

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Resveratrol - vliv na biologický věk

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Petr Klemra CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

Zuzana Pokorná

„Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a nevyužila jsem ji k získání jiného nebo stejného titulu. V práci jsem uvedla veškeré informační zdroje, ze kterých jsem při její tvorbě čerpala.“

V Hradci Králové dne

.....

Zuzana Pokorná

Poděkování:

Děkuji Doc. RNDr. Petru Klemerovi, CSc. za ochotu, cenné rady a připomínky, které mi při psaní diplomové práce poskytl a za pomoc při zpracování jednotlivých výsledků. Také bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Ing. Stanislavu Ďoubalovi, CSc. a Doc. MUDr. Josefu Herinkovi, DrSc. za rady týkajících se postupu při měření. Děkuji v neposlední řadě respondentům, bez nichž by praktická část mé práce nemohla vzniknout a Kristině Shershun za pomoc při překladu abstraktu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: Zuzana Pokorná

Školitel: Doc. RNDr. Petr Klemra, CSc.

Název diplomové práce: Resveratrol - vliv na biologický věk

Cíl: Resveratrol je přírodní polyfenol obsažený ve velkém počtu rostlin. Je to silný antioxidant, u kterého je známo, že má řadu prospěšných účinků na zdraví a účastní se mnoha různých biologických aktivit. Tato sloučenina je produkována rostlinami k jejich přežití a ochraně před chorobami. Zjišťovali jsme vliv resveratrolu na parametry biologického věku - na prahové vnímání intenzity hlasitosti (sluch) a reakční rychlost.

Metody: Skupina lidí užívala resveratrol čtyřicet dní v dávce 170 mg denně. Poté jsme měřili PC programem vybraný parametr sluchu a reakční rychlost.

Výsledky: Ukázalo se, že došlo k statisticky významnému zlepšení sluchu. Přesný mechanismus účinku není znám. Zřejmě funguje prostřednictvím skupiny enzymů, sirtuinů. Reakční rychlost nebyla touto látkou ovlivněna.

Závěr: Prověřili jsme potenciální účinek resveratrolu na biologický věk člověka. Zlepšení sluchu bylo prokázáno na hladině významnosti 0,01 u testované skupiny. Největší zlepšení bylo v oblasti do 4 KHz (oblast nízkých frekvencí) a poté v oblasti vysokých tónů, od 15 do 19 KHz. U reakční rychlosti nedošlo ke zlepšení.

Klíčová slova: Resveratrol, biologický věk, reakční rychlost, citlivost sluchu

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of biophysics and physical chemistry

Candidate: Zuzana Pokorná

Supervisor: Doc. RNDr. Petr Klemra, CSc.

Title of diploma thesis: Resveratrol - effect on the biological age

Objective: Resveratrol is a natural polyphenol contained in number of plants. It is a potent antioxidant, which is known to have a number of beneficial health effects and be part of many biological processes. The compound is produced by plants to increase their survival and resistance to disease. We found the effect of Resveratrol on parameters of biological age-on the threshold of perception of the intensity of the volume (hearing) and reaction rate.

Methods : A group of people used the resveratrol in a dose of 170 mg per day for 40 days. We measured by the PC program the selected parameter of hearing and reaction rate.

Results : It has been shown that statistically significant improvement of hearing has occurred. The exact mechanism of the effect is not known. Probably operates through a group of enzymes, sirtuins. Reaction rate was not affected by substance.

Conclusions : We have reviewed the potential effect of Resveratrol on human biological age. The improvement of hearing has been shown at the 0,01 significance level. The biggest improvement was in the hearing range to 4 KHz (low frequencies), and then in the range of high tones, from 15 to 19 KHz. The reaction rate has not improved.

Key words : Resveratrol, biological age, reaction rate, sensitivity of hearing

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	ZADÁNÍ, CÍL PRÁCE	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Resveratrol	10
3.1.1	Historie	10
3.1.2	Výskyt	10
3.1.3	Chemická struktura	11
3.1.4	Funkce	13
3.1.5	Biosyntéza a syntéza resveratrolu	13
3.1.6	Polyfenoly	15
3.1.7	Nové poznatky a využití	17
3.2	Teorie stárnutí	28
3.2.1	Teorie volných radikálů	28
3.2.2	Neuroendokrinní teorie stárnutí	31
3.2.3	Genetické teorie stárnutí	33
3.2.4	Sirtuiny a omezení příjmu kalorií	34
3.3	Kalendářní a biologický věk	38
3.3.1	Definice pojmů	38
3.3.2	Biologický věk z hlediska teorií stárnutí	38
3.3.3	Postup při výběru souborů testů pro určování biologického věku	39
3.3.4	Prakticky používané metody hodnocení biologického věku	39
3.3.5	Metody určování biologického věku založené na změnách zraku	41
3.3.6	Metody určování biologického věku založené na změnách sluchu	43
3.4	Sluchový aparát a jeho měření	45
3.4.1	Anatomie sluchového aparátu	46
3.4.2	Biofyzika slyšení	47
3.5	Příčiny poruch sluchu	49
3.5.1	Na úrovni převodního aparátu	49
3.5.2	Na úrovni percepčního ústrojí	49
3.5.3	Opotřebením jednotlivých částí stářím	49
3.6	Metody měření sluchu	49
3.6.1	Weberova zkouška	49
3.6.2	Rinneho zkouška	49
3.6.3	Zkouška šepotem a hlasitou řečí	50
3.6.4	Vyšetření u dětí	50
3.6.5	Audiometrie	50
3.7	Reakční rychlost	52

3.7.1	Princip	52
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	53
4.1	Metodická část	53
4.1.1	Kritéria výběru subjektů	53
4.1.2	Vlastnosti potravinového doplňku	53
4.2	Experiment č. 1 - vliv resveratrolu na sluch	55
4.2.1	Programové vybavení a místnost	55
4.2.2	Postup při "Automatickém" testování	56
4.2.3	Sběr dat	56
4.3	Experiment č. 2 – vliv RES na reakční rychlost	58
4.3.1	Potřebné vybavení	58
4.3.2	Postup při "Automatickém" testování	58
4.4	Výsledky	59
4.4.1	Sluch	59
4.4.2	Reakční rychlost	66
5	DISKUSE	68
6	ZÁVĚR	70
8	POUŽITÉ ZKRATKY	71
	SEZNAM TABULEK	72
	SEZNAM OBRÁZKŮ	72
	SEZNAM GRAFŮ	72
9	POUŽITÁ LITERATURA	73
10	PŘÍLOHY	77

1 ÚVOD

Od roku 1992 začala média zaplavovat zpráva o zázračné látce na lidský organismus, o resveratrolu. Postupně se k ní vyjadřovali chemici, lékaři, farmaceuti, pěstitelé a v neposlední řadě konzumenti.

V mnoha vědeckých studiích se ověřoval jeho účinek, jak na nižších druzích živočichů, tak na lidském organismu. Výsledky se zdály být leckdy ohromující.

Tato látka byla zkoumána z hlediska chemického, biomedicínského a taktéž protistárnoucího, tzv. "Anti-Aging" efektu. A na tento poslední zmíněný bod se zaměřuji ve své práci především.

K hlubšímu proniknutí do problému jsem využila především poznatků z patofyziologie člověka, gerontofarmacie a k měření vybraného parametru fyzikální metody. Snažila jsem se nahlédnout na otázku vlivu resveratrolu na procesy stárnutí z teoretické stránky a poté jsem ověřovala jeho vlastnosti na vybraném markeru, který má nějakou užší souvislost se stárnutím a biologickým věkem.

Přínosem a zvláštnostmi této práce může být fakt, že vybraný biologický marker zatím nebyl předmětem žádné větší práce či studií, tudíž výsledky mohou být o to překvapivější.

2 ZADÁNÍ, CÍL PRÁCE

- Rešerše literárních pramenů
- Fyziologické změny v průběhu stárnutí, teorie stárnutí
- Kalendářní a biologický věk
- Určování biologického věku dle námi určeného markeru
- Patofyziologie sluchového aparátu a jeho měření
- Princip měření
- Reakční rychlost a její měření
- Vyhodnocení výsledků, jejich interpretace a diskuze s využitím teoretických i praktických znalostí dané problematiky

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Resveratrol

3.1.1 Historie

Prvotní zájem sledovat tuto látku byl zapříčiněn tzv. "francouzským paradoxem". Zjistilo se a také statisticky dokázalo, že v určitých oblastech Francie je velmi nízká úmrtnost na onemocnění koronárních arterií (na infarkt myokardu) i přesto, že je v těchto oblastech velká spotřeba tuků.

Tyto oblasti jsou většinou proslulé vinařstvím, a proto se konzumace vína začala dávat do souvislosti s tím, že pravidelné popíjení vína může působit proti nežádoucím účinkům stravy bohaté na vysoký podíl tuků a v konečném důsledku se omezí negativní vliv na lidský organismus v podobě aterosklerózy a nemocí, jež z ní vycházejí (angina pectoris, akutní infarkt myokardu, ischemická choroba srdeční). (1)

Dnes existuje mnoho pracovišť, jež tuto látku zkoumají z různých aspektů, od antioxidačních, mutagenních až po chemopreventivních u nádorových onemocněních. V některých případech se dosáhlo pozoruhodných výsledků. Ucelenějších informací se dosáhlo až v osmdesátých letech dvacátého století, kdy se obsah resveratrolu (RES) začal zkoumat vysokokapalinová chromatografie (HPLC) ve vinné révě. Obecně již bylo známo, že polyfenoly, mezi něž patří, mají výrazné antioxidační vlastnosti, ale u něj se překvapivě ukázaly v různých studiích ještě jiné přednosti.

3.1.2 Výskyt

Úplně poprvé byla tato látka izolována z *Veratrum Grandiflorum* (kýchavice velkokvětá). Tudiž se nevyskytuje pouze ve víně, ale téměř v osmi desítkách dalších rostlinách, ve dvanácti čeledích (každý rok objevených rostlin přibývá). Je v řadě druhů zeleniny i v ořechách. Průměrná koncentrace RES je v červených vínech okolo 2- 6mg/l, v bílých vínech méně, 0,2-0,8 mg/l. V zelenině se obsah průměrně pohybuje od 0,4-2,5 kg. Bohaté na RES je především červené zelí, brokolice, červená řepa. Optimální

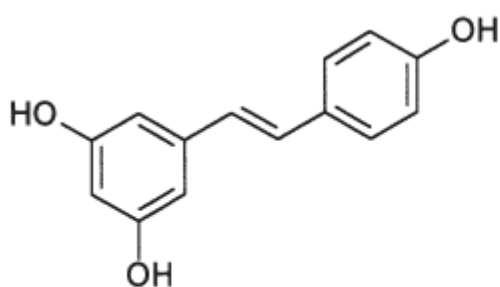
je patrně kombinace zeleniny a vína, což odpovídá výše uvedeným stravovacím zvykům Francouzů. (2)

3.1.3 Chemická struktura

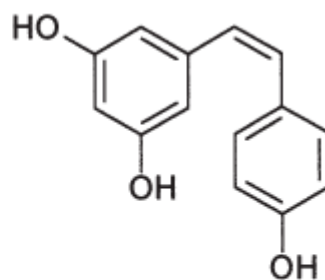
Resveratrol, triviálním názvem trihydroxystilben, může tvořit dva geometrické izomery, *trans*- Ia a *cis*- Ib. V rostlině se vyskytuje většinou směs (racemát) obou těchto izomerů. Většinou je více *trans* formy. Také se může vyskytnout ve formě glykosidů.

Kromě toho jsou v rostlině také oligomery RES (konstitutivní stilbeny), dimer a trimer viniferin. Existuje i řada analogických oligomerů (například amureisiny, isoampelopsin, quadragularin). Poslední uvedené látky byly popsány především čínskými autory. (2b)

Obrázek 1 Resveratrol a jeho formy

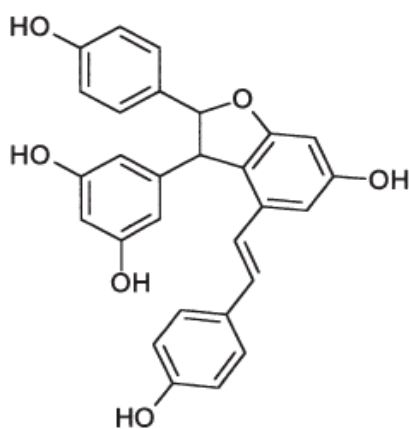


trans-resveratrol, Ia



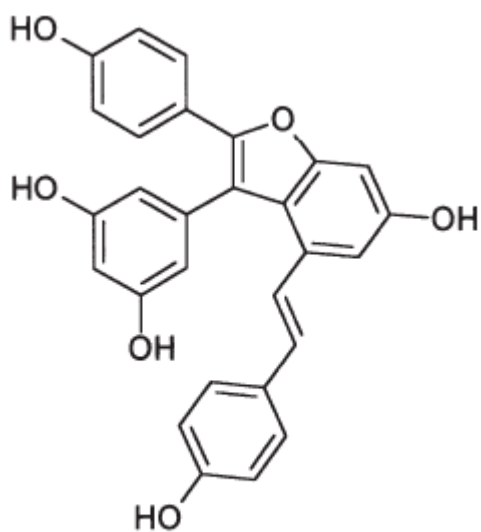
cis-resveratrol, Ib

Obrázek 2 Viniferin



ϵ -vineferin, Ic

Obrázek 3 Amurensin



amurensin, *Ie*

Zdroj (obr.1-3): Chemické listy 95, str. 602 – 604 (2001)

Amurensin byl připraven v Číně čínskými vědci oxidací RES chloridem železitým. Při izolaci výše uvedených látek, jsou obvykle přítomné ionty železa v nízkém množství. Proto je otázkou, jestli výše uvedené trimery či dimery vznikají oxidací v rostlině či to jsou artefakty, jež mají svůj původ při zpracování rostlin.

Tabulka 1 Koncentrace resveratrolu v běžných druzích potravin

Rostlina	Resveratr	Sušina	Resveratr	X kg/1 mg
	ol (mg/kg suš.)		ol (mg/kg)	
Zelí	9	5	0,5	2,2
Kapusta	7	14	1	1
Zelí č.	15	16	2,4	0,4
Zelí bílé	8	7	0,6	1,8
Brokolice	15	12	1,8	0,6
Čekanka	20	5	1	1
Petržel	5	19	1	1,1
Mrkev	4	10	0,4	2,5
Řepa	8	22	1,8	0,6
Česnek	2	29	0,6	1,7
cibule žl.	17	9	1,5	0,7
Cibule č.	12	9	1,1	0,9
.	2	94	1,9	0,5
Čajovník	1	94	0,9	1,1

Zdroj: Chemické listy 95, str. 602-609 (2001)

3.1.4 Funkce

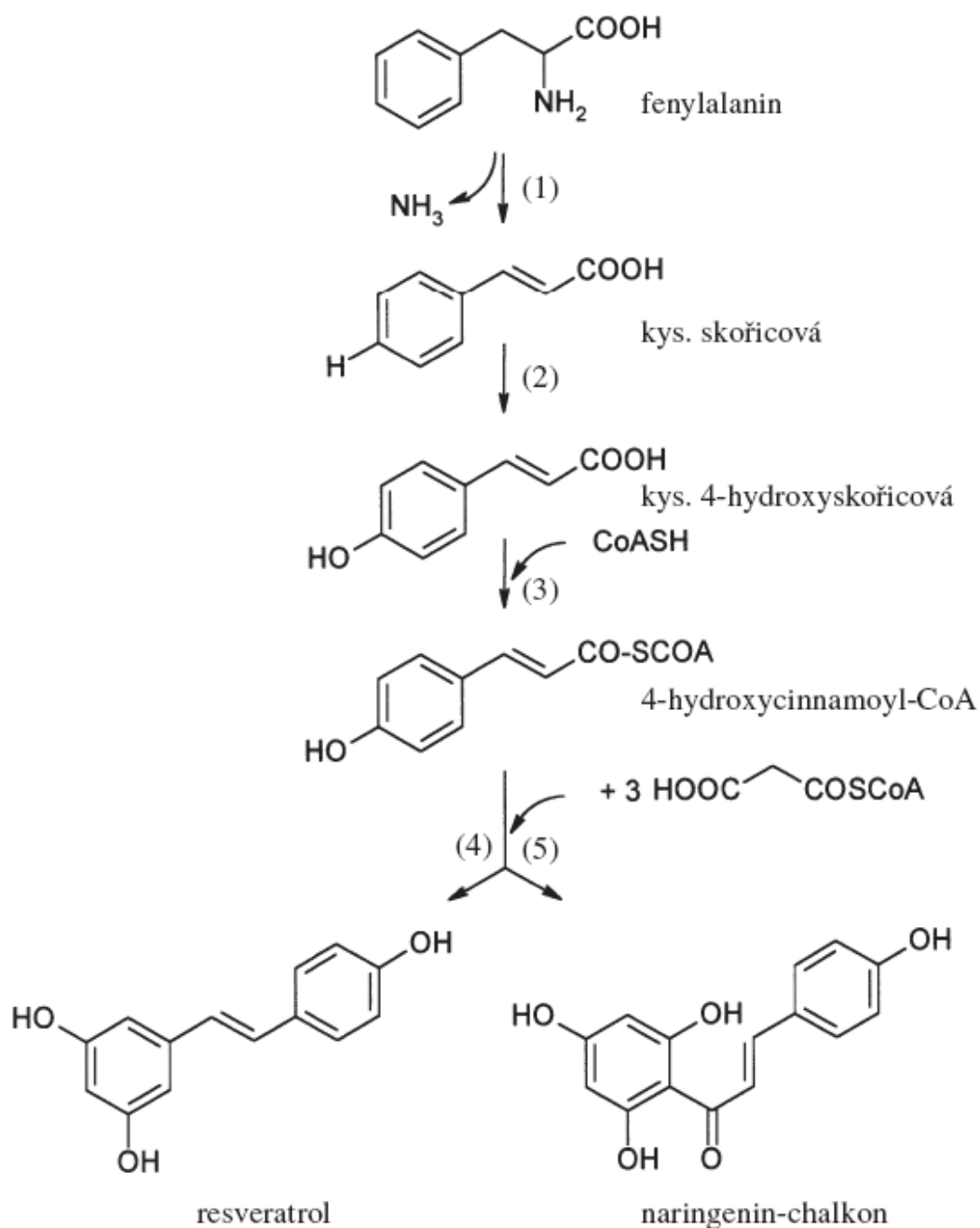
Resveratrol je sekundárním metabolitem. Tvoří se de novo nebo je tvorba stimulována v případě, že je rostlina vystavena extrémní zátěži. Tou je například ultrafialové záření, ozon, termické a mechanické poškození.

Jeho přesný význam není úplně jasný. Jeho tvorba je však součástí rezistence buňky. Bylo zjištěno, že po vystavení vinné révy patogenu či nějakému poškození, se maximální koncentrace RES vytvoří do 96 hodin, poté klesne a zhruba po šestnácti dnech je na původní úrovni. (2c)

3.1.5 Biosyntéza a syntéza resveratrolu

Prvotním prekurzorem je glykosid, z kterého vzniká bílkovina fenylalanin. Tato přeměna se nazývá Shikimatova reakce. Resveratrol vzniká přes kyselinu skořicovou a hydroxyskořicovou, hydroxycinnamoyl-CoA. Z něj kondenzací s malonyl-CoA vzniká resveratrol a uvolní se oxid uhličitý.

Obrázek 4 Biosyntéza resveratrolu



V kaskádě jsou jednotlivé reakce katalyzovány enzymy : (1) fenylalanin-lyáza, (2) cinnamát-hydroxyláza, (3) kumarát-CoA-ligáza, (4) trihydroxystilben-syntáza, (5) naringenin- syntáza

Zdroj: Chemické listy 95, str. 605 (2001)

Resveratrol je poměrně dost citlivý na kyslík, tudíž jeho izolace z rostlinného materiálu je velmi složitá a pracná.

Například vědec Takao se snažil získat resveratrol z kýchavice. Převodem na fenolickou sloučeninu a následnou metylací na methyletherresveratrol a oxidací chromovým oxidem vznikla kyselina dimethoxybenzoová a methoxybenzoová. Na základě tohoto rozkladu určil resveratrol jako trihydroxystilben.

Vědec Spath se zabýval stilbeny. Ze santalového dřeva připravil pterostilben ethylether, jež byl shodný s trimethyletherem resveratrolu. Syntetizoval RES kondenzací natriumhydroxyfenylacetátu a dihydrocybenzaldehydu.

Vznikl produkt, který dekarboxylací následně kyseliny poskytl RES.

