIS ($\lambda = 310$ nm), kolona: NUCLEOSIL 100-5 C18

K 250 μ l vzorku nebo standardu bylo přidáno 50 μ l 6M NaOH. Po alkalické hydrolyze 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 μ l 35% HClO₄. Ze supernatantu po centrifugaci (15000 g/10 minut/4°C) bylo odebráno 250 μ l a přidáno 25 μ 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).

6.5.2 Koncentrace dusičnanů/dusitanů (NO_x)

detektor: fluorescenční (excitační = 365 nm, emisní = 435 nm), kolona: Gemini-NX C18

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

6.6 RT-PCR

Analýza genové exprese byla provedena metodou RT-PCR s použitím Applied Biosystems 7500 HT Fast Real-Time PCR systému (Foster City, USA). RNA byla ze vzorků plicní tkáně izolována pomocí kitu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo) a následně přepsána do cDNA pomocí High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu (Applied Biosystems). Do reakce bylo vloženo 30 ng cDNA. Amplifikace templátu cDNA proběhla za použití kitu TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG. Jako vnitřní kontrola byl použit GAPDH. Teplotní profil: 95 °C po dobu 3 min, 40 cyklů: 95 °C po dobu 10 s, 60 °C po dobu 10 s. Kvantifikace cílového genu byla poté stanovována pomocí porovnání exprese GAPDH a cílového genu.

6.7 Western blot

Odebrané vzorky orgánů (plíce, játra) byly zamrazeny v tekutém dusíku a uloženy při -80 °C. Homogenizaci tkáně jsme následně provedli v přítomnosti homogenizačního pufru (poměr tkáň:pufr byl 1:5) za pomoci homogenizátoru Ultra Turrax (IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo) za chladu (4 °C). První centrifugace zhomogenizované tkáně probíhala při 4 °C, 10 minut a 1000 g. Odebraný supernatant byl opět centrifugován po dobu 30 minut při 4 °C a 19000 g na ultracentrifuze. Exprese proteinů byla stanovována ze supernatantu po druhé centrifugaci (ultracentrifugaci). Koncentrace proteinů byla stanovena použitím kitu BCA Protein Assay Reagent (Pierce).

Tkáňový homogenát byl naředěn 3x koncentrovaným SDS vzorkovým pufrům a zahřát na 90 °C po dobu 5 minut. 30 mg proteinu bylo naneseno 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% odtučňené mléko a 0,05% Tween 20. Membrány byly inkubovány s protilátkami přes noc. Jako kontrola nanášky byl použit β -aktin. K detekci navázaných protilátek byla použita chemiluminiscence (Roche, Basel, Švýcarsko).

6.8 Histologické vyšetření

Vzorky plic byly po odebrání fixovány v roztoku 10% neutrálního formalinu (Chemapol, Praha, Česká republika). Vzorky byly předány pro další analýzu katedře radiobiologie (Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany) pro stanovení vzdušnosti plic a detekci zánětlivých buněk.

6.9 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).

7 VÝSLEDKY

7.1 Celotělové ozáření

7.1.1 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* O55: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).

7.1.1.1 Vydechovaný oxid dusnatý

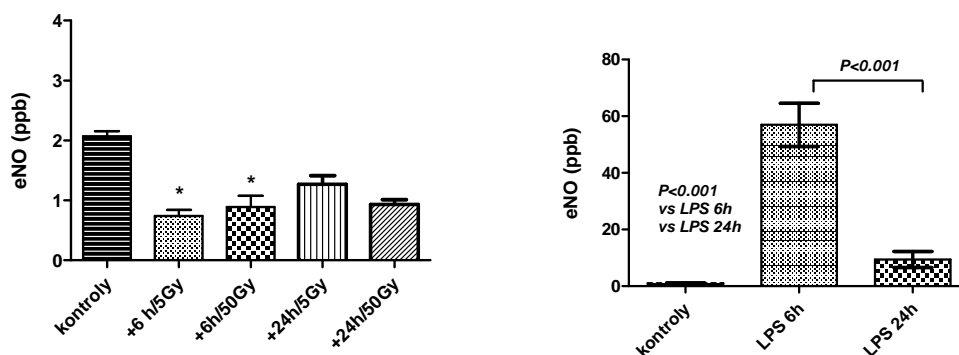
Stanovení koncentrace vydechovaného oxidu dusnatého u skupin zářených dávkami 5 a 50 Gy ukázalo statisticky významné snížení hodnot v nulté a šesté hodině ve srovnání s kontrolní skupinou (Tabulka 10, Graf 1). Tyto změny však nebyly srovnatelné se změnami nalezenými u zvířat, kterým byl aplikován LPS. 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 1, Graf 1).

