

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká Fakulta

Studijní program: Biologie

Obor: Biologie



Hana Matušková

Význam oxidu dusnatého při vzniku neurodegenerativních
onemocnění

The role of nitric oxide in the pathophysiology of
neurodegenerative diseases

Bakalářská práce

Praha 2014

Autor práce: **Hana Matušková**

Vedoucí práce: **doc. MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D.**

Oponent práce:

Datum obhajoby:

Hodnocení:

Bibliografický záznam

MATUŠKOVÁ, Hana. *Význam oxidu dusnatého při vzniku neurodegenerativních onemocnění*. Praha. Karlova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie živočichů, 2014. 33 s. Vedoucí bakalářské práce doc. MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá významem oxidu dusnatého při vzniku neurodegenerativních onemocnění. Oxid dusnatý je biologický aktivní plyn, který má, kromě jiného, vliv na řadu funkcí centrální nervové soustavy. Jeho působení je závislé na koncentraci, v malém množství má pozitivní vliv, při nadprodukcí výrazně přispívá rozvoji neurodegenerativních onemocnění. Ve své práci se zabývám negativním vlivem oxidu dusnatého při vzniku epileptických záchvatů, Parkinsonovy nemoci, Alzheimerovy nemoci a Huntingtonovy nemoci. V závěru práce jsem se zmínila o možnostech stanovení výše koncentrace oxidu dusnatého.

Klíčová slova

Oxid dusnatý, ROS, RNS, neurodegenerativní onemocnění, epileptické záchvaty, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc, Huntingtonova nemoc

Abstract

The bachelor thesis deals with the importance of nitric oxide in the development of neurodegenerative diseases. Nitric oxide is a biological active gas which affects, among other things, many functions of the central nervous system. Its activity is dependent on the concentration in small amounts has a positive effect, while overproduction contributes significantly to the development of neurodegenerative diseases. In my work, I deal with the negative influence of nitric oxide in the development of epileptic seizures, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and Huntington's disease. In conclusion, I mentioned the possibility of determining the amount of nitric oxide concentration.

Keywords

Nitric oxide, ROS, RNS, neurodegenerative diseases, epileptic seizures, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Huntington's disease

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato práce byla zpřístupněna v příslušné knihovně UK a prostřednictvím elektronické databáze vysokoškolských kvalifikačních prací v repozitáři Univerzity Karlovy a používána ke studijním účelům v souladu s autorským právem.

V Praze dne 3. května 2014

Hana Matušková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. MUDr. Jakobovi Otáhalovi, Ph.D. za jeho ochotu, čas a zájem při vedení mé závěrečné práce. Dále děkuji své rodině za podporu během celého studia.

Seznam použitých zkratk

- AD** – Alzheimerova nemoc (Alzheimer's disease)
- AMPA** – α -amino-hydroxy-metyl-isooxazol-propionát (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate)
- APO E** – apolipoprotein E
- APP** – amyloidový prekurzorový protein (amyloid precursor protein)
- ATP** – adenosin trifosfát (adenosine triphosphate)
- PDI** – protein disulfidizomeráza (protein disulfide isomerase)
- cGMP** – cyklický guanosin monofosfát (cyclic guanosine monophosphate)
- NO₂** – oxid dusičitý (nitrogen dioxide)
- CNS** – centrální nervová soustava (central nerve system)
- DNA** – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
- eNOS** – endoteliální syntáza oxidu dusnatého (endothelial nitric oxide synthase)
- ER** – endoplazmatické retikulum (endoplasmic reticulum)
- FAD** – flavinadenindinukleotid (flavin adenine dinucleotide)
- FMN** – flavinmononukleotid (flavin adenine mononucleotide)
- GABA** – kyselina gaba-aminomáselná (gamma-aminobutyric acid)
- HD** – Huntingtonova nemoc (Huntingtin's disease)
- iNOS** – indukibilní syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxide synthase)
- KA** – kainát (kainate)
- metHb** – methemoglobin
- mtNOS** – mitochondriální syntáza oxidu dusnatého (mitochondrial nitric oxide synthase)
- N₂O₃** – oxid dusitý (dinitrogen trioxide)
- NADPH** – nikotinamidadenindinukleotidfosfát (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
- NGF** – nervový růstový faktor (nerve growth factor)
- NMDA** – N-methyl-D-asparagová kyselina (N-methyl-D-aspartate)
- nNOS** – neuronální syntáza oxidu dusnatého (neuronal nitric oxide synthase)
- NO** – oxid dusnatý (nitric oxide)
- O₂** – kyslík (oxygen)
- oxyHb** – oxyhemoglobin
- PD** – Parkinsonova nemoc (Parkinson's disease)