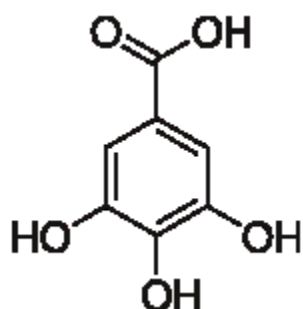
Až po padesáti letech od těchto počátečních syntéz zaujal resveratrol natolik, že vědci měli potřebu získat jeho větší množství. Izolovat ho z rostlinného materiálu se ukázalo jako složité, pracné a s malým výtěžkem. Výše uvedenými způsoby připravíme pouze kolem 1 gramu čisté látky. Jsou potřeba také poměrně exotické rostliny. Navíc není prozatím znám meziprodukt, ze kterého by se pokračovalo. Musí se tedy připravit de novo. (2d)

3.1.6 Polyfenoly

Polyfenoly či fytoalexiny se zprvu začaly studovat hlavně tam, kde rostla běžně vinná réva a užívala se ve formě nápoje - vína. Byly to tedy oblasti Španělska, okolí Barcelóny, taktéž Itálie a Francie v oblasti Bordeaux. Výchozími sloučeninami byly kyselina dehydroacetová, která byla konvertována na orcinol, jež byl přeměněn na diacetylorcinol a ten pak bromován. Reakcí s trifenylfosfinem se připravil diacetoxybenzyltrifenylfosfonium-bromid, z něj pomocí metanolu byl připraven dihydroxyderivát, a ten Wittingovou reakcí (s benzaldehydem) dal vznik trans-resveratrol. (2e)

Dnes je již známa spousta dalších syntetických reakcí.

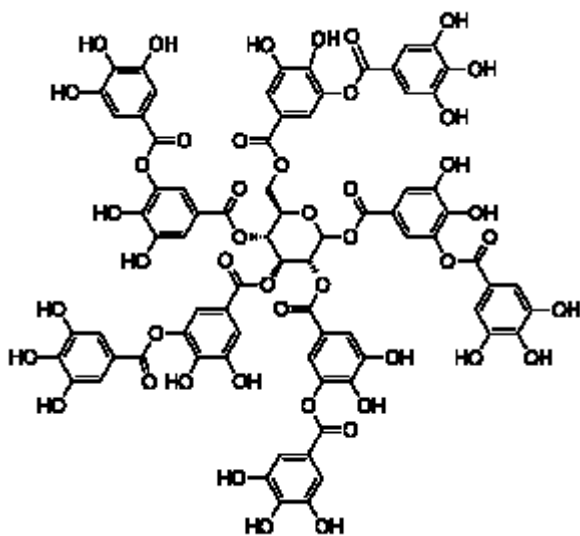
Obrázek 5 Kyselina gallová-základ polyfenolů



Zdroj:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0d/Gallic_acid.svg/150px-Gallic_acid.svg.png (27.2.2014)

Obrázek 6 Polyfenol z kondenzace kyseliny gallové



Zdroj:

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/65/Tannic_acid.svg/290px-Tannic_acid.svg.png (27.2.2014)

3.1.7 Nové poznatky a využití

Dnes se nabízí celá řada preparátů obsahující tuto látku. Populární je především v USA a Evropě. Potravní doplňky obsahují buď čistý resveratrol nebo směs polyfenolů. Často je součástí různých vitaminových komplexů. Obsah resveratrolu je i není deklarován.

Zajímavé se však zdají být různé studie. Podle některých se zdá tato látka být zázrakem dnešní doby.

3.1.7.1 Vliv na kardiovaskulární systém a krevní krevní tlak

Zda podávání RES může zabránit zvýšení krevního tlaku (BP-blood pressure) je kontroverzní. Účelem studie bylo zjistit, zda RES tlumí zvýšený BP a zda se zapojí následné mechanismy vedoucí k adaptivní srdeční hypertrofii.

Jako hypertenzní modely byly použity krysy SHR skupina (The spontaneously hypertensive rat), krysy (Ang), u nichž byla hypertenze vyvolána podáním infuze angiotensinu. Porovnávala se standardní kontrolní dieta s konzumací stravy obsahující RES.

RES výrazně zabránil u obou skupin vzestupu systolického tlaku. Kromě toho zprostředkovaná vazodilatace byla výrazně patrnější u skupiny SHR s RES. RES také snížil sérum a hladinu peroxidačních lipidů a potlačil produkci superoxidu v lidských endotelových buňkách, jež byly prozkoumávány in vitro. Analýza mezenterické tepny od SHR a Ang-II skupiny myši ukázala, že RES zvýšil endoteliální syntázu NO (oxidu dusnatého), jež má právě velký vliv na vazodilataci krevního řečiště.

Navíc RES snižuje hypertrofický růst myokardu prostřednictvím snížení hemodynamického zatížení a inhibice p70 S6 kinázy pro hypertrofickou signální kaskádu. Celkově se ukázalo, že vysoké dávky RES snižují oxidační stres, zlepšuje funkci cév, tlumí vysoký BP a zabraňuje srdeční hypertrofii prostřednictvím zachování LKB1-AMPK-eNOS signalizační osy. (3)

3.1.7.2 Resveratrol a ethanol

Resveratrol byl v některých výzkumech dokonce navržen jako chemopreventivní látka proti karcinogennímu účinku ethanolu. Předpokladem byly pokusy založené na zvířatech, které ukazovaly, že resveratrol nad určité meze snížil výskyt nádorů

v několika místech souvisejících s rakovinou (tlustého střeva, jater, prsu u žen). Pomocí pravděpodobnostní metodiky, tzv. Monte Carlo type, byla odhadnuta denní doporučená dávka resveratrolu (dávka červeného vína) pro zvířata. Tato referenční dávka (BMD) sloužila jako výchozí údaj pro přepočítání na lidský organismus. Zjistilo se, kolik dávky červeného vína je projektivní (je patrný účinek resveratrolu) a také se určila zároveň dávka ethanolu v červeném víně, která naopak už škodí. (4a)

Nejlepším scénářem pro užití resveratrolu byla dávka s koeficientem 111, což znamenalo, že by člověk musel vypít denně 111 sklenic červeného vína. Je patrné i bez hlubších znalostí, že toto prakticky není možné nejen kvůli vysoké dávce ethanolu, ale i objemu tekutiny. Tímto výzkumem se potvrdil přínos této látky v oblasti onkologie. Taktéž se ale vyloučil alkoholický nápoj (konkrétně tolik propagované červené víno) jako prostředek, jak této protektivní dávky dosáhnout. Tudiž články o tzv. francouzském paradoxu, jež popisují víno jako tekutinu s preventivními a ochrannými účinky proti rakovině, je mylný a zavádějící a takováto reklama byla v některých státech zakázána. (4b)

3.1.7.3 Resveratrol a inzulín

Jedna studie také zkoumala na první pohled zvláštní kombinaci resveratrolu s inzulínem. Předpoklad byl, že obě látky spolu reagují synergicky a působí dobře na lidský organismus jak v prevenci, tak v léčbě mnoha chronických onemocnění. Dle studie spolu obě látky reagují v poměru 1:1, tvoří komplex (s konstantou vazby $1,03 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na 298 K). Vazba je spontánní a komplex vzniká exotermickou reakcí. Vodíková vazba a Van der Waalsovi síly hrají klíčovou roli v procesu vazby. Kinetické studie naznačují, že resveratrol s inzulínem snižuje polaritu kolem tyrosinu a ničí disulfidické můstky. Dimer inzulínu se depolymerizuje do monomeru a mění aromatické boční řetězce. Navíc inzulín zvyšuje stabilitu resveratrolu. Tato práce dala další podnět pro to, aby byly potraviny obsahující resveratrol zařazovány mezi zdraví prospěšné. (5)

U další studie byl resveratrol intenzivně zkoumán v oblasti diabetu a zvláště jeho komplikací, u kterých by mohl mít jeho účinek preventivní charakter. Prozkoumával se vliv na diabetickou neuropatii. Neurony jsou extrémně náchylné

k oxidačnímu poškození, které může být způsobeno jejich vysokou mírou spotřeby kyslíku a nízkou hladinou antioxidačních obranných enzymů.

Nejdříve se předpokládalo, že ochranným mechanismem resveratrolu u diabetické neuropatie je především schopnost vychytávat radikály. Nicméně nedávno se ukázalo, že mají vliv i další přidružené nebo samostatné mechanismy, jako je up regulace různých biochemických látek účastnících se ovlivnění buněk (Nrf2, SIRT1 a inhibice NF-kappa b a AP-1). Výzkum se zabýval neuroprotektivními účinky resveratrolu, které byly pozorovány u experimentálně vyvolané diabetická neuropatie, a vedl k možným vysvětlením mechanismů, které by mohly eventuálně v budoucnosti poskytnout podklady pro nové léky. Futuristické názory vědců napovídají, že resveratrol nebo jeho analogy s lepší biologickou dostupností budou využity v terapii již za pár let.

3.1.7.4 Vliv na termogenezi a hubnutí

Vliv resveratrolu na termogenezi v kosterním svalstvu a hnědé tukové tkáni byl zkoumán na krysách. Krysy byly krmeny vysokokalorickou stravou doplněnou resveratrolem (30 mg/kg/den). Podávání resveratrolu vedlo ke zvýšení genové exprese mitochondriální transkripce faktoru A (TFAM), cyklooxygenázy 2, sirtuinu 1, receptoru PPAR alfa, UCP bílkovin a mnoha dalších látek. Prozatím není zcela jasné, která látka konkrétně má hlavní vliv na hmotnostní úbytek. Nicméně příznivý dopad na termogenezi a úbytek hmotnosti byl potvrzen. (6)

Předmětem další studie byla hypotéza, že celoživotní suplementace resveratrolu působí proti věkem spojenému úbytku kosterního svalu skrze peroxizomem aktivované receptory gama (PGC) a alfa. Porovnávalo se to i s hypotézou, že RES může nahradit celoživotní pohyb. Prováděl se test na myších, porovnával se s kontrolní skupinou. Po určitém čase se prováděl test výkonnosti a test tolerance glukózy. Studie ukázala, že celoživotní cvičení zvyšuje aktivitu proteinů důležitých pro funkci kosterních svalů a resveratrol sám ani v kombinaci nesynergizuje tento efekt. (7)

3.1.7.5 Vliv na nervovou soustavu

Zkoumal se také vliv resveratrolu na nervovou soustavu. Konkrétně, jestli je tato látka neuroprotektivní či ne. Přestože neuroprotektivní účinky jsou spojovány s aktivací

sirtuinu 1 (jež je resveratrolem zvýšeně exprimován), užívání resveratrolu je u nervových poruch kontroverzní a předmětem sporů. Zkoumal se u dvou modelů roztroušené sklerózy: u experimentální autoimunitní encefalomyelitidy (EAE) a u Theilerovy encefalomyelitidy virově indukované (TMEV-IDD). Byly dvě skupinky laboratorních myší, jedna krmená resveratrolem a druhá bez resveratrolu. Překvapivým zjištěním bylo, že skupinky krmené potravou obsahující tuto látku měly mnohem těžší klinické příznaky těchto nemocí než kontrolní skupina.

Projevy na organismu se ukázaly být nejenom klinického rázu, ale také patrné při histologickém rozboru. Prozatímním závěrem tedy je, že výrazně zhoršuje demyelinizaci a zánět a je bez neuroprotektce v centrálním nervovém systému v obou modelech. Naše zjištění naznačují, že je třeba opatrnosti v potenciálním terapeutickém využití u jedinců s demyelinizačními onemocněními, včetně roztroušené sklerózy. (8)

3.1.7.6 Alzheimerova nemoc

Alzheimerova nemoc (AD) je charakteristická vznikem depozitů extracelulárního amyloidu, neurofibrilárních vláken, synaptických ztrát, zánětem a rozsáhlým oxidačním stresem. Polyfenoly, které zahrnují resveratrol, deriváty kyseliny gallové a kurkumin, získaly značný zájem pro svou schopnost snížit tyto příznaky onemocnění a pro svou schopnost zpomalit kognitivní pokles. Ačkoliv jejich antioxidační a volnoradikálové vlastnosti jsou velmi dobře popsány, nedávnými výzkumy polyfenolů byly prokázány další významné účinky, včetně anti-amyloidní činnosti, buněčné signalizace, vliv na délku telomer a modulace sirtuinových bílkovin.

Výzkumy, jež se zaměřovaly na účinky polyfenolů z různých přírodních a umělých zdrojů na stárnutí mozku, neurodegeneraci a zkoumaly jejich mechanismy účinku s důrazem na úlohu, kterou mohou hrát sirtuiny, jsou prozatím rozporuplné.

Na buněčné úrovni došlo při experimentech ke zlepšení, ale v klinických pokusech ne, spíše naopak ke zhoršení mnoha onemocnění souvisejících s nervovou soustavou. (9)

3.1.7.7 Vliv na dysfunkci slinné žlázy

Ve studii byl zkoumán účinek resveratrolu na radiací indukovanou dysfunkci slinné žlázy u myší. Celkem byly náhodně vytvořeny čtyři skupiny (I, II, III, IV). Skupina (I) vystavena pouze rozpouštědlu, skupina (II) taktéž bez vystavení radiaci, avšak RES

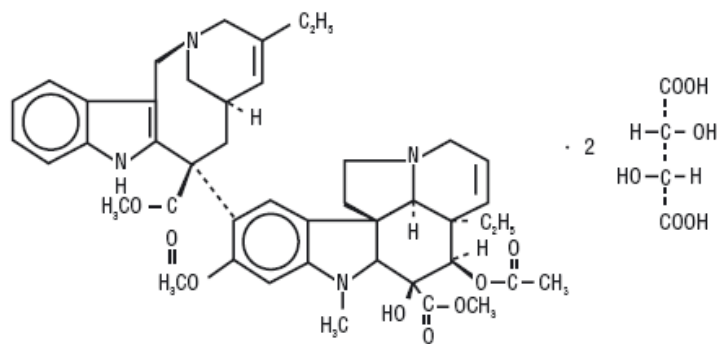
ošetřená (20mg/kg/denně), skupina (III) 15 Gy ozářená s rozpouštědlem, skupina (IV) 15 Gy a 20 mg/kg/d RES. RES u (II) a (IV) byl podáván intraperitoneálně 3 dny před ozářením. Zkoumání slinné žlázy bylo provedeno na biochemické, morfologické, imunohistochemické úrovni v 8 hodin, 24 hodin a po 30 dnech po lokalizovaném ozářením. Radiace způsobila snížení sekrece slin, amylázové aktivity, superoxid dismutázy a zvýšení malondialdehydu.

Podle výsledků RES by mohl inhibovat přírůstek růstového faktoru 1, který je indukován radiací. RES podle všeho působil protektivně na slinnou žlázu a má do budoucna velký potenciál v léčbě radioterapií v klinické praxi. (10)

3.1.7.8 Resveratrol a rakovina

Vinorelbine (VNR), druhá generace protinádorového léku z alkaloidu vinca, způsobuje lokální žilní toxicitu, podráždění žil, zánět žil a nekrózu žil. Studie prověřovala, zda-li resveratrol může redukovat žilní poškození způsobené vinorelbinem. Lidské cévní endoteliární buňky byly vystaveny vinorelbínu po dobu deseti minut a potom byly kultivovány s médiem s nebo bez RES po dobu jednoho dne. Test byl použit ke zjištění počtu životaschopných buněk. VNR bez resveratrolu snižoval více životaschopnost buněk, způsoboval buněčnou apoptózu, vznikaly častěji radikály ROS a SOD. Nejvíce se životaschopnost zvýšila, jestliže se ještě před vystavením buňky nechaly dvě hodiny kultivovat v médiu s RES. Výsledky ukázaly, že resveratrol dokáže ochránit buňky před poškozením vyvolaným VNR. Může být proto v budoucnu terapeuticky využíván. (11)

Obrázek 7 Vinorelbin



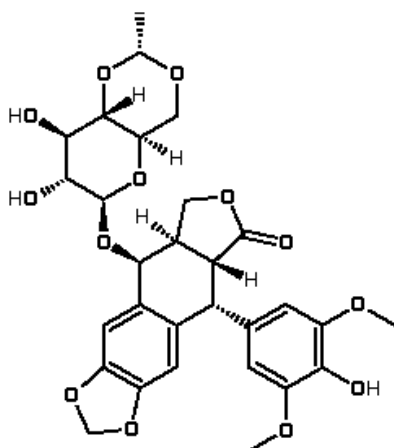
Zdroj: <http://www.rxlist.com/navelbine-drug.htm> (27.2.2014)

Cervikální neoplazie je jedním z nejčastějších druhů rakoviny u žen a je spojena s vysokým rizikem infekce lidským papilomavirem (HPV). V práci se analyzoval druh buněčné smrti indukované RES v několika liniích rakovinotvorných buněk děložního čípku. Podával se RES (150-250 mol/l) po 48 hod, docílilo se toho, že v G1 fázi buněčného dělení se zastavil růst buněk C33A, HeLa (HPV 18), CaSki, SiHa (HPV 16). Resveratrol indukoval apoptózu ve všech buněčných liniích, zejména v buňkách CaSki (papilomavirové). Prováděla se cytometrická analýza. Celkově poklesly buňky v sestupném pořadí buňky CaSki, HeLa, SiHa, C33A, CaLo. Tyto údaje ukazují, že RES napomáhá k apoptóze buněk rakoviny děložního čípku. (12)

Byla taktéž zkoumána schopnost RES zvyšovat antiproliferativní efekt etoposidu (cytostatikum, inhibitor topoizomerázy. Jeho indikací jsou např. leukemie, lymfomy, bronchogenní karcinom, nádory varlat) Konkrétně na jaterní karcinom a karcinom tlustého střeva působil antiproliferačně. Indikace se prováděla pomocí Western Blotu. Zajímavé je, že do určité dávky působil stejně cytotoxicky jako etoposid a nad ní RES zesiloval účinek, působil synergicky. Tudíž se možná do budoucna bude uvažovat o spojení těchto dvou látek v terapii.

Celkově se tato látka propaguje jako chemoprotektivní.

Obrázek 8 Etoposid



Hydroxy a methoxyskupina mají hlavní úlohu v účincích této látky. Modře označený etoposidový skelet včetně benzenové jádra zprostředkovává interakci ve vazbě na nádorovou buňku.

Zdroj : http://www.ilactr.com/img/atc_yapilari/L01CB01_3d.png (27.2.2014)

3.1.7.9 Melanomy a metastázy

Radioterapie (XRT) slouží ke zlepšení zdravotního stavu s diagnózou melanomu a pro paliativní léčbu metastáz. Klinické použití XRT u melanomu je často omezeno rozsahem choroby. Relativní radiorezistence melanomu může omezit účinnost XRT. Skupina subjektů v této studii a další již dříve prokázaly, že resveratrol zvyšuje radiační citlivosti k radiorezistentní rakovině prostaty.

V této studii byly hodnoceny dopady XRT v kombinaci s RES na linie buněk radioresistentního melanomu. Hodnotilo se šíření apoptózy buněk.

Zjistilo se, že procento kolonií proliferujících buněk a optická hustota buněk melanomu byly sníženy po přidání RES XRT (XRT/RES). Relativní aktivita kaspázy-3 (enzym určený k apoptóze špatných buněk) v melanomu buňky byla zvýšena po přidání RES XRT (XRT/RES). Vyšetřovaly se možné molekulární mechanismy vedoucí ke snížení šíření buněk a ke zvýšené apoptóze pomocí reverzní transkriptázy polymerázové řetězové reakce a imunohistochemického barvení. Anti-proliferativní účinek XRT/RES koreluje se sníženou expresí pro proliferativní molekuly cyklin B, cyklin D, cdk2 a cdk4. Pro apoptické účinky XRT/RES korelují se snížením exprese anti-apoptické molekuly FLIP, Bcl-2 a survivinu.