Tabulka 1 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) ^a	1.3 (0.34)	0.89 (0.46) ^a	0.93 (0.21)	0.94 (0.39)	57 (22) ^c	9.4 (7.4) ^c

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

Graf 1 Porovnání hladin eNO po celotělovém ozáření a aplikaci LPS



7.1.1.2 Porovnání koncentrace dusičnanů/dusitanů v plazmě

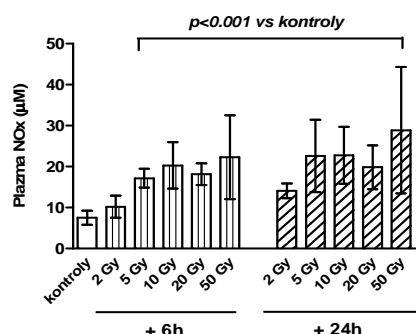
Po celotělovém ozáření dávkami 2 až 50 Gy byl pozorován dávkově závislý nárůst koncentrací NOx v plazmě (Tabulka 2, Graf 2).

Tabulka 2 Koncentrace NO_x 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
plazma NO _x (μM)	7,53 (1,72)	6 h 10,24 (2,67)	17,21 (2,29) ^c	20,32 (5,67) ^c	18,15 (2,67) ^c	22,33 (10,2) ^c
		24 h 14,11 (1,84) ^c	22,62 (8,80) ^c	22,78 (6,97) ^c	19,88 (5,35) ^c	28,91 (15,4) ^c

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

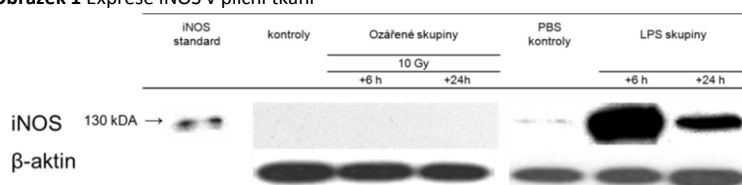
Graf 2 Koncentrace NO_x v plazmě v 6. a 24. hodině po celotělovém ozáření v závislosti na dávce



7.1.1.3 Expresí indukované formy NO syntázy v plicích

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 1). Za 24 h po aplikaci LPS bylo pozorováno snížení exprese iNOS. Indukce iNOS tak časově odpovídá změnám eNO po podání LPS.

Obrázek 1 Expresí iNOS v plicní tkáni



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

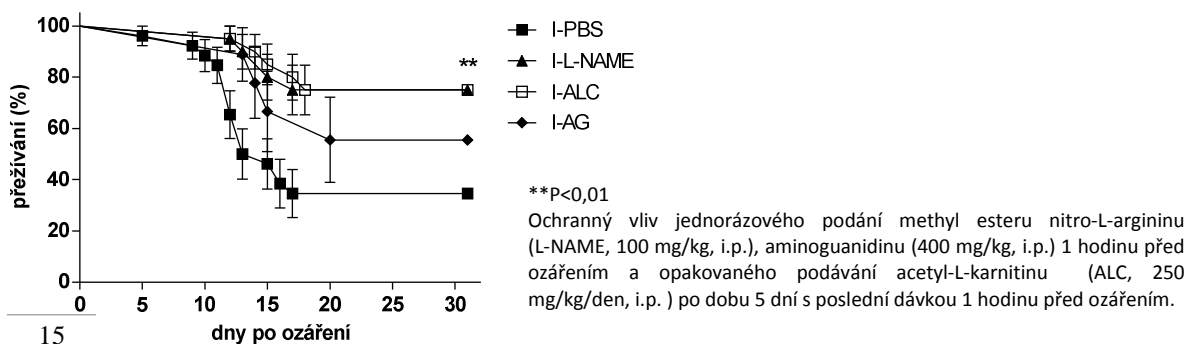
V druhé studii byl sledován vliv potenciálně radioprotektivních látek na markery oxidačního a nitračního stresu a na mortalitu po celotělovém ozáření potkanů dávkou 8 Gy.