PUFA – omega-3 nenasycené mastné kyseliny (polyunsaturated fatty acids)

RNS – reaktivná formy dusíku (reactive nitrogen species)

ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)

SE – status epilepticus

SNP – jednonukleotidové polymorfismy (single-nucleotide polymorphism)

Obsah

ÚVOD	4
1. OXID DUSNATÝ	5
1.1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA.....	5
1.2. CHEMICKÉ REAKCE	5
1.3. LOKALIZACE	7
1.3.1 <i>Neuronální syntéza oxidu dusnatého</i>	8
1.4 INTERAKCE OXIDU DUSNATÉHO S OSTATNÍMI BUNĚČNÝMI MOLEKULAMI.....	9
2 EPILEPTICKÉ ZÁCHVATY	11
2.1 STATUS EPILEPTICUS	13
2.2 EPILEPTOGENEZE	13
2.3 VÝZNAM GLUTAMÁTU A OXIDU DUSNATÉHO PŘI ROZVOJI EPILEPTICKÝCH ZÁCHVATŮ.....	14
2.4 LÉČBA EPILEPTICKÝCH ZÁCHVATŮ	14
3 PARKINSONOVA NEMOC	16
3.1 VZNIK A ROZVOJ PARKINSONOVY NEMOCI.....	17
3.2 LÉČBA PARKINSONOVY NEMOCI	18
4 ALZHEIMEROVA NEMOC	19
4.1 CHARAKTERISTICKÉ MARKERY	20
4.2 PATOLOGIE ALZHEIMEROVY NEMOCI.....	20
5 HUNTINGTONOVA NEMOC	21
6 DETEKCE OXIDU DUSNATÉHO	22
6.1 PŘÍMÁ STANOVENÍ	22
6.2 NEPŘÍMÁ STANOVENÍ.....	22
6.3 DETEKCE V BIOLOGICKÝCH SYSTÉMECH.....	23
ZÁVĚR	24
POUŽITÁ LITERATURA	25

Úvod

Oxid dusnatý je vysoce reaktivní molekula, která patří mezi významné regulátory mnoha fyziologických funkcí v těle. Její ojedinělost spočívá ve schopnosti ovlivňovat tyto pochody pozitivně i negativně v závislosti na své koncentraci.

V první části bakalářské práce se zabývám samotnou molekulou oxidu dusnatého – obecnou charakteristikou, chemickými reakcemi, lokalizací v těle, interakcí a negativním vlivem na buněčné komponenty. V kapitolách lokalizace a interakce s buněčnými komponenty se zaměřuji na CNS. V práci jsou probírány a detailněji vysvětlovány pouze negativní mechanismy oxidu dusnatého, které mají přímou souvislost s onemocněními vyznačujícími se neurodegenerací.

Druhá část je věnována neurodegenerativním onemocněním, s nimiž má oxid dusnatý souvislost. Jejich výběr je proveden na základě frekvence výskytu v populaci. Mezi modelová onemocnění, kterými se detailněji zabývám, patří: epileptické záchvaty, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc a Huntingtonova nemoc. Uvádím jejich obecnou charakteristiku, klasifikaci, popřípadě léčbu a mechanismus vzniku a rozvoje v souvislosti s oxidem dusnatým.

Na závěr se zmiňuji o obecných metodách detekce oxidu dusnatého a metodách, které jsou zaměřené na přímou detekci v biologických systémech.

Čerpám převážně z elektronických článků odborných portálů a kombinuji informace získané z článků starších a aktuálních. Cílem mé bakalářské práce je uvést do problematiky působení oxidu dusnatého, se zaměřením na procesy účastníci se neuronální buněčné smrti, které se velkou měrou podílejí na rozvoji zmíněných neurodegenerativních onemocnění.