Tyto údaje naznačují, že RES zvyšuje radiační citlivost buněk melanomu inhibicí proliferace nádorových buněk a podporuje apoptózu. RES může mít potenciální roli v senzibilizaci k záření pro léčbu melanomu. (13)

3.1.7.10 Vliv na lipogenezi a cirkadiánní systém

U savců je hlavní složkou cirkadiánního systému (našich vnitřních hodin v těle) suprachiasmatické jádro v hypotalamu. Cirkadiánní hodiny jsou ale také ve většině periferních tkáních včetně tukové. Cílem této studie bylo analyzovat účinky RES na změny indukované vysokokalorickou potravou v expresi genů cirkadiánního systému a těchto genů v bílé tukové tkáni krys. Pro tyto účely byly krysy rozděleny do tří skupin: Kontrolní skupinu, jež byla krmena standardní stravou, skupinu s vysokokalorickou stravou (HF) a skupinu s vysokokalorickou stravou s RES. Expresie obou typů genů byla analyzována prostřednictvím RT - PCR (polymerázovou řetězovou reakcí). Expresie proteinů a enzymu mastných kyselin (FAS) byla také sledována. Po porovnání skupiny kontrolní s RES a HF, RES skupina ukázala podobné odpovědi jako skupina HF,

s výjimkou reverzního viru alfa (REV- Erb alpha), jež byl snížen. Zdá se, že tento mechanismus má v tukové tkáni význam a slouží ke snížení lipogeneze. (14)

3.1.7.11 Vliv na těhotenství

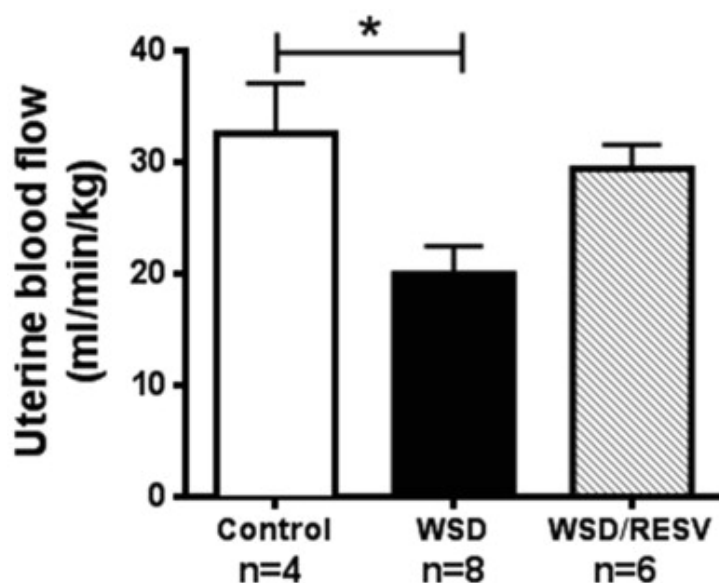
Suplementace potravy resveratrolem (RES) získala pozornost vědců také jako možnost potenciální léčby obezity a metabolických onemocnění. Studie se pokoušely u primátů (NHPs-nonhuman primate) dokázat, že konzumace vysokokalorické západní stravy během těhotenství (WSD) redukuje děložní průtok krve, zvyšuje pravděpodobnost děložního zánětu a riziko narození mrtvého dítěte a vede u plodu k jaterní steatóze. Předpokládali jsme, že pokud je podán těhotné (NHPs) RES, dojde ke zmírnění komplikací matky a plodu.

Studie využila jako primáty samice makaků. Makaky rozdělila do tří skupin dieta: Kontrolní (n = 29, CON; 14 % kalorií z tuku), WSD (n = 33, 35 % kalorií z tuku) a WSD/RESV (n = 6, WSD potrava doplněná 0,37 % RES před a v průběhu těhotenství). Metabolické parametry byly měřeny v pravidelných intervalech Dopplerovým ultrazvukem. Zánět placenty a jaterní triglyceridy vyhodnotila imunostanovení. Proliferace slinivky a jejích ostrůvků byla analyzována imunofluorescenčně.

Suplementace resveratrolem měla za následek značné zhubnutí u matky, zlepšení inzulínové rezistence, obnovení děložního průtoku a snížení placentárního zánětu ($p < 0,05$ pro všechny). RES prostoupil přes placentu, vstoupil do fetálního oběhu a snížil u plodu depozita jaterních lipidů, i přes to ale bez vlivu na cirkulující hladiny volných mastných kyselin. Fetální tělesná hmotnost byla beze změny u RES vs. WSD a CON zvířat. Hmotnost slinivky se zvýšila o 42 % včetně významné proliferace a současně nedošlo k žádnému zvýšení hmoty ostrůvků.

RES strava zlepšila mnohé škodlivé účinky spojené s WSD spotřebou. Na druhou stranu je znepokojující dramatický nárůst hmotnosti slinivky u plodu. Díky tomuto zjištění jsou nutná další šetření, než se bude resveratrol užívat v klinickém použití v této indikaci. (15)

Obrázek 9 Děložní průtok



Zdroj: Novakovic a kol., 2014

3.1.7.12 Hojení ran

Cílem této studie bylo zjistit velikost vlivu resveratrolu na hojení rány po laparotomii u kryš. Studie byla provedena na dospělých samicích kryš vyšlechtěného druhu Wistar Albino.

Studijní skupině byl resveratrol podáván orální cestou 0,5 mg/kg jednou denně po dobu 7 dní před plánovanou operací a pak byla podávána udržovací dávka během celé studie. Každá krysa byla podrobena anestézii a byla jí provedena laparotomie 4 cm. Deset zvířat z každé skupiny bylo obětováno na pooperační vyšetření po sedmi a čtrnácti dnech. Byla provedena analýza pevnosti v tahu, byly měřeny hladiny hydroxyprolinu a břišním řezem byly histologicky zkoumány rány. Podávání resveratrolu významně zvýšilo pevnost břišní fascie a zvýšené hladiny hydroxyprolinu se objevily zhruba po 14 dnech.

Z hodnot akutního zánětu, depozice kolagenu a neovaskularizace po 7 a 14 dnech po operaci bylo zjištěno, že výrazně vyšší hodnoty jsou ve skupině resveratrolu v porovnání s kontrolní skupinou. Množství granulační tkáně a zralých fibroblastů bylo výrazně vyšší po 14 dnech v léčené skupině.

Zjištění ukazují, že resveratrol může mít příznivý vliv na hojení ran.(16)

3.1.7.13 Deprese

Tato studie se zaměřila na zkoumání antidepresivního potenciálu resveratrolu a možné mechanismy účinku. Poškození buněk bylo vyvolané kortikosteroidem (CURT) a detekovalo se skrz životaschopnost buněk a obsahu laktátdehydrogenázy (LDH) a malonaldehydu (MDA).

Potkani byli tři týdny vystavováni chronickému nepředvídatelnému mírnému napětí (CUMS). Byla u nich testována a blíže zkoumána jak deprese patrná na jejich chování, tak hypothalamohypofyzární systém.

Kromě inhibičního účinku na produkci MDA in vitro a in vivo výsledky ukázaly, že RES v hladinách (10(-10) mol/L na 10(-5) mol/L) by mohl výrazně zvýšit životaschopnost buněk a snížit aktivity LDH a že RES (15 mg/kg) v léčbě by mohl zmírnit deprese u potkanů vystavovaných CUMS. Ukazatelem bylo zvýšené využití cukrů z potravy a snížení nepohyblivosti při testu nuceného plavání ve vodě a zátěžový test.

Potkani, kteří měli v potravě RES, měli mnohonásobně méně kortikoidu v plazmě a tudíž byla méně ovlivněna hypothalamohypofyzární osa a její odpověď, jež má v konečném důsledku významný vliv na psychické rozpoložení jedince. Tudíž se zkoumá jeho mechanismus hlouběji pro pozdější využití v léčbě. (17)

3.1.7.14 Kostní úbytek

Určité výzkumy se zabývaly také otázkou, jestli dokáže léčba resveratrolem tlumit sublesionální kostní ztrátu v poraněné míše potkanů.

Osteoporóza předurčuje možnost vzniku poranění míchy (SCI) díky zvýšenému riziku vzniku drobných mikrotraumat, jež vedou až ke zlomenině. Cílem této práce bylo zjistit vliv léčby s resveratrolem (RES) na sublesionální kostní ztrátu poraněné míchy krysy. Léčba s RES (400mg/kg/den) byla zahájena 12 hodin po operaci po dobu 10 dní.

Krev byla shromažďována a stehenní kost (femur) a hleň (tibia) byly odstraněny pro hodnocení účinků RES na kostní tkáň poté, co byla SCI.

Léčba resveratrolem u krysy s SCI abránila snížení kostní hmoty včetně minerálního obsahu a kostní denzity kostního minerálu v holeních, byla zachována struktura kostí

včetně trabekulárního objemu kosti, trabekulárního čísla a trabekulární tloušťky holení a konzervované mechanické pevnosti včetně konečného zatížení, ztuhlosti a energie ve stehenní kosti.

Léčba SCI potkanů pomocí RES aplikované do stehenní kosti vedla ke snížení malondialdehydu a IL-6 na mRNA úrovni. Léčba SCI krysy s RES potlačila up regulaci PPAR na mRNA úrovni, specifické tukové vazby mastných kyselin vázících se na bílkoviny a lipoproteinové lipázy a obnovila mRNA regulaci úrovně Wnt1, vztahující se k lipoproteinu bílkoviny 5, Axin2, ctnnb1, inzulínu jako růstového faktoru 1 (IGF-1) a receptoru pro IGF-1 ve femuru a holeněmi.

Závěrem léčby resveratrolem je, že došlo k prokazatelnému oslabení ztráty sublesionální kostní hmoty v míše poškozené krysy, spojené nejspíš s oslabením oxidačního stresu, lehčím zánětem, sestupem PPAR signalizace a obnovení Wnt/-catenin a IGF-1 signalizace.

Léčba s resveratrolem tedy tlumí sublesionální kostní ztrátu ve zraněné míše potkanů.
(18)

3.1.7.15 Antimikrobní /Antibiotická aktivita

Tvorba biofilmu úzce souvisí s bakteriální infekcí a je také častým mechanismem vzniku rezistence. Proto vytvoření tzv. antibiofilmového přístupu poskytuje alternativu k antibiotikům v léčebné strategii.

V této studii se zkoumal účinek resveratrolu (1) a jeho pěti oligomerů. Jmenovitě epsilon-viniferin (2), suffruticosol A (3), suffruticosol B (4), vitisin (5) a vitisin B (6) na tvorbu antibiofilmu u bakterií. Byly nasazeny proti bakteriálním infekcím rodu enterohemorragická *Escherichia coli* O157: H7 a *Pseudomonas aeruginosa* PA14. U vitisinu B (6), stilbenového tetrameru, bylo zjištěno, že inhibuje biofilm s největší účinností, o více než 90 %, proto by mohl mít časem zařazen mezi antimikrobní léčbu v praxi. (19)

3.1.7.16 Retina

Oxidační stres je jedním z hlavních faktorů, které vedou světločivné buňky k apoptóze. Zkoumalo se, zda resveratrol, propagovaný také jako silný antioxidant a aktivátor

malých molekul FoxO dokáže být neuroprotektivní vůči světločivným buňkám z odchlípené sítnice (RD – retinal detachment) hlodavce.

Z dospělých usmrcených vyšlechtěných potkanů Brown byla odejmuta sítnice subretinální injekcí natrium-hyaluronátu. Zvířata byla denně léčena resveratrolem, jež byl podáván na speciálním nosiči (20mg/kg) intraperitoneální injekcí. Apoptóza fotoreceptorů byla posuzována na základě počítání počtu apoptotických buněk s TdT-dUTP terminálním nick-end označením (TUNEL) a měřením tloušťky vnější vrstvy jádra (NVS) 3 dny po RD. Změny v expresi FoxO1a, FoxO3a, a FoxO4 byly analyzovány pomocí western blotu. Činnost enzymů kaspázy 3,8 a 9 a jejich štěpení byly podrobně studovány. Tři dny po odchlípení sítnice, byly výrazně aktivovány kaspázy 3, 8, a 9. Léčba s resveratrolem zvýšila expresi FoxO1a, FoxO3a a FoxO4 bílkovin v odchlípené sítnici. Léčba snížila aktivaci vnitřní a vnější kaspázy apoptotických drah vyvolanou RD. Léčba resveratrolem reguluje FoxO rodiny a blokuje aktivaci kaspázy 3, 8 a 9. Resveratrol má tedy vysoký potenciál sloužit v budoucnu v indikaci prevence ztráty zraku u nemocí sítnice a různých pooperačních stavů sítnice. (20)

3.2 Teorie stárnutí

3.2.1 Teorie volných radikálů

Volné radikály můžeme definovat jako skupinu atomů, molekul, iontů, jež mají v elektronové sféře nepárový elektron. Díky tomuto elektronu jsou nestálé a velmi často reagují s jiným atomem, vyvolávají řetězovou reakci, která je ukončena až jejich neutralizací. Vytvoří se neradikálová částice. Vznikají různými procesy.

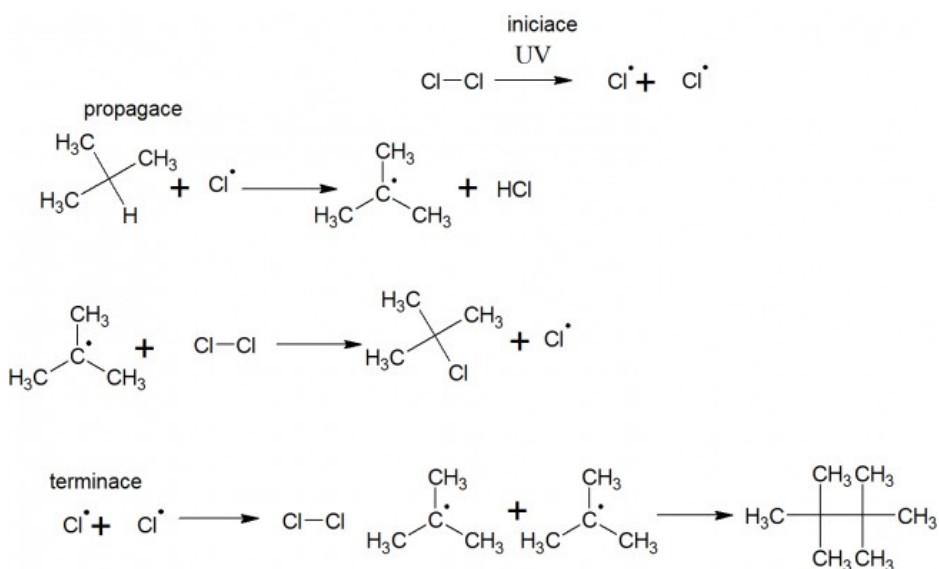
Z fyzikálních procesů je to záření, roentgenové, ultrafialové nebo radioaktivní. Volné radikály, vznikající jako důsledek ultrafialového záření, nemají téměř vliv na přirozeném stárnutí, jelikož záření proniká pouze do svrchních hloubek kůže a k orgánům nepronikne, avšak předčasné stárnutí indukovat může. V opakovaném ozařování se ale může objevit tzv. radiační syndrom. Objeví se patologické abnormality, jež vypadají jako zrychlené stárnutí.

Urychlené stárnutí prostřednictvím radikálů může být zprostředkováno též špatným životním prostředím, potravou, vodou a vzduchem.

Volným radikálům se přisuzují četné poruchy, jež vznikají v organismu. Podle několika teorií patří volné radikály jako jedna z hlavních příčin stárnutí a také se jim přisuzuje úloha při vzniku mnoha chorob včetně rakoviny.

Reakci volných radikálů můžeme rozlišit na iniciaci, což je zahájení reakce. Poté propagaci, v níž volné radikály reagují s dalším atomem a nakonec terminaci, jež dává vznik neutrální molekule. Radikál tímto zaniká a mění se ve stabilní molekulu, iont, atom. (21)

Obrázek 10 Radikálová reakce



Zdroj:

http://www.ceskachemie.cz/var/ceskachemie/storage/images/media/images/vzorce/27937-1-cze-CZ/vzorce_large.jpg (27.2.2014)

V organismu vznikají za běžných podmínek životními pochody, u nichž se získávají látky a energie, například štěpením. Dále například některými chemickými reakcemi, často po vniknutí cizorodých látek.

Působení volných radikálů v organismu je široké, působí na tuky, nukleové kyseliny i bílkoviny. Zkrátka všechny stavební makromolekuly jsou jimi ovlivňovány. Jejich reakcí vznikají mezi těmito částicemi nové vazby, mohou měnit enzymatickou aktivitu, buněčné funkce, ztrátu genetické informace a mnoho dalšího.

Živé organismy se brání různě. Enzymatickou cestu můžeme považovat za tzv. vnitřní ochranu buněk. Děje se tak pomocí superoxiddismutázy a peroxidázy.

Ochrana prostřednictvím potravy reprezentuje neenzymatickou cestu. Jako antioxidantní látky (scavengery) se uplatňují karotenoidy, kyselina askorbová (vitamin C), tokoferol, melatonin. Abychom účinek co nejvíce maximalizovali, je vhodné posilovat ochranu buněk enzymaticky i neenzymaticky zároveň.

Enzymatickou cestu můžeme podpořit kofaktory jako je selen a zinek. Musíme ale upravit jejich formu na vhodnou, jinak mohou působit toxicky. Neenzymatickou cestu podpoříme vitaminy C, A, E. U vitamínů rozpustných v tucích musíme dávat pozor na předávkování.

Tabulka 2 Přehled látek posilující obranu proti volným radikálům

antioxidancia

• kyselina askorbová (vitamín C)
• alfa - tokoferol (vitamín E)
• beta - karotén (vitamín A)
• glutathion
• kyselina močová
• 2-mercaptoethylamin
• BTH
• ethoxyquin

kofaktory antioxidantních enzymů

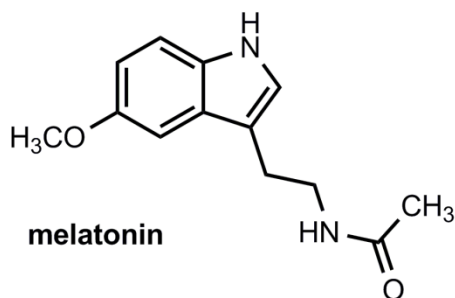
• Se, Cu, Zn, Mn

Zdroj: :
http://apps.faf.cuni.cz/Gerontology/mechanisms/theory/theory_contemporary.asp ,
12.1.2014

3.2.2 Neuroendokrinní teorie stárnutí

Tato teorie předpokládá, že řídicím centrem je epifýza, jež je součástí endokrinního systému. A hlavním působkem je melatonin. Tato teorie je součástí tzv. pacemakerových teorií stárnutí.

Obrázek 11 Chemická struktura melatoninu



Zdroj:<http://cenblog.org/the-haystack/2011/06/lazy-cakes-and-melatonin-the-sleepy-snack/> (27.2.2014)

Na konci padesátých let se začalo mluvit o melatoninu poprvé a zpočátku se mělo za to, že je to celkem nepotřebná látka, neřídící žádné důležité funkce v organismu a jeho úloha je jen zastoupena u obojživelníků (zabarvení jejich kůže). Zkoumáním fyziologie organismů později ukázalo, že tato látka má hlavní úlohu v řízení biorytmů.

Až v poslední dekádě se ukazuje, že by mohl mít vliv na stárnutí.

V knize *The Melatonin Miracle / Zázrak melatonin* vydané v USA je popisován jako zázračný lék proti rakovině, stárnutí a samozřejmě jako lék na poruchy spánku. Autoři jsou velmi známí gerontologové (Pierpaoli, Regelson a Coleman).

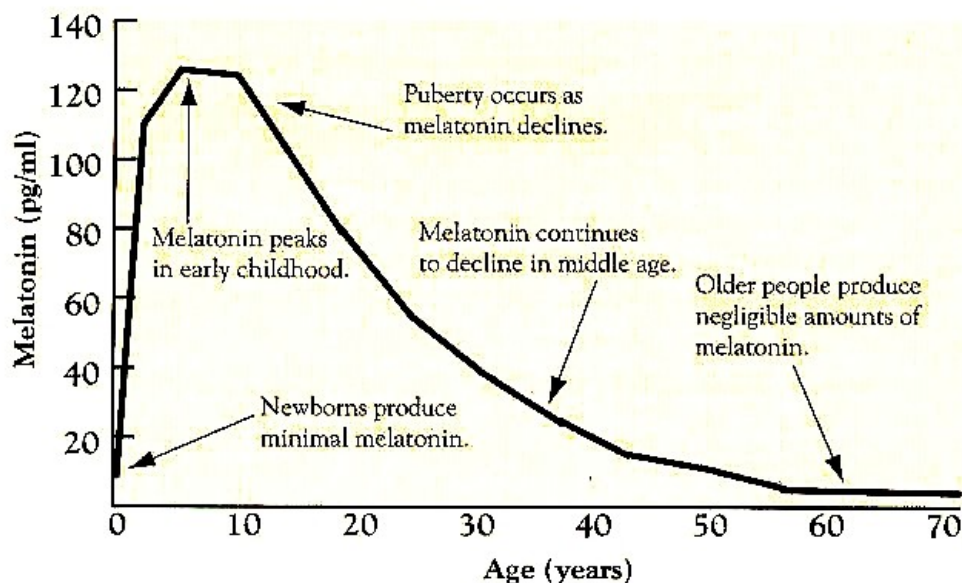
Prozatím to vypadá, že tento neurotransmiter je opravdu specifická látka, jelikož kromě zmíněných pozitivních výsledků nebyly zaznamenány žádné vedlejší účinky. Další výhodou je i ekonomická stránka a jeho dostupnost, lze jej dostat z rostlin i živočišného materiálu. Je chemicky stálý, rozpouští se lehce v tucích a trochu i ve vodě, podává se s jídlem.

Dle současných znalostí z fyziologie se melatonin interpretuje jako hormon v kaskádě epifýza-hypothalamus-adenohypofýza, jež nakonec ovlivní imunitní systém a většinu tkání. Zahrnuje řízení biorytmů, výživu buněk, regeneruje a reparuje tkáně, snadno

prostupuje do buněk a působí antioxidačně. Dokonce má chránit proti volným radikálům a tím pádem proti stárnutí.