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 ozáření. Acetyl-L-karnitin (ALC, 250 mg/kg/den) byl podáván jednou denně po dobu 5 dní, naposledy jednu hodinu před ozáření. Do kontrolních skupin byla zařazena zvířata kontrolní skupiny s aplikací fyziologického roztoku (vehikulum, PBS) ve stejném objemu jako při aplikaci radioprotektiv.

7.1.2.1 Přežívání

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 3). Přežívání hodnocené pomocí Kaplan Meierovy metody s následným log-rank testem ukázalo, že látky L-NAME a ALC staticky 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 3 Přežívání potkanů Wistar po dobu 30 dní po celotělovém ozáření dávkou 8 Gy



7.1.2.2 Koncentrace malondialdehydu (MDA) v plazmě

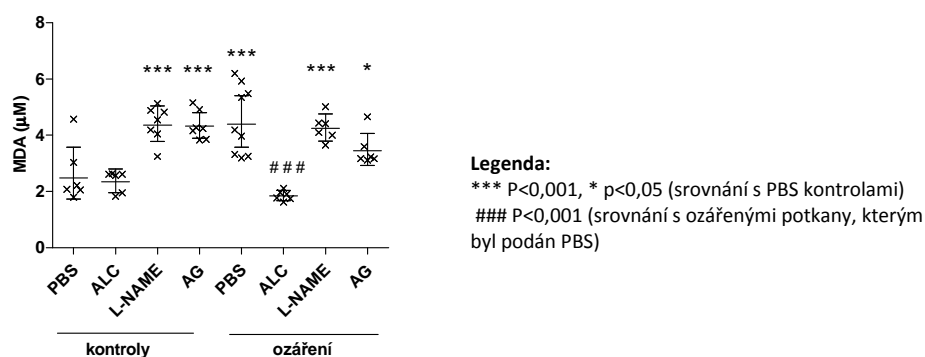
Jednorázové podání inhibitorů NOS L-NAME a AG vyvolalo zvýšení plazmatických koncentrací MDA u neozářených potkanů ve srovnání s kontrolní skupinou PBS ($P < 0,001$). U zvířat předléčených látkou ALC zůstala koncentrace MDA na úrovni srovnatelné s kontrolní skupinou. Celotělové ozáření dávkou 8 Gy způsobilo 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 3, Graf 4).

Tabulka 3 Koncentrace MDA v plazmě 6 h po celotělovém ozáření (8 Gy) Vliv studovaných potenciálních radioprotektiv.

	Kontroly				ozáření 8 Gy			
	PBS	AG	L-NAME	ALC	PBS	AG	L-NAME	ALC
plazma MDA (μM)	2,49 (1,73-3,57)	4,32 (3,89-4,80) ^f	4,37 (3,78-5,04) ^f	2,34 (1,73-3,57)	4,40 (3,89-4,80) ^f	3,45 (2,93-4,10) ^a	4,25 (3,79-4,76) ^c	1,85 (1,67-2,04) ^c

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

Graf 4 Koncentrace MDA v plazmě 6 h po celotělovém ozáření (8 Gy) Vliv studovaných potenciálních radioprotektiv.