Hlavním endokrinním orgánem je hypofýza, jež je v kontaktu s centrální nervovou soustavou (CNS). Funkčně ji můžeme rozdělit na adenohypofýzu a neurohypofýzu (přední a zadní lalok). Adenohypofýza produkuje mnoho hormonů, jež působí na žlázy a je řízena řídicími signály z centrální nervové soustavy, z hypothalamu, jež je řízen zase epifýzou. Epifýza produkuje melatonin, o který se zajímáme. Pinealocyty (buňky produkující melatonin) jsou spouštěny k produkci vnitřním časovačem závislým na fyzikálně-chemických vlastnostech a světle (melatonin je produkován ve tmě). Produkce klesá s věkem. Staří lidé mají leckdy pouhých 25% ve srovnání s hladinou v mladém věku. (21b)

Obrázek 12 Hladina melatoninu v závislosti na věku



Zdroj : <http://ceri.com/melaton.htm> (27.2.2014)

Celkové účinky, jež mají mít vliv na zpomalení stárnutí, se tedy přisuzují ovlivněním imunitního systému přes výše uvedenou osu CNS – hypothalamus – adenohypofýza – štítná žláza a ovlivnění tkání. A potom ovlivnění růstového hormonu a růstových faktorů. Celkově se zlepší zásobení tkání živinami, jejich stav, regenerace. Shrňeme-li to, měli by se zlepšit všechny hlavní parametry, jimiž je charakterizováno stárnutí. (21c)

3.2.3 Genetické teorie stárnutí

3.2.3.1 Mutační teorie

Jádrem této teorie bezpochyby je, že stárnutí je zapříčiněno nahromaděním mutací v lidských buňkách. Tato teorie se datuje k šedesátým létům, kdy se objevují tzv. cytogenetické metody. Patrné je, že s věkem počet mutací v chromozomech rapidně roste a to jak u člověka, tak u živočichů. Reparační mechanismy jsou zajištěny třístupňově. Probíhají opravy při špatné inkorporaci baze, párování bazí a také probíhá oprava po dokončené syntéze, tzv. postsyntetická oprava chyb. Spolehlivost může být snížena různými faktory. Například snížily se účinnost DNA-polymerázy (toto je typické pro rakovinotvorné buňky). Také se ukázalo, že na změny nemá až tak vliv přeměna proteinů acetylací, fosforylací, glykosylací, metylací a podobných chemických zásahů.

Tato teorie obecně podporuje myšlenku, že stárnutí jde ruku v ruce se zpomalením v opravách důležitých procesů v našem organismu.

3.2.3.1.1 Teorie mutací mitochondriální DNA

Tento druh mutací je zpravidla druhu delečního. Předpokládá se, že mitochondriální mutace DNA zapříčiňují citlivost membrán mitochondrií k poškození produkty metabolitů, k porušení funkcí a tím pádem se i zrychlí procesy degenerace a stárnutí buněk.

Větší počet genů zasáhnou právě chromozomové mutace. Vyskytují se jak v pohlavních buňkách, tak v somatických buňkách. Chromozomové mutace zasáhnou více buněk najednou a jejich porucha je tedy funkčně významná. Projeví se porušenou funkcí tkáně, orgánu dokonce i celého organismu.

V poslední dekádě se také zaměřila pozornost na genetické poruchy, jež se týkají syndromů, které se dávají do souvislosti s předčasným stárnutím. Například Fanconiho anémie nebo Bloomův syndrom jsou nejspíš způsobeny malou ochranou proti kyslíkovým radikálům. Poté jsou syndromy, na kterých se podílí vliv vnějšího prostředí a genetika zároveň. Z neznámějších bych uvedla systémový lupus erythematosus. Byla u něj prokázána citlivost nukleární DNA k volným radikálům, které mají nejspíš hlavní

podíl na poškození. Dalším faktorem může být i dieta (nenasycené tuky) a množství radikálových reakcí.

Za zmínku stojí i Hutchonsonův syndrom (progerie), Wernerův syndrom, Downův syndrom z části a xeroderma pigmentosum. (21d)

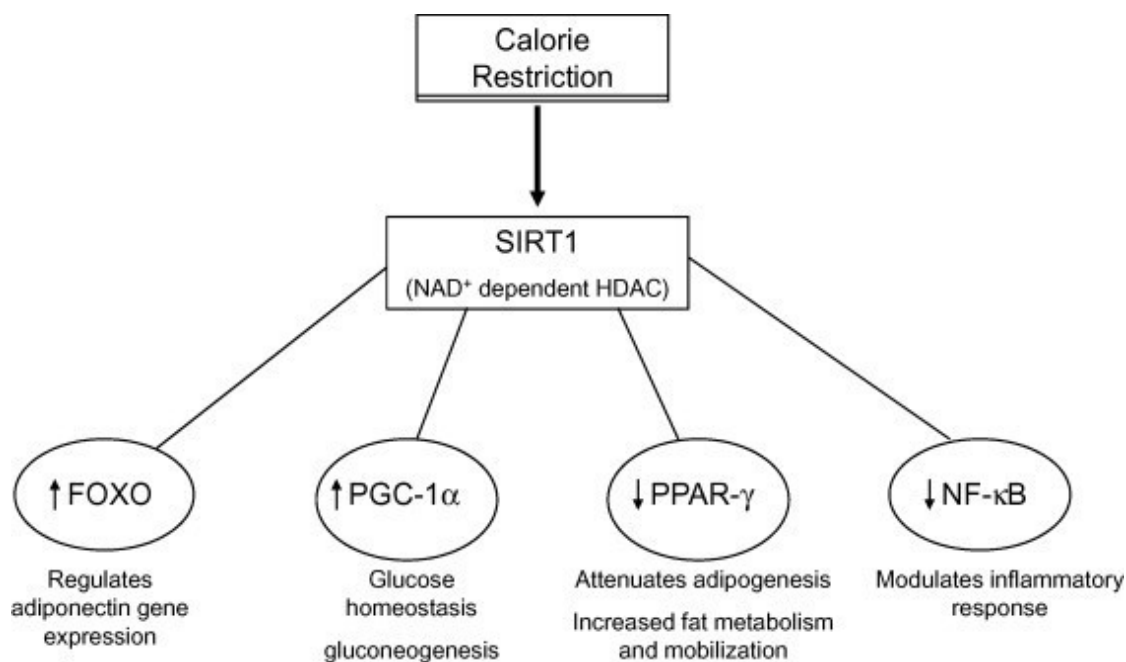
3.2.4 Sirtuiny a omezení příjmu kalorií

Od třicátých let 20. století řada vědců prováděla pokusy na zvířatech (zejména na octomilkách, hlodavcích, opicích) a snažila se jim nějakým způsobem prodloužit průměrnou délku života. Nadějně vypadaly výsledky studií, v nichž se drastickým snížením kalorického příjmu v potravě podařilo zvýšit odolnost zvířat k nemocem a prodloužit jejich věk. Tyto překvapivé výsledky se daly postupem času do souvislosti s tzv. sirtuiny.

Sirtuiny (SIR, silent information regulators) patří do skupiny HDAC a specifické pro ně je, že k hydrolýze potřebují přítomnost oxidované formy NAD (nikotin adenin dinukleotid). To je koenzym obsahující dvě molekuly ribózy a dvě molekuly fosfátů. Poněvadž aktivita sirtuinů je závislá na oxidované formě NAD a to má klíčovou roli v metabolismu a produkci energie, jsou spojovány s těmito procesy. Regulují metabolismus a procesy stárnutí.

Omezení kalorického příjmu je logicky spojeno se sníženým příjmem glukózy, dojde tedy ke zpomalení spalování (metabolismu) a sníží se i produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Protože se během kalorického omezení živin příjem glukózy sníží, sníží se i redukovaná forma NAD (NADH) a zvýší se poměr NAD ox./NAD red. formy a v tuto chvíli se aktivují sirtuiny. Omezení příjmu potravy je tedy pomocí sirtuinů hlavním spouštěčem procesů, jež chrání buňky, zvýší jejich odolnost vůči DNA poškození a stresu a tím dochází ke zpomalení stárnutí a vzniku chorob spojených se stářím (diabetes mellitus 2, obezita, srdeční selhání, rakovina). (22)

Obrázek 13 Aktivace sirtuinů nízkokalorickým příjmem a jejich vliv na organismus



Zdroj: David Sinclair, FOXOs and Sirtuins in Vascular Growth, Maintenance, and Aging

Vedlejším produktem buněčného dýchání jsou kyslíkaté radikály (ROS). Podle mnoha teorií stárnutí jsou považovány za primární příčinu stárnutí. Mnoho látek proti nim přímo působí, například peroxidázy, katalázy, také vitamín C a E a jiné antioxidanty. Přesto oxidativně poškozují buňku včetně DNA. Nejvíce kyslíkaté radikály produkují mitochondrie, z orgánů je to mozek a tím pádem vznikají poruchy jako Alzheimerova nemoc či sclerosis multiplex. Jestliže množství ROS v buňce přesáhne určité množství, pak jsou aktivovány právě sirtuiny. Snaží se vzniklé ROS snížit a tělo tak detoxikovat.

Není pouze jeden typ sirtuinů, existuje jich celá řada. U lidí je prozatím známo sedm homologů (SIR 1-7) a u kvasinek pět. Prvním objeveným byl SIR 2 u kvasinek. Ovlivňují celou řadu buněčných pochodů už proto, že se nacházejí v různých částech buněk a tudíž deacetylují rozličné substráty. Jsou mezi sebou ovlivňovány.

Nejvíce informací zatím máme o SIR 1, je v jádře či cytoplasmě a má cca 115kDa. Mezi jádrem a cytoplasmou se dokáže přesunovat v závislosti na stresu. Přemístění je zajištěno fosforylací pomocí c-Jun N-terminal kinázy. Deacetyluje mnoho proteinů a seznam se neustále zvětšuje. Zvýšená exprese snižuje obezitu, protože upravuje aktivitu enzymu syntézy cholesterolu, 3-hydroxy-3-methylglutaryl- CoA syntázu a také

důležitých faktorů, liver-X-receptoru a farnesol-X-receptoru, jež jsou důležité navíc pro zjišťování koncentrace žlučových kyselin. Dále upravuje aktivitu PPAR receptoru, jež má také úlohu v ukládání tuků a zvyšuje toleranci glukózy vůči buňkám slinivky břišní.

V mozku jsou díky němu lépe chráněny neurony a axony, jež propojují neurony a zajišťují jejich vzájemnou komunikaci. Zajímavé však je, že u Huntingtonovy choroby je účinek nežádoucí. U alzheimera naopak SIR 1 nedovoluje oligomerizaci amyloidu. Zvyšuje enzym sekretázu, která štěpí prekursor amyloidu.

Významné jsou sirtuiny 1 u srdečních chorob. Díky snižování hladiny ROS, glukózy a aktivaci aktivátoru, jež vyvolává glukoneogenezi a oxidaci mastných kyselin. Potencují též prostřednictvím oxidu dusného vasodilataci, čímž rozšiřují koronární tepny a anižují riziko náhlé srdeční příhody a kornatění tepen. (22b)

3.2.4.1 Resveratrol aktivuje sirtuiny

Právě poslední zmíněná teorie se stala předmětem mého zájmu a v posledních dekádách se na ni soustředí vědci z celého světa. Za průkopníka a největšího propagátora můžeme považovat bezpochyby Davida Sinclaira. Tento vědec se zabývá mechanismy stárnutí v Paul F. Glenn Laboratories na Harvardské univerzitě.

Jedním z klíčových objevů Sinclaira byla myšlenka dát do souvislosti geny pro sirtuiny a délku života kvasinky. V laboratoři Leonard Guarante identifikoval klíčové SIR 2, které potlačovaly stárnutí kvasinek a také zprostředkovávají zvláštním mechanismem opravy organismu (určitou relokací SIR 2 proteinů do DNA). Snažil se poukázat na to, že aktivací genů pro sirtuiny se mohou ovlivnit mnohé procesy stárnutí i u savců.(23a)

V roce 2002 Sinclairovy laboratoře na Harvardu objevily klíčovou roli NAD⁺ biosyntézy na stárnutí. V roce 2003 jeho laboratoř publikovala nikotinamid jako fyziologický regulátor sirtuinů, konkrétně jako nekompetitivní inhibitor SIR 2 a SIR 1. Sinclair je také autorem "Mitochondrial Oasis Hypothesis", která zjednodušeně postuluje, že energetický systém a NAD v mitochondriích určuje přežití buněk navzdory genotoxickému stresu (tj. poškození DNA) nezávisle na stavu cytoplazmy nebo jádra. Také je známá jeho hypotéza (nazývána jako Xenohormesis hypothese)

uvádějící, že zvířata si vyvinula tzv. stresově signalizační molekuly s cílem získat předem upozornění na zhoršující se životní prostředí. (23b)

Sinclairovi je především připočítán objev sloučenin, jež aktivují sirtuiny v organismu. V září 2003 Howitz a Sinclair vydali vysoce citované články, že polyfenoly (například resveratrol) aktivují lidské SIRT 1 a prodlužují prokazatelně život kvasinky. Ve spolupráci s dvěma experty zkoumali podrobně průměrnou délku života a stárnutí dále na octomilkách. Publikovali četné práce o prodloužení životnosti jejich a také různých červů.

V nedávné studii v listopadu 2006 vydané Sinclairem se opět potvrdilo, že resveratrol působí na celkově na orgánové soustavy pozitivně. Pokusy probíhaly na myších, jež byly krmeny vysokokalorickou stravou. Obézní myši daleko rychleji umírali na kardiovaskulární kolaps, komplikace z diabetu a jiných civilizačních chorob souvisejících se špatnou výživou. Naopak myši krmené stejnou potravou jen doplněnou určitou dávkou resveratrolu byly daleko lépe chráněny před negativními důsledky nesprávné výživy a dožívali se podstatně delšího věku (v průměru o 15 %). (23c)

O tom do jaké míry ovlivňuje resveratrol stárnutí u vyšších organismů a člověka se vedou prozatím spory.

Nejlepší ověření účinnosti by bylo po provedení randomizované klinické studie, dvojité zaslepené na několika skupinách lidí, jež by žili ve stejném časovém úseku, na stejném místě a ve stejných podmínkách. Porovnali bychom potom průměrnou délku života skupin s a bez resveratrolu. Toto nelze prakticky provést. Jedná se o dlouhou dobu než by se daly výsledky vyhodnotit a také by bylo málo pravděpodobné, že by nám většina subjektů po celou dobu života zůstala žít na jednom místě a při stejných podmínkách. Takovéto studie se dají provést pouze v laboratorních podmínkách na nižších živočiších, jež se dožívají daleko kratší doby života, a tudíž je jednodušší u nich nastolit stejné podmínky a udržet je.

Proto se nabízí otázka nejen u ověření tohoto preparátu, ale i jiných anti-aging, jak získat nějaká relevantní data, která by mohla potvrdit účinnost různých preparátů.

Jednou cestou, jak zjistit, zda-li došlo ke zpomalení stárnutí či dokonce k reparaci organismu (omládnutí), by mohlo být určování vybraných indikátorů stárnutí. Tyto indikátory by popisovaly určité části dílčích systémů a celkově by nám podaly

informace o opravdovém stáří organismu, tzv. biologickém věku. Tyto indikátory by se použily před a po užívání přípravku. V následující části přiblížím testy pro určování biologického věku.

3.3 Kalendářní a biologický věk

3.3.1 Definice pojmů

V současnosti určujeme stáří organismu především tzv. kalendářním věkem. Doba, jež započítává od narození. Bohužel tato doba nepopisuje skutečný stav organismu, reálný stupeň opotřebení organismu nebo jeho dílčích soustav. U každého organismu probíhá rychlost procesů rozdílně. Rozdíly jsou patrné mezidruhově, ale i v rámci jednoho druhu si můžeme povšimnout rozdílné rychlosti stárnutí. Z gerontologického pohledu musíme použít jiné určení věku jedince, jež by nám lépe přiblížil skutečný stav organismu. Objektivita je důležitá například i pro vhodnou lékařskou péči, pro terapii a dávkování léků. Tuto objektivitu nám může zajistit právě biologický věk (BV). Nemůžeme jej definovat úplně snadno, na biologický věk má totiž vliv komplexnost procesu stárnutí ale také vliv vnějšího prostředí, nemoci atd. (24a)

Nemoci mají vůbec zvláštní roli na biologický věk. Biologický věk se zvyšuje ruku v ruce se stárnutím organismu, které je doprovázeno nárůstem četnosti onemocnění a ty zpětně ovlivňují stav organismu a tím i biologický věk.

Hodně obecná definice může znít, že biologický věk je stavem organismu v jeho kalendářním věku. Ten je dán fyzickými, psychickými a sociálními charakteristikami. Dle další definice je biologický věk je ohodnocení současného zdravotního stavu. (24b)

3.3.2 Biologický věk z hlediska teorií stárnutí

Zpravidla se při určování BV vybírají a měří vhodné veličiny, které nejdetailněji popisují stav organismu v závislosti na míře jeho zestárnutí. Poté data matematicky zpracujeme a vyjádříme biologický věk jedním číslem. Číslo charakterizuje BV jako průměrný kalendářní věk v populaci.

3.3.3 Postup při výběru souborů testů pro určování biologického věku

Je rozdíl, zda-li vybíráme vhodný test pro experimentální gerontologii či hodnotíme biologický věk u konkrétního lidského organismu.

Nás zajímá především test, jež by šel aplikovat na lidskou populaci. K tomuto měření byla vyvinuta spousta baterií testů.

Určitou nevýhodou může být, že se prozatím nedospělo ke standardizaci metodik a nemáme jeden test, jež by se užíval souhrně na všechny vybrané markery na všech pracovištích. Testy se musí přizpůsobit konkrétním cílům a programům. Současně se však můžeme pokusit zevšeobecnit postup, jak vybrat metodiku a stanovit vzorce po výpočet biologického věku.

Následují zpravidla tyto kroky :

Vybereme si veličinu, kterou budeme měřit. Tato veličina má teoretický význam a charakterizuje nějakým způsobem stárnutí. Veličina je vybrána podle možností daného pracoviště. Dále zjišťujeme, jakou má konkrétní závislost k chronologickému věku. Naším cílem je vyjádřit tuto závislost matematicky, určit korelační koeficienty a také zredukovat původní soubor na definitivní. Dále zvolíme vztah pro výpočet BV.
(24b)

3.3.4 Prakticky používané metody hodnocení biologického věku

Při výběru a sestavení baterie testů musíme najít zlatý střed mezi technickou náročností a co možná největším počtem veličin, jež bychom mohli testovat. Tímto docílíme nejlepšího popisu organismu. Také je důležité určit baterii tak, aby byla co nejmenší zátěž pro testovanou osobu.

Výzkumná baterie má mnohem více měřených veličin než testy určené pro praktické využití BV. Veličiny můžeme rozdělit podle mnoha kritérií, například na fyziologické, patologické, biochemické, antropometrické, psychologické, veličiny obsahující sociální statut, chování a jiné.

Veličiny, které se používají nejčastěji, jsou ty, u nichž se předpokládá blízká vazba na stárnutí a které jsou prakticky dobře změřitelné.

Nejčastějšími je krevní tlak, tep, vitální kapacita plic, zrak, sluch, parametry kůže a chrupu, biochemické testy včetně hladiny cholesterolu, triglyceridů a bílkovin v séru, hematologické parametry, reakční časy a potom také veličiny popisující stav intelektu, koncentrace a analýzy.

Baterie obsahuje zhruba jen deset vybraných veličin vybraných pracovištěm. Není v silách institutu/ pracoviště měřit rozsáhlejší soubor veličin.

Jako příklad baterie testů bych uvedla baterii užívanou v Leidenu (Holandsko), v Institutu preventivní medicíny

Není výjimkou, že se měří pouze jedna veličina, jelikož z teoretických poznatků se usuzuje, že jen ta jedna jediná bude mít pro daný experiment statisticky významná data.

Takto jsme postupovali i u našeho experimentu. Měřili jsme pouze veličinu, u které jsme předpokládaly významné výsledky.

Prakticky ovšem jednotlivé baterie testů obsahují nejčastěji jen kolem jedné desítky měřených veličin, vybraných podle možností a erudice pracoviště. Jako příklad uvádím baterii testů používanou v Institutu preventivní medicíny v Leidenu v Holandsku a baterii z univerzity v Kyotu navrženou doktorem Nakamurou. (24c)

Baterie I.

Měřené veličiny:

- Práh vnímání vysokých frekvencí zvuku
- Zraková ostrost
- Schopnost rozlišení obrazců
- Reakční časy
- Maximální dechová frekvence při zátěži
- Maximální spotřeba kyslíku při zátěži
- Maximální systolický tlak při zátěži
- Vitální kapacita plic

Baterie II.

Měřené veličiny :

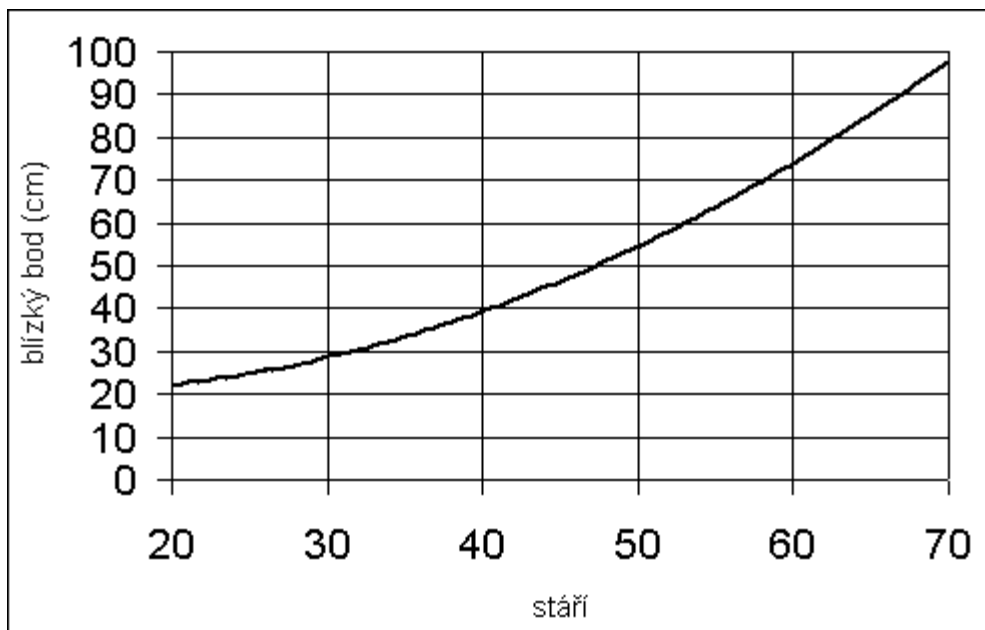
- Veličiny
- Hladina hemoglobinu
- Plasmatická hladina albuminu
- Hladina cholesterolu
- Aktivita alaninaminotransferázy
- Glukózotoleranční test
- Zraková ostrost
- Vitální kapacita plic
- Systolický krevní tlak

3.3.5 Metody určování biologického věku založené na změnách zraku

Měření zraku je častým parametrem, který je často zařazován do souboru měření. Jeho změna je se stárnutím výrazná a lze i celkem dobře změřit. Často se využívá změn akomodační schopnosti oka a zrakové ostrosti. Parametrem užívajícím se u akomodační šíře je korigovaný blízký bod. Jednoduše můžeme tento bod měřit i v domácích podmínkách. Měří se nejkratší vzdálenost, na kterou jsme schopni zaostřit. Výsledek porovnáme s průměrnou hodnotou naměřenou v populaci podle grafu. Měření se nehodí pro oči trpící krátkozrakostí či jinou poruchou.

Tento marker stárnutí je významný, neboť vypovídá o změně bílkovin v pojivech. Změny těchto bílkovin jsou úměrné ve všech pojivových orgánech i v cévních stěnách a ubývají s věkem. Jak je známo, změny na cévních stěnách mají souvislost s výskytem kardiovaskulárních onemocnění. Přímé měření stěn cév je ale velmi složité a nepřesné. Proto se například měří akomodační šíře oční čočky.

Graf 1 Závislost prostého blízkého bodu na věku



Graf vyjadřuje průměrnou hodnotu blízkého bodu v závislosti na stáří populace.

Zdroj:

<http://apps.faf.cuni.cz/Gerontology/biologicalage/measurement/BiologicalAgeMeasurement.asp> (25.2.2014)

Změny zrakové ostrosti vypovídají o stavu sítnice, jež analogicky podává informace o změně buněk v nervovém systému. Domácí měření je také možné. Provádí se pomocí Landoltonových obrazců. Určuje se, z jaké vzdálenosti dokážeme rozpoznat výseč na zobrazeném kroužku. Provádíme pro každé oko zvlášť, dbáme na kvalitní osvětlení. Obdobně porovnáme s grafem, který odpovídá průměrným hodnotám v populaci v závislosti na věku.

Graf 2 Závislost zrakové ostrosti na stáří



Zdroj

<http://apps.faf.cuni.cz/Gerontology/biologicalage/measurement/BiologicalAgeMeasurement.asp> (25.2.2014)

3.3.6 Metody určování biologického věku založené na změnách sluchu

Pro tyto metody určení biologického věku je důležitá tzv. audiometrie, kde proměřujeme vnímání tónů různých výšek. Určujeme intenzitu zvuků frekvence, kterou ucho ještě vnímá. Frekvence jsou skokové a měly by pokrýt rozsah všech tónů, které můžeme vnímat.

Metodika není nejjednodušší, poněvadž tento marker je silně individuální a i technická stránka provedení je složitá. Můžeme výstupy též porovnat s průměrnými hodnotami v populaci, ale nedostaneme tak validní výsledky jako u zraku. Zajímavé je i to, že rozdíly u vysokých a velmi nízkých tónů jsou dost rozličné u pohlaví. Nejspíš je to dáno evolučně, kdy ženy potřebují slyšet vyšší tóny (kvůli brečícím dětem) a muži naopak reagují na nižší.

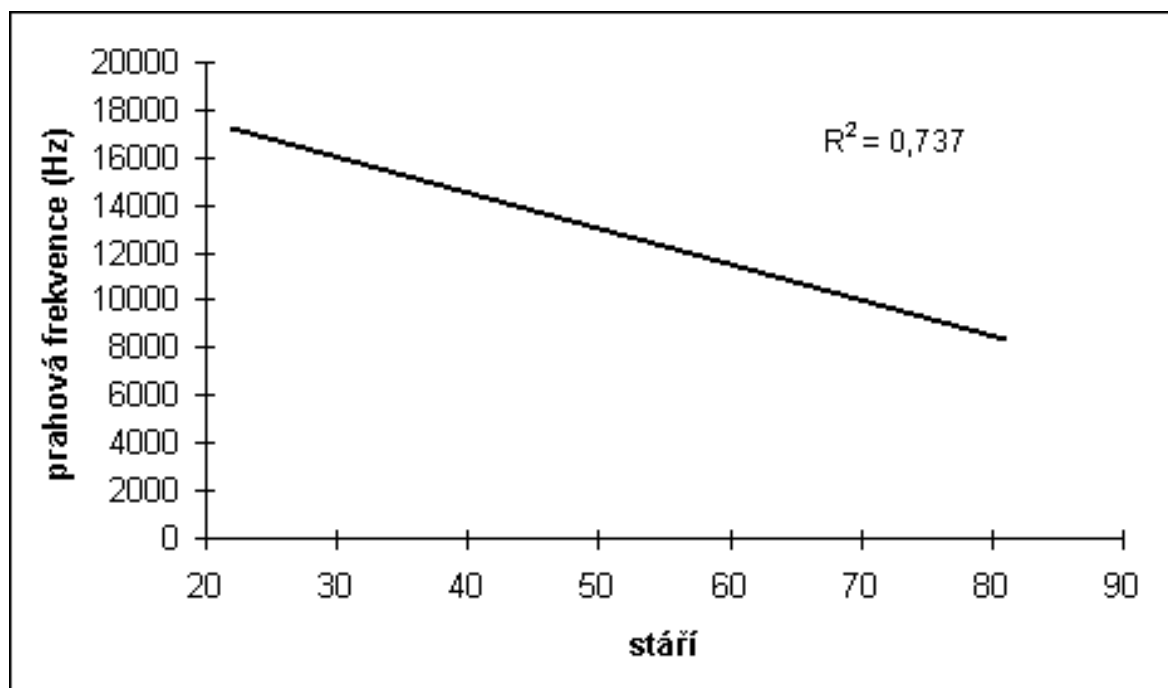
Ale i přesto je toto měření dost dobře využitelné. Například v našem měření nepůjde až tak o to, jak daný soubor subjektů reaguje na dané tóny o různých frekvencích a jakému biologickému věku to odpovídá. Rozdíly u jednotlivců budou totiž obrovské

a nemusí právě díky evolučním mezidruhovým rozdílům mít správnou výpovědní hodnotu. Využijeme ale toto měření ke zjištění, jestli došlo před prvním a závěrečným měřením k nějaké změně u všech jedinců ve vnímání tónů o dané frekvenci. Jestliže tomu tak bude, tak v jaké části spektra je tato změna (zlepšení) největší.

Individuální rozmanitost parametrů ztěžuje vzájemné porovnávání stupně zestárnutí jednotlivých osob. Technická náročnost spočívá zejména ve zdlouhavosti měření a v problémech s reprodukovatelností výsledků.

Obecně se však má za to, že hodnota maximální výšky tónů, kterou zaznamáme, je kvalitním průkazním markerem k určení biologického věku. Tento parametr by podle literatury měl být velmi silně závislý na věku a jeho měření není až tak zdlouhavé. (24d)

Graf 3 Věková závislost prahu vnímání vysokých tónů



Zdroj: <http://apps.faf.cuni.cz/Gerontology/biologicalage/measurement/BiologicalAgeMeasurement.asp> (25.2.2014)

3.4 Sluchový aparát a jeho měření

Nejdůležitějším smyslem hned po zraku je právě sluch. Tato schopnost je nesmírně důležitá, ale s přibývajícím věkem se snižuje. Změny přicházejí postupně, jednotlivce je leckdy sám ani nezaznamená, musí jej na to upozornit okolí. Zpravidla vnímá hluk, ale nerozlišuje již jednotlivá slova. Tato dysfunkce může přispívat až k neurózám nebo izolaci starého člověka. Na rozdíl od postupné ztráty zraku, jež lze velmi dobře kompenzovat brýlemi, jsou naslouchadla mnohem složitějším prostředkem pro kompenzaci sluchu. Důležité je nejenom jejich provedení po technické stránce, ale i kvalita a seřízení pro jednotlivého pacienta.

Jestliže chceme pochopit, jaké všechny faktory mohou vést ke zhoršení sluchu a o co se pokoušíme v našem experimentu, je potřeba popsat fyziologii našeho sluchového orgánu.

Důležité je se zmínit o zvuku. Zvuk jsou velmi rychlé vibrace vzduchu, které jsme schopni zaznamenat. Vysokými tóny rozumíme vibrace o frekvenci kolem 10 000 kmitů za vteřinu. Nad 10 000 jsou velmi vysoké tóny téměř člověkem nezaznamenatelné, tyto tóny vnímají lépe mladí lidé, se stářím se tato schopnost prudce snižuje. Mladý člověk je schopen vnímat tóny až do 20 000 kmitů za vteřinu. Naopak práh nízkých tónů je u 10 až 100 kmitů za vteřinu.

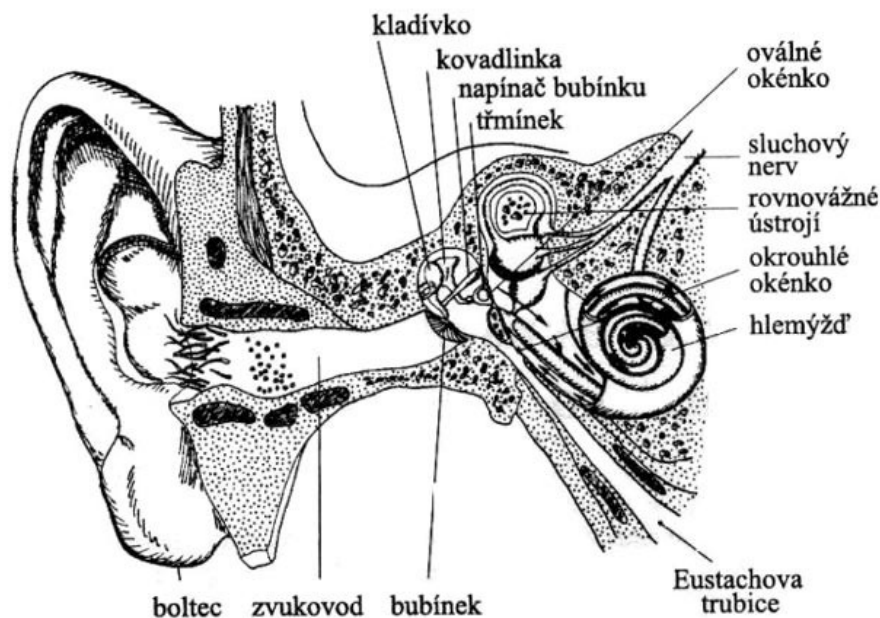
Řeč či hudbu si tedy můžeme představit jako kombinaci různých tónů.

S rostoucím věkem se zhoršuje vnímání vysokých tónů, naopak vnímání nízkých tónů se až tolik nemění. Proto starší lidé vnímají jen slova o nižších frekvencích. K porozumění jsou ale důležité právě vyšší. Jestliže klesne schopnost vnímat vysoké tóny pod nějakou mez, z řeči se stane hluk a slova nám zanikají. Zesílení zvuku může tedy vést jen ke zvýšení hluku, nikoliv k lepšímu porozumění slovům. Jak k vnímání sluchu našim sluchovým orgánem dochází, vysvětlí anatomie a fyziologie sluchového aparátu. (25)

3.4.1 Anatomie sluchového aparátu

Sluchový aparát je složený ze tří částí a to vnitřního, středního a vnějšího zvukovodu. Zvukové podněty jsou těmito částmi zachycovány a přetransformovány na zvukový podnět. Nejzevnější část je tvořena boltcem a zvukovodem, jež měří přibližně dva centimetry, dal by se zjednodušeně popsat jako trubice. Konec je tvořen jemnou tenkou blankou, jež je mezi střední a vnitřní částí ucha a odděluje nám je. Tato blanka je známá pod pojmem bubínek.

Obrázek 14 Anatomie sluchového aparátu



Střední část je tedy na začátku tvořena bubínkem, který se po dopadu zvuku rozvibruje a vzniklé vibrace přenáší dál do bubínkové dutiny. Tam jsou sluchové kůstky – kladívko, kovadlinka, třmínek, které fungují jako převodní systém. Přenášejí podnět dál do vnitřního ucha, kde se nachází tekutina. Důležitým bodem je roztřepání třmínku, jež je důležitý pro vznik vibrací. Právě poruchy třmínku jsou mezi nejčastějšími příčinami poruchy sluchového aparátu. Má se i za to, že věkem, schopnost vibrací touto kůstkou klesá. Dochází k méně intenzivním vibracím, tudíž k horšímu sluchu.

Vnitřní část, kam putují vibrace, je tvořena hlemýžděm, jehož součástí je vlastní smyslový orgán – Cortiho orgán. V tomto orgánu se nachází obrovské množství

drobných sluchových receptorů, vláskových buněk, jež mají za úkol převádět energii ze zvuku na elektrický signál. Tento signál je potom převeden přenašečem k vláknům sluchových nervů. Cesta pokračuje k osmému hlavovému nervu, dále do mozkové kůry, kde je blízko centrum s pamětí, učením a také s myšlením. Pomáhají nám pochopit, co za podnět slyšíme. Poruchou osmého hlavového nervu vznikají také časté poruchy sluchu (senzoneurální poruchy). (26)

3.4.2 Biofyzika slyšení

Membrána Cortiho orgánu se rozšiřuje směrem ke konci hlemýždě. Jestliže akustické vlnění přichází do vnitřního ucha, transferuje se mechanická energie z perilymfy (tekutina) také na membránu Cortiho orgánu a dochází k rozkmitání.

Energie, jež může prostoupit, je závislá na vlastnostech membrány (zejména mechanických). Jestliže frekvence akustického vlnění se rovná frekvenci rezonancí úseku membrány Cortiho orgánu, pak dojde k transferu energie a rozechvěje se tento úsek membrány.

Toto rozechvění vnímají vláskové buňky a převádějí na již zmíněný osmý hlavový nerv (nervus vestibulocochlearis) až k mozku, kde dojde ke zpracování a vyhodnocení vjemu.

Avšak nastane-li situace, že frekvence akustického vlnění je od rezonanční odlišná, dojde k malému transferu energie. Membrána je rozkmitána jen lehce a nervový impulz není dále přenášen a tudíž nezaregistrován mozkiem. (26b)

3.4.2.1 Frekvenční závislost

Rozsah lidského sluchu je v rozmezí 16 Hz až 20 kHz. Ke zhoršení či úplné ztrátě sluchu dochází vlivem stárnutí a poškození během života. Zjednodušeně můžeme konstatovat, že za jednu dekádu horní hranice frekvencí, které ještě slyšíme, klesne zhruba o 1 kHz. Vezmeme-li si spektrum slyšitelnosti, tak citlivost sluchu je pro různé části spektra odlišná. Mezi oblastmi 2 až 4 kHz je citlivost největší, potom k nižším a naopak vyšším frekvencím se citlivost snižuje. (27)

Dle WHO (světové zdravotnické organizace) je průměrná ztráta sluchu členěna takto:

- Normální sluch bez potíží 0 - 25 dB
- Lehká nedoslýchavost 26 - 40 dB
- Střední nedoslýchavost 41 - 55 dB
- Středně těžká vada sluchu 56 - 70 dB
- Těžká vada sluchu 71 - 90 dB
- Velmi závažná vada sluchu nad 91 dB
- Neslyšícím je pouze ten, kdo nepocítuje žádné zvukové vjemy

Obrázek 15 Hlasitost běžných zvukových vjemů

práh slyšení	0 dB
tikot náramkových hodinek u ucha ševelení listů	10 dB
šepot	30 dB
hlasitý hovor na <u>1 m</u>	50 dB
pouliční hluk při silném provozu	80 dB
Motocykl	90 dB
sbíječka a velmi silná hudba	100 dB
rockový koncert	110 dB
práh bolesti	120 dB
proudový motor	130 dB

Zdroj:

http://www.techmania.cz/edutorium/art_exponaty.php?xkat=fyzika&xser=416b757374696b61h&key=607 (9.3.2014)

3.5 Příčiny poruch sluchu

3.5.1 Na úrovni převodního aparátu

- Změna impedance
- Změna účinnosti
- Rušení vln při interferenci

3.5.2 Na úrovni percepčního ústrojí

- Toxiny, zánět, hluk – vede k poškození vláskových buněk
- Tlak tekutiny v uchu
- Poškození labyrintu či osmého hlavového nervu

3.5.3 Opatřebení jednotlivých částí stářím

3.6 Metody měření sluchu

3.6.1 Weberova zkouška

Tato zkouška se používá na diagnostiku unilaterální sluchové poruchy. Potřebujeme ladičku ve tvaru vidlice, jež kmitá. Přiložíme ji na čelo, přesně do středu či na temeno. Vyhodnocení je zhruba takové, že zní-li hůř ve slyšícím uchu, je porucha převodního rázu. Zní-li ve zdravém silněji, jedná se o percepční poruchu.(28)

3.6.2 Rinneho zkouška

Tato zkouška srovnává vedení kostí s vedením vzduchem stejného ucha. Potřebujeme ladičku, jejíž patkovou část přikládáme k tzv. processus mastoideus. Jakmile ji náš objekt přestane slyšet, dáme ji k boltci pro vzdušné vedení. Jestliže ji slyší dále, je výsledek pozitivní a ucho je v pořádku. Zjišťují se takto převodní vady.(28b)

3.6.3 Zkouška šepotem a hlasitou řečí

Při horší slyšitelnosti slov *hůl, kůl, půl*, můžeme uvažovat o špatné slyšitelnosti hlubokých tónů. Značí to vadu střední či zevní části ucha, což je vadou převodní. Špatná slyšitelnost vysokých tónů se dokazuje pomocí slov *tisíc* a *měsíc* a na rozdíl od předchozí zkoušky poukazuje na vadu percepční. Těchto zkoušek je nespočetně.

3.6.4 Vyšetření u dětí

Otoakustické emise (OAE)

Tato metoda je velmi jednoduchá a přístroj nám výsledky automaticky vyhodnocuje metodou VÝBAVNÉ/NEVÝBAVNÉ ještě v porodnici. V naší zemi se provádí pouze ve vybraných porodnicích, v některých státech je běžné u všech dětí po narození. Do ucha dítěte se prostřednictvím miniaturního sluchátka pošle nějaký předem definovaný zvuk a jestliže ucho pracuje správně, ozvěna je vyslána nazpět do sluchátka. Změří se a porovná s definovanými hodnotami. Poté se určí zda-li je sluch v pořádku.

SSEP - Evokované potenciály (Somatosensory Evoked Potential)

Tento test je specifický tím, že se provádí ve spánku navozeném uměle a trvá zhruba do 50 minut. Zjišťuje se mozková aktivita na různých frekvencích elektromyogramem. Nevýhoda je nepřesnost tohoto testu.

BERA (Brainstem evoked response audiometry)

Obdobný test na podobném principu, avšak nesleduje aktivitu na rozdílných frekvencích.

3.6.5 Audiometrie

Audiometrie patří do velkého vědního oboru audiologie, jež se zabývá studiem sluchu, jak u zdravých tak u nemocných jedinců. Pro měření využívá elektroakustické přístroje – audiometry. Výsledkem audiometrického vyšetření je audiogram.

Základem je stanovit pro čisté tóny sluchový práh. Potřebujeme k tomu speciální tónový generátor. Výsledkem je prahový audiogram, kde na ose x je frekvence v Hz a na ose y je hladina intenzity v dB. Audiogram je buď absolutní nebo relativní.