7.1.2.3 Koncentrace dusičnanů/dusitanů (NOx) v plazmě

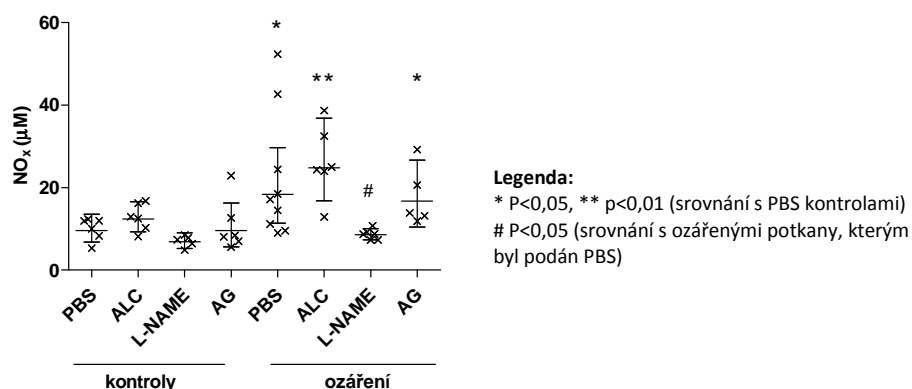
Po aplikaci látek ALC a AG neozářeným potkanům nedošlo ke změnám plazmatických koncentrací NOx. Po jednorázovém podání látky L-NAME byl patrný trend snížení koncentrací NOx v plazmě u neozářených zvířat ($P = 0,085$). Po celotělovém ozáření dávkou 8 Gy došlo ve skupině nechráněné radioprotektivem (ozáření 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 4, Graf 5).

Tabulka 4 Koncentrace Koncentrace NOx v plazmě 6 h po celotělovém ozáření (8 Gy) Vliv studovaných potenciálních radioprotektiv.

	Kontroly				ozáření 8 Gy			
	PBS	AG	L-NAME	ALC	PBS	AG	L-NAME	ALC
plazma NOx (μM)	9,60 (6,81-13,5)	9,57 (5,62-16,3)	6,88 (5,24-9,03) ^b	12,4 (9,33-16,6)	18,4 (11,4-29,8) ^a	16,7 (10,5-26,7) ^a	8,61 (7,36-10,1)	24,9 (16,8-36,8) ^b

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

Graf 5 Koncentrace NOx v plazmě 6 h po celotělovém ozáření (8 Gy) Vliv studovaných potenciálních radioprotektiv.



7.2 Lokální ozáření

7.2.1 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).

7.2.1.1 Vydechaný oxid dusnatý

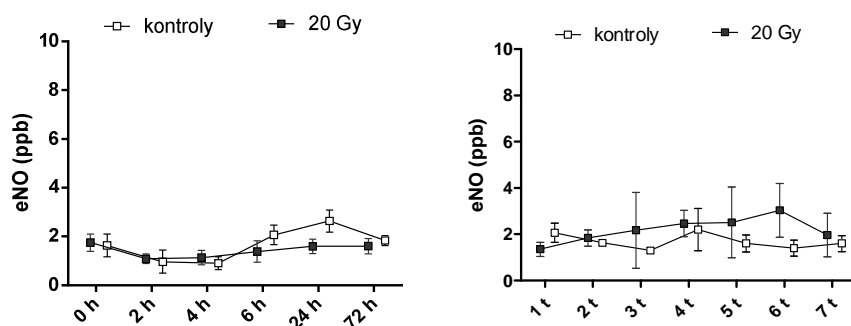
Měření vydechaného oxidu dusnatého během 7 týdenního intervalu neukázalo žádné výrazné změny po lokálním ozáření. Zvířata ozářená dávkou 20 Gy lokálně na hrudník měla hodnoty eNO srovnatelné s kontrolní skupinou (Tabulka 5, Graf 9) přes histochemicky prokázanou přítomnost radiační pneumonitidy (Obrázek 2 a 3). eNO se proto nejeví jako vhodný marker rozvoje radiační pneumonitidy u potkana.

Tabulka 5 Časový profil eNO po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

		0 h	2 h	4 h	6 h	24 h	72 h	
eNO (ppb)	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
eNO (ppb)	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 6 Vydechaný oxid dusnatý po lokálním ozáření hrudníku dávkou 20 Gy