Absolutní audiogram není tak častý a není vodorovný (citlivost lidského ucha je různá pro různé frekvence). Udává, jaký je sluchový práh, když ho porovnáme s absolutní nulovou hladinou. Relativní audiogram popisuje v decibelech, jak moc došlo ke ztrátě sluchu oproti normálnímu sluchovému prahu.

Dále existují vyšetření sluchu, jež nejsou přímo audiometrií, ale vycházejí z ní. I naše měření bude v mnoha bodech připomínat audiometrii, avšak nebude využíván přímo audiometr ale počítačový program. (29)

3.6.5.1 Jak používat audiometr

- Provádíme v ničím nerušeném prostředí
- Vyšetřujeme nejdříve frekvenci 1 kHz a postupujeme poté k vyšším a nižším frekvencím
- Používáme přerušovaný tón
- Námí zvolený tón zesilujeme od -10 dB k vyššímu tónu, dokud jej subjekt nezaznamená. Pak tón zeslabíme a od 0 dB jej opět zvyšujeme, dokud jej subjekt nezaznamená. Máme tak hladinu, jež subjekt ve dvou ze tří nabídek spolehlivě zaznamenal. Tato hladina je prahová pro danou frekvenci.
- Opakujeme celé měření vícekrát (30)

3.7 Reakční rychlost

3.7.1 Princip

Adekvátním podnětem pro receptory zrakového analyzátoru je oblast viditelného světla (energie elektromagnetického záření v rozsahu 400 – 750 nm).

Doba průchodu informace reflexním obloukem závisí na době zpracování informace receptorem, rychlosti přenosu informace nervovými vlákny, době přenosu informace v synaptických spojích, době zpracování informace v neuronech a na vlivu CNS.

Kolem cca 85% smyslových vjemů je optického původu, světlo je prostředníkem na cestě mezi objektem, okem a mozkiem.

Pro tyto činnosti člověk spotřebuje 25% své energie.

Optické záření reguluje také funkce orgánů, způsob chování lidského těla a reakční časy jsou individuálně závislé. Mají proto význam například v pracovní a sportovní medicíně.

Je pro ně také typické, že se prodlužují se s věkem a tudíž mají význam v gerontologii.

Na měření reakční doby závisí i na schopnosti koncentrace testované osoby a mnoho dalších faktorů, tudíž je nutné měřit subjekty za stejných podmínek. (29b)

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Metodická část

4.1.1 Kritéria výběru subjektů

Výběr vzorku byl pro proces našeho experimentu nepostradatelný, protože špatně zvolený vzorek respondentů může zkoumaný problém zkomplikovat nebo zcela znehodnotit.

Vytvořila jsem skupinu kolem čtyřiceti lidí, mužů a žen. Všichni byli studenti naší fakulty, věkově mezi devatenácti až tři a dvaceti lety. Nikdo netrpěl žádnou sluchovou vadou ani jinou abnormalitou, pro kterou by se měly jeho výsledky prudce lišit od ostatních.

Se všemi jsem provedla ukázkové měření a dala na vyzkoušení na několik dní náš potravinový doplněk.

Kolem sedmi účastníků bylo vyloučeno pro neschopnost polknout tablety a zažívacím potížím. Ze zbylého vzorku jsem náhodně vybrala skupinu po dvaceti a po deseti studentech, se stejným zastoupením mužů a žen. Skupině po dvaceti (SR) jsem podávala resveratrol a skupina po deseti studentech (SP) užívala placebo, B-komplex forte Generica.

4.1.2 Vlastnosti potravinového doplňku

Vybraný potravinový doplněk je RESVERATROL MAX 80mg 120 tbl.

Složení v 1 tabletě dle příbalového letáku je resveratrol 80 mg, dikalcium fosfát 100 mg, kukuřičný škrob, vláknina a stearan hořečnatý.

Na katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty UK byl Resveratrol Max podroben analýze pomocí HPLC chromatografie. Zjišťoval se přesný obsah látky v doplňku.

Pět tablet přípravku bylo zváženo a byla stanovena průměrná hmotnost jedné tablety, tj. 0,4021 g. Tablety byly homogenizovány ve třecí misce a pro přípravu jednoho vzorku byla použita asi čtvrtina tablety, tj. 0,1000 g. Naváženo bylo celkem 8 vzorků.

Provedla se RP-HPLC metoda s využitím DAD detektoru za těchto podmínek:

Tabulka 3 Optimální podmínky pro HPLC analýzu

Chromatografická sestava:	Shimadzu LC – 10
Detektor:	DAD detektor SPD - M10A VP
Kolona:	Ascentis Express ES-Cyano, 100 x 3,0 mm; 2,7 μm (Supelco Analytical)
Dávkování:	5 μl
Detekce:	UV 305 nm
Mobilní fáze:	Acetonitril/0,5% kyselina octová 20:80 (pH 3)
Průtok mobilní fáze:	1,0 ml/min
Teplota:	60°C
Čas analýzy:	3,25 min
Tlak:	20,0 MPa

V přípravku je deklarované množství 80 mg resveratrolu v jedné tabletě. Průměrný obsah resveratrolu získaný danou metodou byl 56,83 mg. Toto množství odpovídá 71,04 % deklarovaného množství.

Doporučovaný způsob užívání je 1-2 tablety s jídlem, subjekti užívali 3 tablety denně. Tento obsah po přepočtu z výše uvedeného údaje je 170,49 mg resveratrolu denně.

Tabulka 4 Obsah Resveratrolu Max 80 mg

Analyt	Deklarovaný obsah (mg/tbl.)	Zjištěný obsah
Resveratrol	80	71,04%
Polydatin		0,37 mg

4.1.2.1 Účinky na organismus

Jelikož bylo provedeno velmi málo studií u lidí, lékaři stále nemohou na sto procent potvrdit nějaké výhody ani varovat před vedlejšími až závažnými účinky po užívání preparátů s RES.

Tudíž dopady na zdraví, jež by se mohly vyskytnout v dlouhodobém horizontu, se prozatím zkoumají. Studie zatím neobjevily žádné závažné vedlejší účinky, i v případě, že byl užíván ve velkých dávkách.

Resveratrolové doplňky ale interagují s léky na ředění krve jako warfarin a nesteroidní protizánětlivé léky jako aspirin a ibuprofen, čímž se zvyšuje riziko krvácení.

Stejně jako ostatní doplňky, ani resveratrol není regulován FDA či EMA (registrační lékové agentury v USA a VB), tudíž je obtížné pro spotřebitele zjistit, jestli je výrobek skutečně účinný. Také není doporučeno konkrétní dávkování a může se lišit doplněk od doplňku. Dávky ve většině přípravků jsou obvykle mnohem nižší než ty, které se ukázaly prospěšné ve výzkumných studiích. Tudíž v našem výzkumu subjekt užíval až tři tablety denně. (31)

4.2 Experiment č. 1 - vliv resveratrolu na sluch

4.2.1 Programové vybavení a místnost

Při vlastním měření byl vyšetřovaný umístěn do odhlučněné místnosti a na uši si nasadil sluchátka. Potřebovali jsme zajistit, aby byly eliminovány všechny zvuky z vnějšího prostředí. Také bylo dobré eliminovat zrakové vjemy, jež mohly upoutat vyšetřovaného a znehodnotit validitu měření. Tudíž žaluzie v místnostech byly zatažené a okolní prostor byl bez předmětů upoutávající pozornost. V místnosti bylo konstantní osvětlení.

Na měření byl použit standardní počítač s obslužným programem generujícím tóny vytvořeným na naší fakultě. Použitý generátor tónů je v licenci Mentio Praha.

Program generoval tóny podle nastavených frekvencí a s různou hlasitostí. Tyto tóny byly přehrávány pomocí sluchátek do obou uší testované osoby zároveň.

Osoba reagovala na zvukový podnět tím, že sama stlačovala mezerník na klávesnici. Program proměřil citlivost obou uší na tóny různé frekvence a hlasitosti, eventuálně různé délky. Změřila se odezva postupně v celém slyšitelném rozsahu.

Rozložení měřených frekvencí bylo "Zjednodušené" (20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 atd.. postupně až k 20 000 Hz). (31a)

4.2.2 Postup při "Automatickém" testování

- Posad'te testovanou osobu před počítač.
- Řekněte klientovi, že pokaždé, když uslyší nějaký tón, má co nejdříve zmáčknout mezerník.
- Pokud chcete mít kontrolu nad tím, co klient ve sluchátkách uslyší, připojte si pomocí rozdvojký k počítači ještě jedna sluchátka.
- Spus'te test zmáčknutím tlačítka "Spustit" v levé části obrazovky.
- Ve sluchátkách se nyní budou ozývat různé tóny o různých frekvencích. Počítač nabízí daný tón se stupňující se hlasitostí, dokud jej testovaná osoba nezaznamená. Počítač zaznamenává reakce testované osoby pro potřeby vyhodnocení.
- Na závěr automatického testování se na obrazovce objeví text "Test dokončen" a odkryjí se tabulky s vyhodnocením a graf. (31b)

4.2.3 Sběr dat

Měření provádíme u SR skupiny před užíváním RES s pěti opakováními. Poté SR užívá čtyřicet dní tři tablety RES a následuje další přeměření s pěti opakováními.

U skupiny SP se postupuje obdobně. Jen s tím rozdílem, že místo RES užívají placebo, B-komplex Generica, a opakování před a po užívání je sníženo na tři pokusy.

Měření před i po užívání RES provádíme ve stejných podmínkách. Snažíme se, aby se subjekt našeho měření dostavil ve stejném fyzickém i psychickém rozpoložení, ve stejný čas. Taktéž prostředí by mělo zůstat také neměnné.

Data každého jednotlivce, celkem dvě měření po pěti, respektive po třech opakováních, zaznamenáváme do tabulky (obrázek 18)

Obrázek 16 Ukázka výstupních dat pro respondenta ze skupiny SR

frekvence	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
20	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
50	6,2	6,0	5,6	5,5	6,2	6,0	6,2	6,2	6,8	6,8
100	5,0	5,0	3,9	3,9	4,5	4,5	5,6	5,5	5,6	5,9
200	5,0	4,9	4,5	4,5	5,0	4,8	5,0	5,0	5,0	5,0
500	3,9	3,9	3,9	3,6	4,5	4,5	3,9	4,0	4,5	4,2
1000	3,9	3,7	5,0	5,0	4,5	4,2	2,8	2,8	3,9	3,9
2000	3,3	3,0	3,3	3,3	4,5	4,5	2,1	2,5	2,8	2,7
3000	1,7	1,7	2,8	2,8	4,5	4,5	2,1	2,1	1,0	1,0
4000	1,0	1,1	2,8	2,8	5,0	4,4	1,7	1,7	1,7	1,5
5000	1,0	1,0	1,7	1,4	6,8	6,8	1,0	1,0	1,0	1,2
6000	1,7	1,7	1,7	1,2	2,1	2,1	1,0	1,0	1,0	1,0
7000	2,1	2,2	1,7	1,2	1,7	1,7	1,0	1,0	1,7	1,6
8000	1,7	1,7	1,7	1,7	1,0	1,1	1,0	1,0	1,7	1,7
9000	1,7	1,7	2,1	2,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
10000	2,8	2,0	2,1	2,1	1,7	1,7	1,0	1,0	1,7	1,6
11000	1,7	1,6	1,7	1,7	1,7	1,7	1,0	1,0	1,0	1,0
12000	1,7	1,5	1,7	1,7	1,7	1,5	1,0	1,0	1,0	1,0
13000	2,1	1,9	1,7	1,4	1,7	1,5	1,7	1,5	1,0	1,0
14000	2,8	2,6	2,8	2,2	2,8	2,2	2,8	2,6	1,7	1,4
15000	3,3	3,0	3,3	3,0	3,3	3,3	4,5	4,3	1,7	1,7
16000	3,9	3,6	3,3	2,9	3,3	3,3	5,0	4,8	2,8	2,6
17000	5,0	4,9	4,5	4,4	3,9	3,3	7,3	7,3	3,9	3,3
18000	7,3	7,3	6,8	6,0	6,8	6,0	9,6	9,5	5,6	4,5
19000	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A
20000	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A	#N/A

Vysvětlivky:

#N/A - zkratka pro anglický výraz Not Available nebo Not Applicable (tedy nedostupné nebo neaplikovatelné). Subjekt nic neslyšel při maximální hlasitosti.

Ve sloupcích (obrázek 18) jsou párové hodnoty, jež byly naměřeny před a po užití RES při různých frekvencích. Toto měření bylo u každého jednotlivce provedeno pětkrát, respektive třikrát.

4.3 Experiment č. 2 – vliv RES na reakční rychlost

4.3.1 Potřebné vybavení

Na měření je potřeba standardní počítač s obslužným programem generujícím obrazec v nepravidelných intervalech. Osoba při zaznamenání obrazce sama stlačovala mezerník na klávesnici. Program proměřil reakční rychlost subjektů SR i SP.

U každého subjektu jsme získali tři hodnoty před po užívání RES, jež jsou průměrem z pěti opakování. Byla to minimální doba, za kterou subjekt zaznamenal obrazec, průměrná doba a směrodatná odchylka.

Právě směrodatná odchylka je nejdůležitějším parametrem, která ukazuje, jestli došlo k nějakému zlepšení. Čím je člověk mladší, má tuto hodnotu nižší. Proto bude tato hodnota hlavním ukazatelem v oblasti reakčních rychlostí.

4.3.2 Postup při "Automatickém" testování

- Posad'te testovanou osobu před počítač.
- Řekněte subjektu, že pokaždé, když uvidí červený obrazec, co nejdříve zmáčkne mezerník.
- Spus'te test zmáčknutím tlačítka "Spustit" v levé části obrazovky.
- Na obrazovce se nejdříve objeví šest pokusů na nečisto a poté se začne vlastní měření.
- Počítač zaznamenává reakce testované osoby pro potřeby vyhodnocení.
- Na závěr automatického testování se na obrazovce objeví text "Test dokončen" a odkryjí se tabulky s vyhodnocením

Tabulka 5 Ukázka výstupních hodnot subjektu č.1 ze skupiny SR

Subjekt č. 1	před RES	po RES
průměrný čas	0,29	0,33
nejkratší čas	0,19	0,25
směrodatná odchylka	0,063	0,065

V prvním sloupci jsou hodnoty před začátkem užívání RES a v druhém po čtyřiceti dnech.

4.4 Výsledky

4.4.1 Sluch

Každý jedinec byl podroben pěti, resp. třem měřením před užíváním doplňku (1 soubor hodnot) a po dobrání (2 soubor hodnot). K vyhodnocení jsme použili dvojvýběrový t-test, jež porovnává právě dva výběrové soubory.

Používá se pro hodnocení experimentů, kde neznáme střední hodnoty základních souborů, a porovnáváme pouze 2 soubory výběrových dat. Tato data mohou být představována buď dvěma měřeními provedenými opakovaně u jedné skupiny jedinců (typicky měření před aplikací pokusného zásahu a po aplikaci – tzv. „párový pokus“ neboli „závislé výběry“) nebo dvěma nezávislými skupinami měření („nepárový pokus“ neboli „nezávislé výběry“).

4.4.1.1 A) Párový t-test

Porovnává data, která tvoří „spárované variační řady“, pocházejí ze subjektů, které byly podrobeny dvěma měřeními. Provádíme tedy 2 měření u jednoho výběrového souboru: 1. měření před aplikací pokusného zásahu, 2. po aplikaci pokusného zásahu. Takto získané hodnoty tvořící páry a reprezentující při testování jak kontrolní tak i pokusnou skupinu porovnávaných dat. (32)

V našem případě aplikujeme tento test, abychom porovnali, jestli došlo ke statisticky významnému zlepšení u jedince před (1.měření) a po (2.měření) užívání doplňku.

Prakticky jsme tedy získali od každého jedince párová měření (obrázek 18) a z těchto hodnot jsme spočítali pro každé párové měření rozdíl Δ (tabulka 8).

Z pěti takto získaných sloupců rozdílů, jež nám popisují zlepšení/zhoršení pro každé měření, jsme v posledním sloupci spočítali hodnotu Q, což je hodnota průměrných diferencí pro každou frekvenci (obrázek 19).

Výsledná hodnota Q nám popisuje, jestli pro danou frekvenci došlo ke zlepšení citlivosti sluchu obou uší na tóny různé frekvence (od 1000 – 19 000 Hz). Prakticky to znamená, že čím je rozdíl v zápornějších hodnotách, tím byla naměřená hodnota po užívání nižší. Bylo potřeba vygenerovat při dané frekvenci nižší hlasitost, sluch se stal citlivějším.

Obrázek 17 Ukázka diferencí a jejich průměru subjektu ze skupiny SR

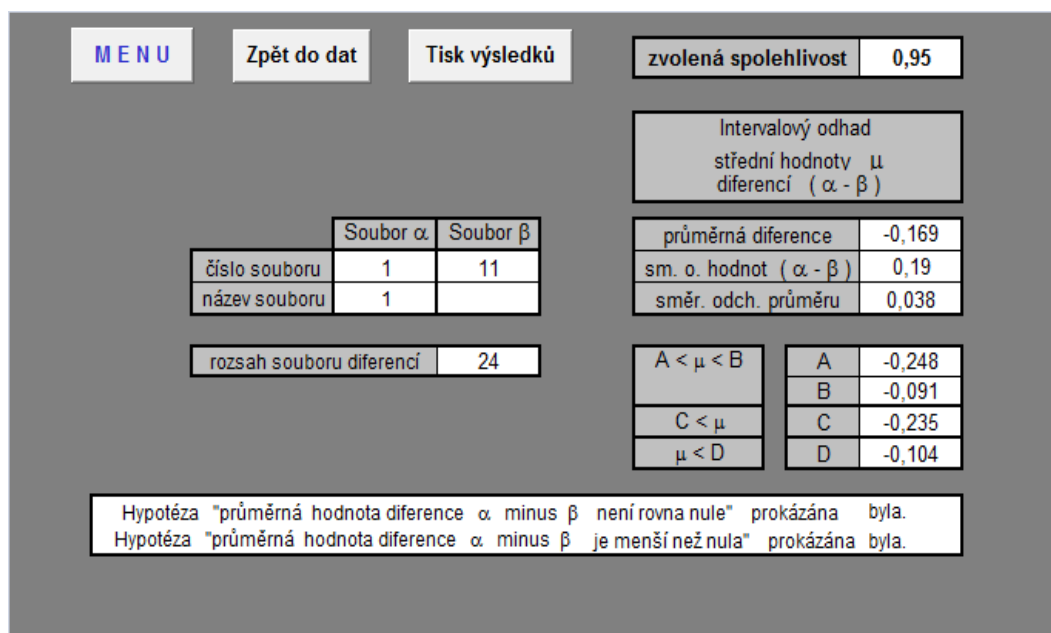
frekvence	1 Δ	2 Δ	3 Δ	4 Δ	5 Δ	Q
20	#N/A	#N/A	#N/A	0	0	#N/A
50	-0,2	0,1	0,1	-0,2	0	0
100	0	0,1	0,1	-0,2	-0,3	-0,1
200	-0,1	-0,2	-0,2	0	-0,8	-0,3
500	0	0,2	0,2	0	-0,2	0
1000	-0,2	-0,2	-0,2	-0,2	0	-0,2
2000	-0,3	0	0	0	0	-0,1
3000	0	-0,1	-0,1	-0,3	0	-0,1
4000	0,1	0	0	0	0	0
5000	0	0,2	0,2	0	0,1	0,1
6000	0	-0,3	-0,3	-0,3	0	-0,2
7000	0,1	0	0	-0,4	0	-0,1
8000	0	0	0	0	0	0
9000	0	0	0	0	0	0
10000	-0,8	-0,3	-0,3	0	-0,6	-0,4
11000	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,3	-0,1
12000	-0,2	-0,2	-0,2	-0,2	0	-0,2
13000	-0,2	-0,3	-0,3	0	-0,2	-0,2
14000	-0,2	-0,4	-0,4	-0,7	-0,1	-0,4
15000	-0,3	-0,4	-0,4	0	0	-0,2
16000	-0,3	-0,3	-0,3	-0,1	-0,6	-0,3
17000	-0,1	-0,4	-0,4	-1	-0,4	-0,5
18000	0	-0,5	-0,5	-0,6	-0,5	-0,4
19000	-0,4	-0,4	-0,4	-0,6	-1,3	-0,6

Porovnávali jsme, jestli hodnoty druhého souboru vykazují statistickou významnost oproti hodnotám v prvním souboru u obou skupin. Porovnávala se data, dva soubory, pro každého jedince. Pro jednodušší zadávání dat jsme využili jako první soubor průměrnou diferencí těchto souborů Q, druhý soubor obsahoval do páru pouze nuly, matematicky je to totožné.

Hodnoty průměrných diferencí Q (v příloze 1) jsme spočítali výše uvedeným způsobem u testovaných osob (1-20) a osob užívajících placebo (21-30).

Výsledkem pro každého jedince je potvrzení či vyvrácení hypotézy. Také je součástí výsledků interval μ , jež popisuje nejpravděpodobnější interval výskytu přesné hodnoty. Dále si je nutno povšimnout spolehlivosti, s níž hypotézu potvrzujeme /vyvracíme.

Obrázek 18 Výsledky subjektu 1



Hodnota spolehlivosti (značená jako $1-\alpha$) se nejčastěji volí 0,95 (95 %) a udává pravděpodobnost, s níž je skutečná hodnota parametru θ nalezeným intervalem pokryta. Pro zajímavost jsme prováděli test i za nejvyšší možné zvolené spolehlivosti 0,999.

Tabulka 6 Výsledky párového t-testu subjektů na hladině významnosti 0,05 a 0,01

Subjekt z SR	Hladina významnosti	Subjekt z SR	Hladina významnosti	Subjekt z SP	Hladina významnosti
1	0,01	11	0,01	21	0,05
2	0,01	12	0,01	22	X
3	X	13	0,01	23	X
4	0,01	14	0,01	24	X
5	0,01	15	0,01	25	X
6	0,01	16	0,01	26	X
7	0,01	17	0,01	27	X
8	0,01	18	0,01	28	X
9	0,01	19	0,01	29	X
10	0,01	20	0,01	30	X

Vysvětlivky: X - hypotéza je neprokázána

Z tabulky je patrné, že u SR skupiny byla statisticky významná hodnota zlepšení potvrzena u devatenácti jedinců. Naproti tomu u SP skupiny jen v jednom případě.

4.4.1.2 Nepárový t-test

Nepárový t-test porovná data, tvořená dvěma nezávislými výběry, pocházejících ze dvou různých skupin jedinců. Typicky jde o porovnání hodnot pokusné skupiny (kde byl aplikován pokusný zásah) a kontrolní skupiny (kde aplikace pokusného zásahu provedena nebyla). V našem případě je pokusnou skupinou SR a kontrolní skupinou je SB. (32b)

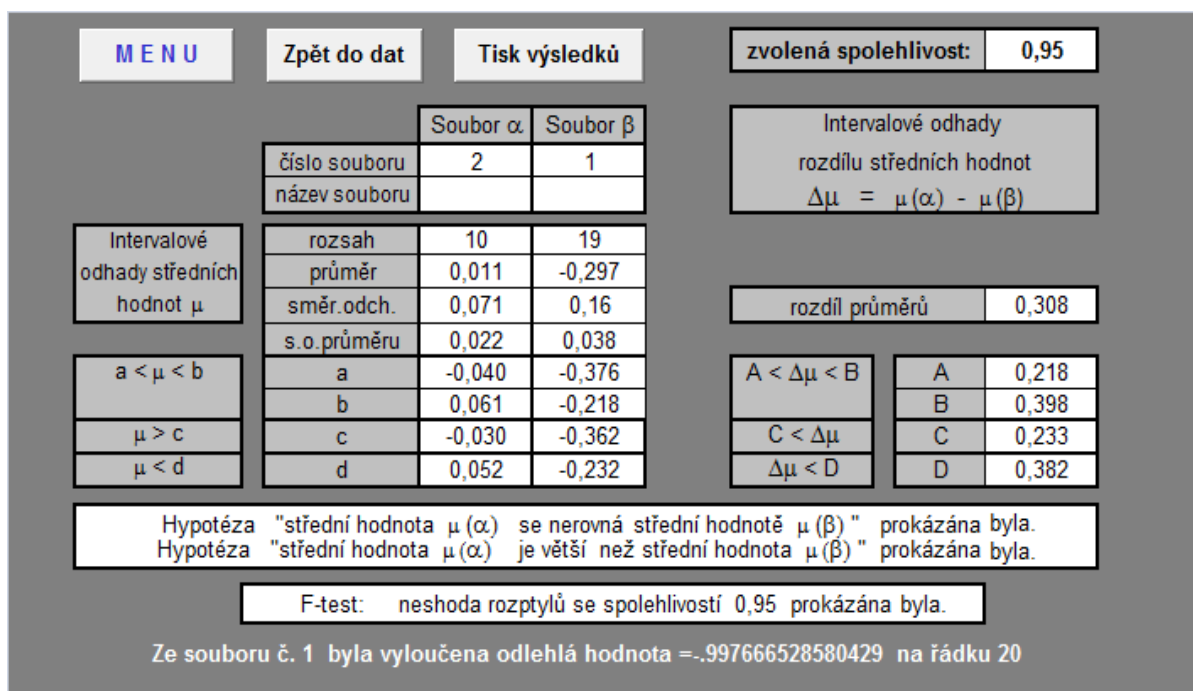
Tyto dva soubory se navzájem porovnávají nepárovým t - testem.

Tabulka 7 Průměrné změny prahových hodnot skupiny SR a SP

Soubor č.	SR	SP
1	-0,16943	-0,10513
2	-0,14142	0,064103
3	-0,09688	-0,02595
4	-0,06611	-0,03867
5	-0,17365	0,116667
6	-0,26709	0,044872
7	-0,22832	0,048718
8	-0,11259	-0,07051
9	-0,08902	0,076923
10	-0,28082	-0,00385
11	-0,49217	
12	-0,38805	
13	-0,37567	
14	-0,41527	
15	-0,30731	
16	-0,46681	
17	-0,4869	
18	-0,51928	
19	-0,5636	
20	-0,99767	

Výsledkem tohoto testu je obdobný soubor hodnot jako v párovém testu.

Obrázek 19 Výsledek



Porovnáním souborů z tabulky 10 byl prokázán rozdíl mezi jejich průměry na hladině významnosti 0,01. Obrázek 21 ukazuje, že intervalový odhad pro tento rozdíl se spolehlivostí 0,95 je 0,218 až 0,398.

Tabulka 8 Průměrná změna prahové intenzity na frekvenci

F [Hz]	ξ průměr		ϕ chyba průměru	
	SR	SP	SR	SP
20	-0,332	0,001	0,050	0,022
50	-0,485	-0,098	0,131	0,065
100	-0,571	0,135	0,134	0,134
200	-0,382	-0,119	0,119	0,073
500	-0,441	-0,009	0,117	0,115
1000	-0,310	0,085	0,073	0,157
2000	-0,290	0,130	0,061	0,118
3000	-0,301	0,129	0,062	0,084
4000	-0,295	0,075	0,071	0,097
5000	-0,215	0,061	0,067	0,077
6000	-0,223	0,050	0,083	0,093
7000	-0,189	0,094	0,044	0,078
8000	-0,126	0,078	0,041	0,051
9000	-0,099	0,040	0,028	0,054
10000	-0,158	0,041	0,037	0,077
11000	-0,144	-0,014	0,035	0,055
12000	-0,171	0,004	0,037	0,068
13000	-0,227	0,073	0,033	0,063
14000	-0,317	-0,061	0,059	0,060
15000	-0,326	-0,192	0,053	0,061
16000	-0,474	-0,046	0,068	0,079
17000	-0,601	-0,008	0,086	0,068
18000	-0,604	-0,054	0,084	0,066
19000	-0,589	0,036	0,105	0,064
20000	-0,613	-0,029	0,151	0,093

Vysvětlivky:

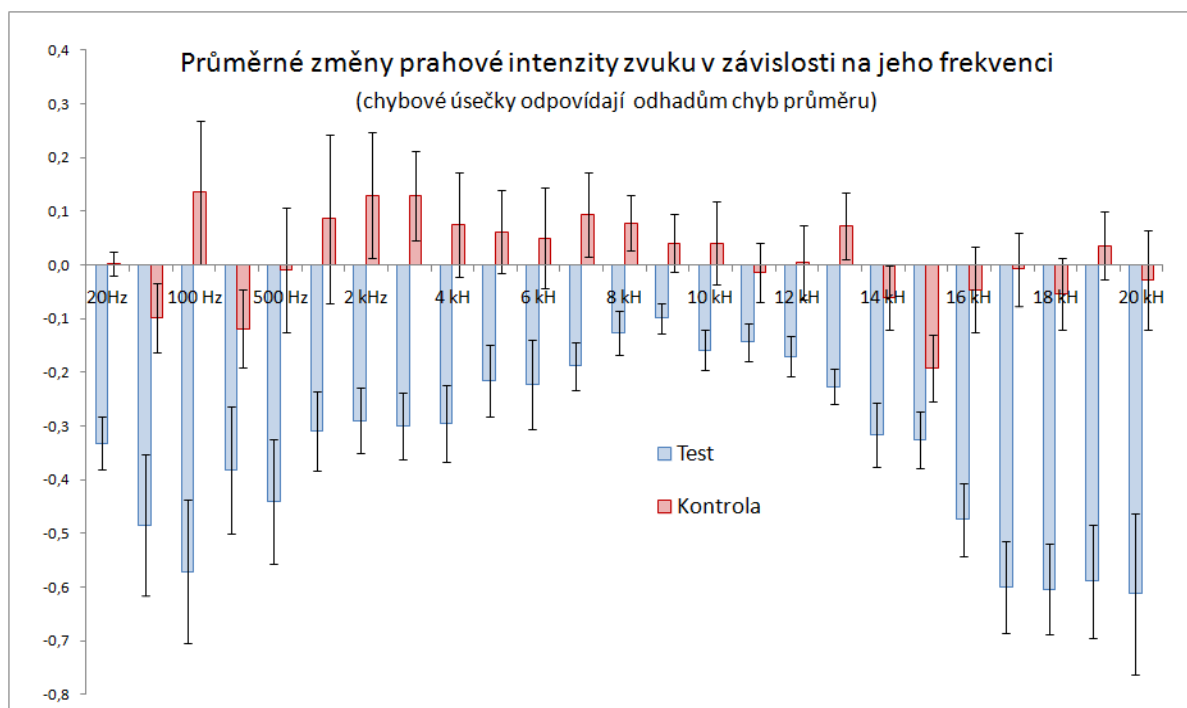
ξ průměrná změna prahové intenzity v závislosti na jeho frekvenci

ϕ směrodatná odchylka dělená odmocninou z rozsahu souboru, tj. chyba průměru

Vytvořili jsme graf (graf 6), jež popisuje závislost hodnot průměrů ξ u skupiny SR a SP na frekvenci. Hodnota ξ nám popisuje průměrné zlepšení/zhoršení citlivosti. Chybové úsečky v grafu znázorňují velikost chyb jednotlivých průměrů (standard error).

Grafickým zpracováním do sloupcové podoby s chybovými úsečkami získáme znázornění potenciální velikosti chyby vzhledem k jednotlivým datovým značkám v datové řadě.

Graf 4 Průměrné změny intenzity zvuku na frekvenci



4.4.2 Reakční rychlost

U toho experimentu jsme výstupem od každého jedince získali 3 párové hodnoty (tabulka 7). Pro každou párovou hodnotu jsme spočítali změnu a vyhodnotili ji.

Tabulka 9 Změny hodnot u experimentů a kontrol

		ZMĚNY HODNOT PŘED A PO POKUSU						
testovací skupina		1	2	3	4	5	6	7
	průměrný čas	-0,04	-0,01	-0,02	-0,01	0,02	0,02	0
	nejkratší čas	-0,06	0,03	-0,02	0,01	-0,02	-0,01	0,02
	směrodatná odchylka	-0,002	-0,014	-0,01	-0,02	-0,002	0,01	0,006
		8	9	10	11	12	13	14
		-0,01	-0,02	-0,02	0,02	0,04	-0,04	0,06
		-0,02	0,02	0,02	0	0,02	0,02	-0,04
		0,007	0,008	-0,016	0,003	-0,006	0,014	0,008
		15	16	17	18	19	20	
		-0,02	-0,02	-0,04	0	0,04	0,02	
		-0,02	-0,02	-0,08	-0,02	0,04	-0,02	
		-0,004	0,002	0,016	-0,02	0,002	-0,01	
kontrolní skupina		ZMĚNY HODNOT KONTROL						
		21	22	23	24	25	26	27
	průměrný čas	0,04	-0,04	0,12	0,14	0,12	0	0,02
	nejkratší čas	-0,02	0,04	0,02	0,16	-0,02	0,02	0,1
	směrodatná odchylka	-0,014	-0,018	0,028	-0	0,004	0,002	0,008
		28	29	30				
		-0,08	0,14	0,02				
		-0,1	0,08	0				
		-0,018	-0,002	-0,004				

Pro hladinu spolehlivosti 0,95 jsme zjistili (tabulka 13), že v pokusném souboru stejně tak jako u kontrol nebyla prokázána statisticky významná změna v žádném ze tří parametrů rychlosti reakce.

Tabulka 10 Výsledky hodnocení vlivu RES na rychlost reakce

průměrný čas		
Rozsah	SP	SR
Průměr	0,048	-0,0015
směr.odch.	0,078	0,029
s.e	0,025	0,0064
A	-0,008	-0,0148
B	0,104	0,0118

nejkratší čas		
rozsah	SP	SR
průměr	0,028	-0,0075
směr.odch.	0,073	0,031
s.e.	0,023	0,0069
A	-0,024	-0,0219
B	0,08	0,0069

směrodatná odchylka		
Rozsah	SP	SR
Průměr	-0,002	-0,0016
směr.odch.	0,014	0,01
s.e.	0,004	0,0022
A	-0,012	-0,0062
B	0,008	0,0031

Hodnoty A, B představují meze intervalového odhadu pro spolehlivost 0,95.

5 Diskuse

Výsledky experimentální práce, se zaměřením na zlepšení sluchu a reakčních rychlostí v závislosti na užívání resveratrolu, se zdají být jednoznačné a o to více překvapující.

Zlepšení citlivosti sluchu bylo potvrzeno téměř u všech subjektů ze skupiny SR užívajících RES na hladině významnosti 0,01. Naopak u kontrolní skupiny SP ke zlepšení parametru nedošlo, výsledky náhodně kolísaly. Tímto můžeme vyloučit zlepšení na základě placebo efektu a pokusit se u této látky polemizovat nad případným farmakologickým účinkem.

Měření této práce nebylo provedeno za neoptimálnějších podmínek, musely nám postačit fakultní laboratoře. Nebylo v našich silách udržet konstantní podmínky pro každý měřený subjekt.

Již na začátku bylo potřeba počítat s velkou pravděpodobností s tím, že výsledky mohly být negativně ovlivněny a nepotvrzeny u mnoha subjektů proto, že jsme aplikovali každému jedinci stejnou dávku. Dávka nezohledňovala rozdílnou farmakokinetiku a farmakodynamiku každé osoby. (33)

Určitým výběrem jedinci prošli (byli stejného věku, bez komorbidit), ale opravdu jen základním.

Zkoušeli jsme tuto látku na relativně malém vzorku lidí, nebyli stejného pohlaví, nebyly u nich určeny žádné parametry jejich farmakokinetiky (schopnost absorpce, distribuce, metabolismu a vylučování látky v organismu) ani farmakodynamiky (interakce jejich receptorů), jež může být opravdu velmi rozdílná a je potřeba subjekty nad/pod normou vyloučit. Dále nám práci mohl ovlivnit lidský faktor. Nemohli jsme ohlídat, jak subjekt bral přípravek, jestli někdy vynechal či zapomněl užít dávku.

Proto se s těmito předpoklady nepočítalo s tím, že by výsledky citlivosti sluchu mohly být tak průkazné u všech testovaných osob.

Dalším zajímavým faktem je, že tento experiment byl původně navržen pro geriatrické pacienty, kteří mají sluch již hodně zhoršený, a případné zlepšení by bylo lépe zaznamenatelné. Resveratrol je aplikován v různých výzkumech v antiaging indikaci. Jaký má vliv na biologické parametry u zdravých jedinců, na to studie téměř nejsou.

Náš experiment je o to zajímavější tím, že RES poskytl průkazné zlepšení sluchu u mladých zdravých dobrovolníků ve velmi krátkém časovém intervalu, v laboratorních podmínkách a v relativně nízkých dávkách.

Je jisté, že pro nízký počet dobrovolníků a mnoha dalším faktorům, nebude tato práce ve vědeckých kruzích brána jako dostatečně průkazná a nebude na úrovni studie. Ale díky takto překvapivým výsledkům v takovýchto podmínkách, jež měření mohly zkreslit pouze směrem k negativním výsledkům a tím k neprokázání žádného účinku na biologický věk, by se mohl tento experiment stát jedním z důvodů, proč tuto látku

prozkoumat z hlediska antiaging potenciálu a vlivu na biologický věk detailněji ve větší studii. (33b)

Podíváme-li se na reakční rychlost, u které měřením nebylo zjištěno žádné zlepšení, neměli bychom dělat v tomto směru ihned unáhlené závěry o neúčinnosti zkoumané látky.

Jak bylo výše zmíněno, předpokládaná změna by se dala čekat spíš u starých lidí, u nichž jsou případné změny lépe zaznamenatelné a kteří mají parametry reakční rychlosti opravdu zhoršené. Jejich reakční schopnosti jsou totiž zhoršené na mnoha úrovních.

Úroveň rychlostních schopností je dána svalovým systémem, tj. vysokým podílem FG vláken ve svalech, schopnost aktivovat velký počet motorických jednotek, schopnost střídat napětí, stahy, uvolnit se (v našem případě se tato schopnost projeví v rychlosti stisku klávesy). Dále nervovým systémem, což ovlivňuje přenos informace, vedení vzruchů a energetickým systémem. Ten ovlivňuje, jak rychle sesyntezujeme ATP a jakou máme zásobu kreatinfosfátu. Posledními schopnostmi, jež ovlivní reakční rychlost, jsou psychické předpoklady, které dávají přesnou představu o pohybu, koncentraci a emoční sféře. (34)

Všechny tyto parametry jsou u starých lidí zhoršené, kdežto u mladých nemusí být zhoršený žádný a nebo jen nepatrně. To může být jedním z pádných důvodů, proč neovlivnil reakční rychlost ani trochu. Naproti tomu sluch a zrak mají lepší výpovědní hodnotu, protože se nám zhoršují již od narození. Proto se i u takto mladých lidí má co reparovat a změnu můžeme dostatečně zaznamenat.

Dále je rozhodující v testu reakčních rychlostí míra soustředění a co nejkonstantnější podmínky v obou měřeních, což v předchozím testu pro zaznamenání intenzity hlasitosti až tolik potřeba nebylo.

Nemůžeme tedy bezpečně prohlásit, že RES nemá vliv na reakční rychlosti. Spíše RES neprokazuje naším experimentem zlepšení reakčních rychlostí u mladých zdravých jedinců. Určitě by stálo určitě za pokus, jak by tomu bylo u geriatrických osob.

Přestože je v současnosti dostupných více jak 1000 citací prokazujících potenciál v terapii velkého spektra nemocí, na důkazy z oblasti gerontologie se prozatím čeká.

6 Závěr

Ověřili jsme potenciální účinek resveratrolu na biologický věk člověka. Měřili jsme vybrané parametry a to reakční rychlost a citlivost sluchu. Měření bylo provedeno na třiceti respondentech před užíváním a po čtyřiceti dnech užívání potravinového doplňku Resveratrol, jehož obsah byl změřen a potvrzen na katedře analytické chemie. Dvacet respondentů užívalo doplněk a zbylých deset užívalo jako placebo vitamíny skupiny B, konkrétně B-Complex Generica.

Matematickým a statistickým zpracováním jsme získaly tyto výsledky.

U reakčních rychlostí nedošlo ke zlepšení u experimentální ani kontrolní skupiny. Tomuto výsledku se může přisuzovat mnoho faktorů. Ať už neúčinnost resveratrolu v této indikaci, tak nevhodně zvolená kritéria pro výběr subjektů, především nízký věk.

Naopak u sluchu, u průměrné změny prahové intenzity zvuku v závislosti na frekvenci, jsme dostali jednoznačné výsledky.

Na hladině významnosti 0,01 bylo prokázáno zlepšení parametru sluchu u testované skupiny. Zároveň nebylo zlepšení potvrzeno u kontrolní, placebo skupiny.

Z grafického vyjádření je patrné, že tato změna byla u všech hodnot frekvence. Největší zlepšení bylo v oblasti do 4 KHz (oblast nízkých frekvencí) a poté v oblasti vysokých tónů, od 15 do 19 KHz.

Rešerší literárních pramenů jsme získali mnoho údajů, jež napovídaly, že by ke zlepšení pomocí aktivace sirtuinů nebo i jiným mechanismem mohlo dojít. Tento experiment by se mohl stát podkladem pro návrh a provedení větší studie, jež by námi naměřené výsledky definitivně potvrdila. Tato látka by se mohla stát v oblasti léčby geriatrických pacientů molekulou příštího desetiletí.