7.2.1.2 Výsledek analýz v BAL

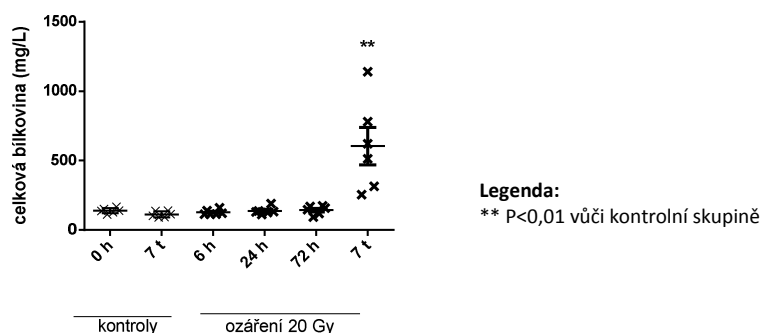
Výsledky stanovení koncentrace TP v tekutině z bronchoalveolární laváže ukázaly její významné zvýšení v 7 týdnu po ozáření (Tabulka 6, Graf 7). Jedná se o důsledek zvýšené propustnosti alveolokapilární membrány. Nárůst koncentrace MDA svědčil pro zvýšení oxidačního stresu v plicích v intervalu 7 týdnů (Tabulka 7, Graf 8).

Tabulka 6 Koncentrace celkové bílkoviny v tekutině z bronchoalveolární laváže po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

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

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

Graf 7 Koncentrace celkové bílkoviny v tekutině z bronchoalveolární laváže po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

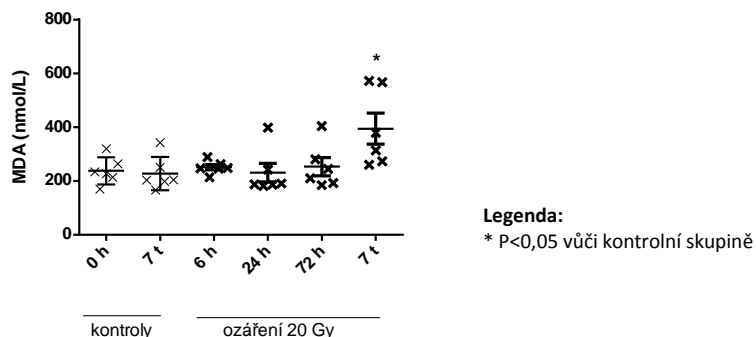


Tabulka 7 Koncentrace malondialdehydu v tekutině z bronchoalveolární laváže po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy

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

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

Graf 8 Koncentrace malondialdehydu v tekutině z bronchoalveolární laváže po ozáření hrudníku dávkou 20 Gy



7.2.1.3 RT-PCR

Expres genů transportérů pro kationické aminokyseliny CAT v plicní tkáni na úrovni mRNA zjištěné metodou RT-PCR ukázaly statisticky významné zvýšení CAT1, CAT2 a CAT3 (Tabulka 8) v 7. týdnu po ozáření.

Tabulka 8 Výsledky RT-PCR

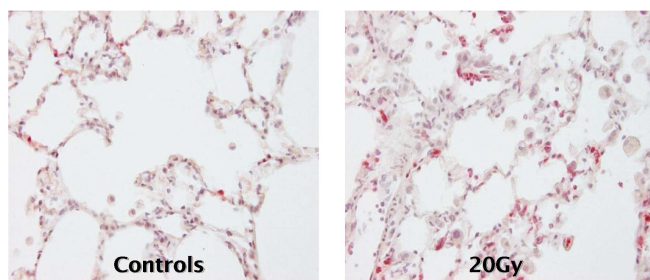
	Kontroly		ozáření 20Gy			
	+72 h	+7 t	+6 h	+24 h	+72 h	+7 t
Argináza I	100 (22,0)	156 (78,8)	118 (131)	69,7 (25,3)	102 (17,1)	184 (154)
cat1	100 (21,7)	120 (26,3)	116 (129)	84,1 (18,8)	92,9 (19,3)	206 (127) ^a
cat2	100 (40,0)	105 (76,2)	64,6 (12,9)	64,0 (22,9)	78,9 (40,4)	193 (105) ^a
cat3	100 (48,8)	120 (39,4)	86,9 (30,3)	77,4 (43,5)	49,9 (42,2)	218 (96,5) ^b