8 Použité zkratky

Zkratka	Český význam/ Význam zkratky
AD	Alzheimerova nemoc/Alzheimer disease
Ang II	Angiotenzin II
ATP	Adenosin tri fosfát
BERA	Druh audiometrie/Brainstem evoked audiometry
BMD	Referenční dávka
BP	Krevní tlak/blood pressure
BV	Biologický věk
CON	Kontrolní skupina/controled group
CNS	Centrální nervový systém
CURT	Poškození vyvolané kortikoidem
EAE	Experimentální autoimunitní encefalomyelitida
EMA	Evropská léková agentura
Gy	Gama záření
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv/Food Drug administration
HF	Vysokokalorická strava/High food calories
HPV	Herpes papilomavirus
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IGF-1	Růstový faktor 1
LDH	Laktát dehydrogenázy
MDA	Malondialdehyd
NHP	Primát/nonhuman primate
NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
NO	Oxid dusnatý
OAE	Otoakustické emise
p	Hladina pravděpodobnosti
PGC	Aktivované receptory gama
RES	Resveratrol
RD	Odchlípená sítnice/Retinal detachment
ROS	Kyslíkové radikály
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce
SR	Skupina respondentů 1-20 s RES
SP	Skupina respondentů 21-30 bez RES
SCI	poranění míchy
SIR	Sirtuiny
SHR	Hypertenzní model/The spontaneously hypertensive rat
SOD	Radikály
SSEP	Somatosenzorické evokované potenciály
TMEV-IDD	Theilerova encefalomyelitida
USA	Spojené státy americké
UZ	Ultrazvuk
VNR	Vinorelbin
WHO	Světová zdravotnická organizace
WSD	Vysokokalorická strava během těhotenství
XRT	Radioterapie

Seznam tabulek

Tabulka 1 Koncentrace resveratrolu v běžných druzích potravin.....	13
Tabulka 2 Přehled látek posilující obranu proti volným radikálům.....	30
Tabulka 3 Optimální podmínky pro HPLC analýzu	54
Tabulka 4 Obsah Resveratrolu Max 80 mg.....	54
Tabulka 5 Ukázka výstupních hodnot subjektu č.1 ze skupiny SR	58
Tabulka 6 Výsledky párového t-testu subjektů na hladině významnosti 0,05 a 0,01	61
Tabulka 7 Průměrné změny prahových hodnot skupiny SR a SP.....	62
Tabulka 8 Průměrná změna prahové intenzity na frekvenci	64
Tabulka 9 Změny hodnot u experimentů a kontrol.....	66
Tabulka 10 Výsledky hodnocení vlivu RES na rychlost reakce	67

Seznam obrázků

Obrázek 1 Resveratrol a jeho formy	11
Obrázek 2 Viniferin	11
Obrázek 3 Amurensin	12
Obrázek 4 Biosyntéza resveratrolu	14
Obrázek 5 Kyselina gallová-základ polyfenolů	16
Obrázek 6 Polyfenol z kondenzace kyseliny gallové.....	16
Obrázek 7 Vinorelbin.....	21
Obrázek 8 Etoposid.....	22
Obrázek 9 Děložní průtok	25
Obrázek 10 Radikálová reakce.....	29
Obrázek 11 Chemická struktura melatoninu.....	31
Obrázek 12 Hladina melatoninu v závislosti na věku	32
Obrázek 13 Aktivace sirtuinů nízkokalorickým příjmem a jejich vliv na organismus	35
Obrázek 14 Anatomie sluchového aparátu	46
Obrázek 15 Hlasitost běžných zvukových vjemů	48
Obrázek 16 Ukázka výstupních dat pro respondenta ze skupiny SR.....	57
Obrázek 17 Ukázka diferencí a jejich průměru subjektu ze skupiny SR.....	60
Obrázek 18 Výsledky subjektu 1	61
Obrázek 19 Výsledek	63

Seznam grafů

Graf 1 Závislost prostého blízkého bodu na věku.....	42
Graf 2 Závislost zrakové ostrosti na stáří.....	43
Graf 3 Věková závislost prahu vnímání vysokých tónů	44
Graf 4 Průměrné změny intenzity zvuku na frekvenci.....	65

9 Použitá literatura

1. VINAŘ O. Je pití červeného vína zdravé? A proč? [online]. Vesmír, 2010. 89, Dostupné z WWW: <http://www.vesmir.cz/> [cit. 8/4/2014]. ISSN 1214-4029.
2. ŠMIDRKAL J., FILIP O., MELZOCH. Resveratrol [online]. Chemické listy 95, 2001. Dostupné z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/cz/index.html> [cit. 8/4/2014]. ISSN 1213-7103.
3. DOLINSKI, CHAKRABARTI. Resveratrol prevents hypertension and cardiac hypertrophy in hypertensive rats and mice [online]. 2013. 1832, 10, 2008, ELSEVIER SCIENCE BV, Dostupné z WWW: www.webofscience.com [cit. 6/3/2013]. ISSN 0925-4439.
4. LACHENMEIER, DW. INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER:Can resveratrol in wine protect against the carcinogenicity of ethanol? A probabilistic dose-response assessment. 2014. USA: WILEY-BLACKWELL, ISSN 0020-7136.
5. CHEN, YY , XIAO, L. Biological Relevance of the Interaction Between Resveratrol and Insulin [online]. Drugs, 2013. 12, NY 10013 USA: National Science Funds of China, Dostupné z WWW: www.webofknowledge.com [cit. 4.12.2013]. ISSN 1557-1858.
6. ALBERDI G., RODRIGUEZ, MIRANDA. Thermogenesis is involved in the body-fat lowering effects of resveratrol in rats. FOOD CHEMISTRY, 2013. 141, 2, England, [cit. 4.12.2013]. ISSN 0308-8146.
7. RINGHOLM, STINE. Effect of lifelong resveratrol supplementation and exercise training on skeletal muscle oxidative capacity in aging mice; impact of PGC-1 alpha. EXPERIMENTAL GERONTOLOGY, 2013. 48, 11, Oxford, England: PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD, [cit. 5/12/2014]. ISSN 0531-5565.
8. SATO, FUMITAKA. Resveratrol Exacerbates Both Autoimmune and Viral Models of Multiple Sclerosis. AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, 2013. NY USA, [cit. 4.12.2013]. ISSN 0002-9440.
9. JAYASENA, POLJAK. Resveratrol, Alzheimer disease [online]. 2013. USA, Dostupné z WWW: <http://apps.webofknowledge.com/> [cit. 8/4/2014].
10. XU, LIPING, YANG, XI. Resveratrol Attenuates Radiation-Induced Salivary Gland Dysfunction in Mice [online]. LARYNGOSCOPE, 2013. 123, 13, NY, USA: WILEY-BLACKWELL, Dostupné z WWW: <http://apps.webofknowledge.com/> [cit. 4.12.2013]. ISSN 0023-852X.

- 11.** ZHANG, JIE. Resveratrol protects against vinorelbine-induced vascular endothelial cell injury. *TOXICOLOGY MECHANISMS AND METHODS*, 2013. 23, 9, London, England: INFORMA HEALTHCAR, [cit. 4.12.2013]. ISSN 1537-6516.
- 12.** GARCIA, ZEPEDA, ENRIQUE. Resveratrol induces cell death in cervical cancer cells through apoptosis and autophagy. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER PREVENTION*, 2013. 22, 6, USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, [cit. 5.12.2013]. ISSN 0959-8278.
- 13.** KUCINSKA, MLAGORZATA. 13. Effects of hydroxylated resveratrol analogs on oxidative stress and cancer cells [online]. 2014. 209, Ireland: ELSEVIER IRELAND LTD, Dostupné z WWW: <http://apps.webofknowledge.com/> [cit. 8/4/2014]. ISSN 0009-2797.
- 14.** MIRANDA, JONATAN, PORTILLO. Effects of resveratrol on changes induced by high-fat feeding on clock genes in rats. *BRITISH JOURNAL OF NUTRITION*, 2013. 110, 8, England: CAMBRIDGE UNIV PRESS, [cit. 5.12.2013]. ISSN 0007-1145.
- 15.** NOVAKOVIC; ILIC; BELESLIN-COKIC. THE EFFECT OF RESVERATROL ON CONTRACTILITY OF NON-PREGNANT RAT UTERUS: THE CONTRIBUTION OF K⁺ CHANNELS [online]. *JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY*, 64, 6, Poland: POLISH PHYSIOLOGICAL SOC, Dostupné z WWW: <http://apps.webofknowledge.com/> [cit. 8/4/2014]. ISSN 0867-5910.
- 16.** YAMAN, DERICI. Effects of resveratrol on incisional wound healing in rats. 2013. 43, 12, USA: SPRINGER, [cit. 6/3/2014]. ISSN 0941-1291.
- 17.** LIU, DEXIANG; ZHANG. Resveratrol prevents impaired cognition induced by chronic unpredictable mild stress in rats [online]. *PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY*, 2014. 49, England: PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD, Dostupné z WWW: <http://apps.webofknowledge.com/> [cit. 8/4/2014]. ISSN 0278-5846.
- 18.** WANG, HUA-DONG; SHI. Treatment with resveratrol attenuates sublesional bone loss in spinal cord-injured rats [online]. *BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY*, 2013. 170, 4, USA: WILEY-BLACKWELL, Dostupné z WWW: <http://apps.webofknowledge.com/> [cit. 8/4/2014]. ISSN 0007-1188.
- 19.** LEE, JIN-HYUNG; KIM, YONG-GUY. Resveratrol Oligomers Inhibit Biofilm Formation of Escherichia coli O157:H7 and Pseudomonas aeruginosa [online]. *JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS*, 2014. 77, 1, USA: AMER CHEMICAL SOC, Dostupné z WWW: <http://apps.webofknowledge.com/> [cit. 8/4/2014]. ISSN 0163-3864.

- 20.** HUANG, LI. Protective Effects of Resveratrol in Experimental Retinal Detachment. 2013. 8, 9, USA: PUBLIC LIBRARY SCIENCE, [cit. 6/3/2014]. ISSN 1932-6203.
- 21.** ĐOUBAL S., GERONTOLOGICKÉ PRACOVIŠTĚ KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA UK V HRADCI KRÁLOVÉ. Web gerontologie [online]. Dostupné z WWW: <http://apps.faf.cuni.cz/Gerontology/> [cit. 3/3/2014].
- 22.** DVOŘÁKOVÁ, PŘIBYLOVÁ, MAREK. SIRTUINY - HISTONOVÉ DEACETYLASY OVLIVŇUJÍCÍ TRANSKRIPCI GENŮ [online]. Chemické listy, 2013. 107, Dostupné z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/> [cit. 8/4/2014]. ISSN 1213-7103.
- 23.** MATTAGAJASINGH I., KIM C. S., NAQVI A. Resveratrol activates sirtuins. 2000. USA.
- 24.** ĐOUBAL S., GERONTOLOGICKÉ PRACOVIŠTĚ KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE, FARMACEUTICKÁ FAKULTA UK V HRADCI KRÁLOVÉ. Biologický věk [online]. Dostupné z WWW: <http://apps.faf.cuni.cz/Gerontology/> [cit. 8/4/2014].
- 25.** HÁLEK J. Materiály k přednáškám z předmětu Lékařská biofyzika, Lékařská fakulta University Palackého v Olomouci. 2002. Olomouc, [cit. 8/4/2014].
- 26.** ŠPITÁLSKÝ J. Praktikum z lékařské biofyziky. 1997. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého, ISBN 80-7067-757-0.
- 27.** KRÁLOVÁ M. Akustika [online]. Dostupné z WWW: http://www.techmania.cz/edutorium/art_exponaty.php [cit. 3/1/2014].
- 28.** HAHN A. A KOL. Otorinolaryngologie a foniatrie v současné praxi. 2007. Praha: Grada Publishing, ISBN 978-80-247-0529-3.
- 29.** ĐOUBAL S., KUCHAROVÁ M., REJCHRT P. Praktická cvičení z biofyziky. 2009. 2. vyd., Praha: Karolinum, ISBN 978-80-246-1725-1.
- 30.** JAROSLAV PÁVEK. Úvod do biomedicínské informatiky: Audiometrie [online]. 2004. Praha, Dostupné z WWW: http://gerstner.felk.cvut.cz/biolab/X33BMI/referaty/2004_2005_ZS/audiometrie.pdf [cit. 3.12.2013].
- 31.** JIŘÍ PAZOUREK. Dostupné z WWW: <http://www.celostnimedicina.cz/resveratrol--preventivni-prostredok-proti-rakovine.htm> [cit. 2/12/2013].

- 32.** MENTIO S.R.O. Audiotest Mentio, zvuky [online]. Dostupné z WWW: http://www.mentio.cz/mentio/zv_audiotest.htm [cit. 8/4/2014].
- 33.** FVHE. Testování hypotéz ve statistice [online]. Dostupné z WWW: <http://cit.vfu.cz/statpotr/POTR/prednasky.htm> [cit. 8/4/2014].
- 33.** EUROMISE. Náhodné a systematické chyby v epidemiologických studiích [online]. Dostupné z WWW: <http://ucebnice.euromise.cz/> [cit. 8/4/2014].
- 34.** FSPS. Rychlostní schopnosti [online]. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/> [cit. 8/4/2014].

10 Přílohy

Příloha č. 1 Hodnoty Q

frekvence	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
20	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,2	-0,3	-0,1	0,1	0,1	-0,2
50	-0,1	0,0	0,0	-0,1	-0,2	-0,2	-0,2	0,0	-0,2	-0,3
100	-0,3	-0,1	-0,1	0,0	-0,1	-0,2	0,0	-0,1	0,0	-0,3
200	0,0	-0,1	0,0	0,0	-0,1	-0,3	-0,3	-0,3	-0,2	-0,2
500	-0,2	-0,2	-0,2	-0,1	0,0	-0,1	-0,2	0,0	-0,2	-0,1
1000	-0,1	-0,2	-0,1	0,0	-0,1	-0,2	-0,2	-0,2	-0,1	-0,2
2000	-0,1	-0,1	-0,1	0,0	0,0	-0,2	-0,6	-0,1	-0,1	-0,1
3000	0,0	-0,1	-0,3	0,0	-0,1	0,0	-0,5	0,0	0,0	0,0
4000	0,1	-0,2	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,4	-0,2	-0,1	0,0
5000	-0,2	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,0	-0,1	0,0
6000	-0,1	-0,2	-0,1	0,0	-0,2	-0,3	0,0	-0,2	-0,2	0,0
7000	0,0	0,1	0,0	0,0	-0,2	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,2
8000	0,0	-0,1	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	-0,1	-0,1	-0,1
9000	-0,4	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,1	-0,1	-0,2
10000	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	0,0	-0,2
11000	-0,2	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	-0,2	-0,1	-0,1	-0,1
12000	-0,2	-0,2	-0,1	-0,2	0,0	-0,5	-0,2	0,0	-0,1	-0,4
13000	-0,4	-0,2	-0,1	-0,2	-0,1	-0,5	-0,3	-0,1	0,1	-0,4
14000	-0,2	-0,2	-0,2	-0,2	-0,1	-0,4	-0,4	0,0	0,1	-0,6
15000	-0,3	-0,2	-0,1	0,0	-0,2	-0,9	-0,5	-0,2	-0,3	-0,7
16000	-0,5	-0,3	-0,2	0,0	-0,6	-0,8	-0,3	-0,2	-0,3	-0,7
17000	-0,4	-0,2	-0,3	-0,3	-0,8	-0,7	-0,4	-0,1	0,0	-0,6
18000	-0,6	-0,4	-0,2	-0,1	-0,5	-0,4	-0,2	-0,3	0,0	-0,7
19000	0,0	-0,3	0,0	0,1	-0,6	#N/A	#N/A	-0,5	#N/A	-0,5

frekvence	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
20	-2,0	-1,1	-0,6	-0,4	-0,4	-0,6	-1,0	-0,5	-0,8	-1,6
50	-2,2	-0,6	-1,2	-1,1	-0,6	-0,5	-0,9	-0,4	-1,4	-1,3
100	-0,4	-0,3	-0,4	-0,2	-0,3	-0,4	-0,7	-0,4	-1,0	-2,4
200	-0,3	-0,5	-0,7	-0,4	-0,5	-1,2	-0,5	-0,6	-0,3	-2,3
500	-0,2	-0,3	-0,1	-0,5	-0,2	-0,9	-0,8	-0,7	-0,1	-1,2
1000	-0,2	-0,2	-0,3	-0,6	-0,1	-0,7	-1,1	-0,4	-0,6	-0,5
2000	-0,9	-0,7	-0,4	-0,5	0,1	-0,3	-0,3	-0,6	-0,5	-0,7
3000	-0,4	-0,4	-0,4	-0,3	-0,7	-0,9	-0,2	-0,4	-0,2	-1,1
4000	0,0	-0,1	-0,3	-0,4	-0,6	-0,6	0,3	-0,6	-0,3	-1,0
5000	0,0	-0,2	-0,6	-0,3	-0,1	-0,2	-0,2	-0,8	-0,1	-1,5
6000	-0,2	-0,1	-0,4	0,0	-0,1	-0,2	-0,1	-0,3	-0,1	-0,9
7000	-0,2	-0,1	-0,2	0,0	0,0	-0,4	-0,2	-0,2	0,0	-0,7
8000	0,0	-0,1	-0,1	0,0	-0,3	-0,2	-0,2	-0,3	-0,1	-0,4
9000	-0,2	-0,1	-0,1	0,0	-0,3	-0,4	-0,3	-0,2	0,1	-0,5
10000	0,0	-0,2	0,0	-0,3	-0,5	-0,2	-0,2	-0,1	-0,5	-0,4
11000	0,0	-0,1	-0,2	-0,2	-0,5	-0,1	-0,1	-0,5	-0,4	-0,4
12000	-0,3	0,0	-0,2	-0,4	-0,2	-0,3	-0,2	-0,4	-0,2	-0,5
13000	-0,3	-0,2	-0,2	-0,6	-0,8	-0,5	-0,2	-0,1	-1,0	-0,2
14000	-0,5	-0,3	-0,2	-0,7	-0,4	-0,5	-0,3	0,0	-0,7	-0,6
15000	-0,8	-0,4	-0,3	-0,6	-0,2	-0,6	-0,8	-0,5	-0,6	-1,2
16000	-1,0	-1,0	-0,3	-1,0	-0,1	-0,6	-0,7	-0,8	-1,1	-1,4
17000	-0,9	-1,0	-0,7	-0,9	-0,4	-0,4	-1,1	-1,0	-1,5	-0,4
18000	-0,3	-1,1	-0,7	-0,5	0,0	-0,4	-1,6	-0,8	-1,6	-1,2
19000	#N/A	-0,7	-0,7	-0,2	#N/A	-0,2	-0,9	-1,8	-1,6	-1,4

frekvence	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
20	-0,2	-0,1	-0,3	0,1	0,4	-0,2	-0,3	-0,1	0,0	0,0
50	-0,6	0,5	0,0	-0,3	0,9	-0,1	-0,1	0,5	0,1	0,1
100	-0,2	0,0	-0,3	0,0	-0,4	-0,4	0,3	0,0	0,1	-0,3
200	-0,2	-0,3	-0,2	-0,3	0,3	0,5	-0,1	-0,3	0,5	0,4
500	-0,6	0,6	-0,1	-0,6	-0,1	0,6	0,0	-0,2	0,8	0,3
1000	-0,4	0,4	-0,2	0,1	0,9	0,0	0,2	-0,1	0,2	-0,1
2000	-0,1	-0,1	-0,3	0,3	0,6	0,3	0,2	-0,1	0,0	0,1
3000	0,3	0,1	0,1	0,5	0,6	0,2	0,2	-0,3	-0,2	-0,3
4000	0,0	0,1	0,0	0,5	0,1	0,1	0,0	-0,3	0,4	-0,2
5000	-0,2	0,1	-0,3	-0,3	0,1	0,2	0,6	0,1	0,5	-0,1
6000	-0,3	0,0	0,2	-0,3	-0,1	0,1	0,1	0,1	0,5	0,2
7000	0,1	0,2	0,2	0,3	0,1	-0,2	-0,1	0,2	0,2	0,0
8000	-0,2	0,0	-0,2	0,3	0,1	0,2	-0,1	0,0	0,2	-0,2
9000	0,1	-0,1	0,1	-0,4	0,0	0,3	-0,1	0,1	-0,1	0,5
10000	0,1	0,1	-0,1	-0,4	-0,1	0,1	0,1	-0,1	0,1	0,0
11000	0,1	0,1	0,2	-0,1	-0,2	0,2	0,4	-0,3	0,0	0,0
12000	-0,2	-0,2	0,1	0,4	0,1	0,0	0,3	-0,2	0,1	0,1
13000	0,1	-0,2	0,0	-0,2	-0,3	0,0	0,3	0,2	-0,1	0,1
14000	-0,4	-0,3	-0,4	-0,3	0,0	-0,3	0,2	-0,3	-0,2	-0,3
15000	0,0	0,3	-0,5	-0,1	0,1	-0,3	-0,1	-0,3	0,3	0,0
16000	0,1	0,2	-0,2	0,4	-0,2	-0,1	-0,1	0,1	-0,3	0,1
17000	0,0	0,5	-0,1	-0,1	-0,2	-0,1	0,0	0,1	-0,2	-0,2
18000	-0,1	-0,1	0,4	0,1	0,1	0,1	-0,3	0,1	-0,3	0,0
19000	0,1	0,1	0,4	-0,5	0,3	-0,3	0,0	0,1	-0,4	0,1