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

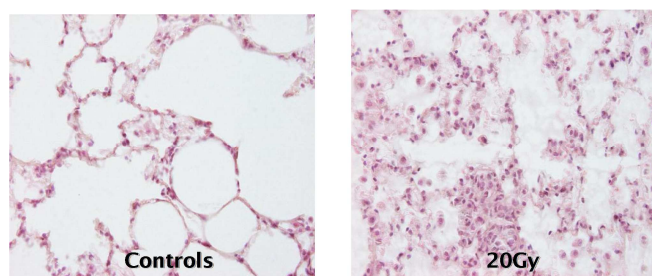
7.2.1.4 Histologické vyšetření plicní tkáně

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 ± 16) ve srovnání s kontrolní skupinou (69 ± 6). Zároveň se zvýšil počet neutrofilů v plicní tkáni ($P \leq 0,001$, 21 ± 14) ve srovnání s kontrolní skupinou (4 ± 1). To ukazuje na přítomnost radiační pneumonitidy.

Obrázek 2 Infiltrace zánětlivými buňkami



Obrázek 3 Vzdušnost plicní tkáně



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

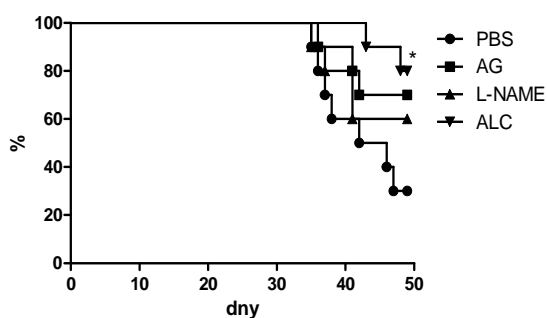
Čtvrtý pokus byl zaměřen na sledování vlivu potenciálně radioprotektivních látek ALC, L-NAME a AG na rozvoj radiační pneumonitidy. Dále byly sledovány ukazatele oxidačního a nitračního stresu a jejich ovlivnění studovanými látkami a to v 7. týdnu po ozáření hrudníku jakou dávkou.

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).

7.2.2.1 Přežívání

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 9).

Graf 9 Přežívání potkanů po po ozáření hrudníku dávkou 15 Gy



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.

7.2.2.2 Vydechvaný oxid dusnatý

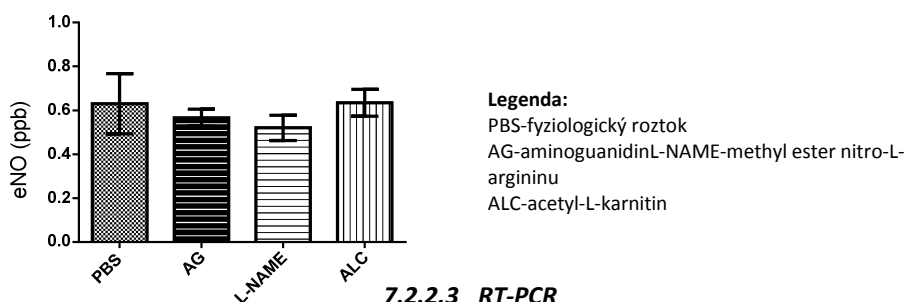
Výsledky měření vydechovaného oxidu dusnatého v 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku byly ve skupinách s aplikací studovaných látek zcela srovnatelné s výsledky v kontrolní skupině potkanů, kterým byl podán PBS (Tabulka 9, Graf 10).

Tabulka 9 Vliv radioprotektiv na koncentraci vydechovaného oxidu dusnatého v 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy

	PBS (kontroly)	AG	L-NAME	ALC
eNO (ppb)	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 10 Vydechvaný oxid dusnatý v 7. týdnu po lokálním ozáření hrudníku dávkou 15 Gy



7.2.2.3 RT-PCR

Stanovení genové exprese transportérů pro kationické aminokyseliny CAT na úrovni mRNA pomocí metody RT-PCR ukazují signifikantně sníženou expresi genu pro CAT1 a CAT3 (Tabulka 10) ve skupině ozářených potkanů, kterým byl podán ALC.

Tabulka 10 Výsledky RT-PCR

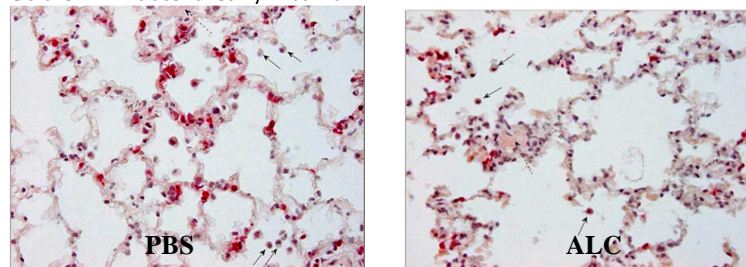
	ozáření 15Gy			
	PBS (kontroly)	AG	L-NAME	ALC
Argináza I	100 (105)	53 (16)	64 (20)	57 (16)
cat1	100 (31)	107 (33)	68 (23)	59 (13) ^a
cat3	100 (20)	86 (24)	76 (26)	53 (23) ^a

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

7.2.2.4 Histologické vyšetření plicní tkáně

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

Obrázek 4 Infiltrace zánětlivými buňkami



8 DISKUZE

8.1 Celotělové ozáření

8.1.1 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 NOx 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 (NOx) 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 NOx 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 NOx 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. Dávkově závislý vzestup NOx v plazmě popsali ve studii na myších i Ohta a kolektiv (Ohta, 2007). Tito autoři pozorovali zvýšené koncentrace NOx po dávkách v rozmezí od 19,6 do 28,7 Gy, zatímco vyšší dávky (maximum 31,5 Gy) další zvýšení nezpůsobily.

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.

8.1.2 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 syntázy (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 nejméně výrazným 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-NAME (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-NAME 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 μM) jako je tomu po podání L-NAME (koncentrace za 6 h: 8,6 μM). 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 snížením hladin MDA v plicích a játrech v intervalu 24 hodin po ozáření (Mansour, 2006). Ve stejné práci autoři prokázali významný nárůst aktivity antioxidačních 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 antioxidační 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.

8.2 Lokální ozáření

8.2.1 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, NOx a dalšími markerů nitračního stresu (Tsuji, 2000; Giaid, 2003). Ačkoliv byla v naší studii radiační pneumonitida prokázána histologicky, hladiny vydechaného oxidu dusnatého se v průběhu 7 týdnů neměnily. Neinvasivní 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 dávana 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.

8.2.2 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 ± 1.8 (průměr \pm SD) oproti 0.78 ± 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.

9 ZÁVĚR

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.

10 POUŽITÁ 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.
- 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..
- 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.
- 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.
- BUGA, GM; IGARRRO, 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. 602-11.
- 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.
- 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. 863-8.
- EROGLU, C et al. Aminoguanidine ameliorates radiation-induced oxidative lung damage in rats. *Clin Invest Med.* 2008, 31, s. E182-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- GÓMEZ-AMORES, L et al. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *J Nutr Biochem*. 2007, 18, s. 533-40.
- 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.
- HANSON, P et al. Acute corticosteroid myopathy in intensive care patients. *Muscle Nerve*. 1997, 20, s. 1371-1380.
- 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.
- HUANG, EY et al. Aminoguanidine alleviates radiation-induced small-bowel damage through its antioxidant effect. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009, 74, 237-44.
- 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.
- 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. 26780-6.
- JACK, CI et al. Indicators of free radical activity in patients developing radiation pneumonitis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996, 34, s. 149-54.
- JAGETIA, GCH; BALIGA, MS. Polyherbal extract of septicin 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. 1079-100.
- KAO, CC et al. Arginine, citrulline and nitric oxide metabolism in sepsis. *Clin Sci (Lond)*. 2009, 117, 23-30.
- KENYON, NJ et al. Arginases I and II in lungs of ovalbumin-sensitized mice exposed to ovalbumin: sources and consequences. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008, 230, s. 269-75.
- 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. 476-94.
- 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.
- 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.
- KUROSE, I et al. Microvascular responses to inhibition of nitric oxide production. Role of active oxidants. *Circ Res*. 1995, 76, s. 30-9.
- LIEBMANN, J et al. In vivo radiation protection by nitric oxide modulation. *Cancer Res*. 1994, 54, s. 3365-8.

- 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, 608-12.
- 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.
- MAARSINGH, H et al. Increased arginase activity contributes to airway remodelling in chronic ALLERGIC asthma. *Eur Respir J.* 2011, 38, s. 318-28.
- 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.
- MANSOUR, HH. Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. *Pharmacol Res.* 2006, 54, 165-71.
- 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. 443-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- ÖSTERREICHER, J; VÁVROVÁ, J. *Přednášky z radiobiologie.* Praha: Manus, 2003. 111 s.
- 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.
- 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.

RANCATI, T et al. Factors predicting radiation pneumonitis in lung cancer patients: a retrospective study. *Radiother Oncol*. 2003, 67, s. 275-283.

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.

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.

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.

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.

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.

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

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

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.

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.

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.

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.

YILDIZ, OG et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on radiation induced lung injury in rats. *Clin Invest Med.* 2008, 31, s. E242-7.

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, 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.

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.

11 PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI

11.1 Původní práce publikované v odborných časopisech

1. 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. *International Journal of Radiation Biology*, 2011, vol. 87, no. 10, s. 1067-1073. [IF 2.275]
2. Andrea Babicová, Jaroslav Pejchal, Havlínová Zuzana, Martina Řezáčová, Klára Kubelková, Jaroslav Chládek, Aleš Tichý, Jiřina Vávrová, Lenka Zárybnická, Eva Novotná, Kamil Kuča, Zuzana Šinkorová. Effect of acetyl-L-carnitine pretreatment on radiation pneumonitis and L-arginine-NO metabolic pathway. *Military Medical Science Letter*, 2012, vol. 81, no. 3, s. 119-128.
3. Pejchal J, Novotný J, Mařák V, Osterreicher J, Tichý A, Vávrová J, Sinkorová Z, Zárybnická L, Novotná E, Chládek J, Babicová A, Kubelková K, Kuča K. Activation of p38 MAPK and expression of TGF- β 1 in rat colon enterocytes after whole body γ -irradiation. *International Journal of Radiation Biology*, 2012, vol. 88, no. 4, s. 348-358. [IF 2.275]
4. Havlinova Z, Babicova A, Hroch M, Chladek J. Comparative pharmacokinetics of N ω -hydroxy-nor-L-arginine, an arginase inhibitor, after single-dose intravenous, intraperitoneal and intratracheal administration to brown Norway rats. *Xenobiotica*. 2013. In press. [IF 1.791]

11.2 Posterová sdělení

1. Andrea Babicova, Zuzana Havlinova, Jaroslav Chladek, Martina Rezacova, Milos Hroch, Jaroslav Pejchal, Jirina Vavrova. Bioindicators of nitrosative stress in Wistar rats following whole body irradiation. 59. Farmakologické dny, Bratislava, 2.-4.9.2009.
2. Andrea Babicova, Zuzana Havlinova, Jaroslav Chladek, Martina Rezacova, Milos Hroch, Jaroslav Pejchal, Jirina Vavrova. Bioindicators of nitrosative stress in Wistar rats following whole body irradiation. 37th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Praha, 26.9.-29.9.2009.
3. Andrea Babicova, Zuzana Havlinova, Jaroslav Chladek, Martina Rezacova, Milos Hroch, Jaroslav Pejchal, Ales Tichy, Jirina Vavrova. Radioprotective effect of selected substances in Wistar rat after whole-body irradiation. 38th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Stockholm, 5.-9.9.2010.
4. Andrea Babicová, Zuzana Havlínová, Jaroslav Chládek, Martina Řezáčová, Miloš Hroch, Jaroslav Pejchal, Jiřina Vávrová. Markers of oxidative and nitrosative stress in response to developing radiation pneumonitis. 14th International Congress of Radiation Research, Varšava, 28.8.-1.9.2011.

11.3 Odborné přednášky

1. Andrea Babicová, Zuzana Havlínová, Jaroslav Chládek, Martina Řezáčová, Miloš Hroch, Jaroslav Pejchal, Jiřina Vávrová. Znamky oxidačního a nitračního stresu po ozáření u potkana kmene Wistar. 13. Vědecko-pedagogická konference učitelů biochemických oborů lékařských fakult v ČR a SR. Hradec Králové, 15.-16.9.2011.