1. Oxid dusnatý

1.1 Obecná charakteristika

Oxid dusnatý (NO) je jednoduchá dvouatomová molekula, která patří mezi radikály. Je to bezbarvý plyn, lipofilní povahy. Jeho vysoká reaktivita spočívá v přítomnosti jednoho nepárového elektronu, kvůli kterému je schopen reagovat s ostatními molekulami s nepárovým elektronem, jako je např. superoxid (O_2^-)

NO vzniká oxidací L-argininu molekulárním kyslíkem, kromě NO vzniká také L-citrulin. Celá reakce je katalyzována NO syntázou, která má 3 isoformy: neuronální NOS (nNOS), která se vyskytuje v neuronech; indukibilní NOS (iNOS), kterou najdeme v makrofázích a endoteliální NOS (eNOS) vyskytující se v endotelech. Exprese nNOS a eNOS je závislá na Ca^{2+} , zatímco iNOS je na Ca^{2+} nezávislá. Zvýšená exprese NO iNOS souvisí se zánětem a oxidativním stresem, je tedy spojena s imunitní odpovědí organismu. Pro svou katalýzu potřebují NOS kofaktory NADPH, FAD, FMN a kalmodulin.

NO plní v CNS funkci neurotransmiteru, produkovaný eNOS funguje jako vazodilátor a regulátor průtoku krve mozkem. Povaha působení NO je závislá na koncentraci. V malých koncentracích reguluje desítky fyziologických procesů probíhajících v těle. Jeho nadprodukce je ovšem pro tělo toxická a účastní se patologických procesů mnoha chorob, mezi které patří epileptické záchvaty, Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc, Huntingtonova nemoc aj. Reakce NO mohou způsobovat vznik oxidativního a dusíkatého stresu. Oxidativní stres najdeme u zánětlivých onemocnění, nitrosativní stres, na druhou stranu, stojí za vznikem nitrosaminů.[1 s. 3, 12, 13]

1.2. Chemické reakce

NO je schopen rychle reagovat s ostatními volnými radikály s nepárovým elektronem a s molekulami s přechodnými kovy jako jsou například železo v hemoglobinu a cytochrom c – oxidáza.[2] Reakce NO lze rozdělit do třech hlavních skupin: aktivace guanylátcyklázy, destrukce reakcí s oxyhemoglobinem a reakce se superoxidem za vzniku peroxynitritu. [3]

Superoxid vzniká redukcí molekulárního kyslíku (O_2) jedním elektronem. Vzniklý superoxid má tedy nepárový elektron a velice snadno, stejně jako NO, reaguje s ostatními molekulami s nepárovým elektronem. K jeho vzniku v mitochondriích

dochází v komplexu I a komplexu III elektron – transportního řetězce. Koncentraci superoxidu reguluje superoxidodismutáza. Ta je schopná, v případě zvýšené koncentrace superoxidu, změnit ho v peroxid vodíku, který je uvolněn z mitochondrie a plní funkci sekundárního posla.[4] Peroxynitrit vzniklý reakcí NO a superoxidu nepatří mezi volné radikály, jelikož dva nepárové elektrony výchozích látek dávají vzniknout nové vazbě. Peroxynitrit je toxický a jeho toxicita vychází ze schopnosti oxidovat SH skupiny bílkovin, atomů železa a síry v biologických molekulách a z peroxidace lipidů. Může indukovat poškození DNA a apoptózu.[5] Dále ve vyšších koncentracích způsobuje relaxaci cév a zvyšuje cGMP v hladkém svalstvu. Jeho toxicita je dána především jeho stabilitou ve formě anionu v zásaditém prostředí. To mu umožňuje difundovat buňkou na dlouhé vzdálenosti. Naopak ve formě kyseliny velmi rychle izomerizuje na dusičnany.

Aktivace guanylátcyklázy probíhá přes vazbu NO na železitý hem. Jeho uvolnění není zcela jasné. Aktivace guanylátcyklázy spouští produkci cGMP, které má škálu účinků v organismu, jedním z takových je relaxace hladkých svalů a následné zvýšení světlosti cév.

NO snadno difunduje v hydrofilním i lipofilním prostředí, reaguje tedy s většinou intracelulárních komponent. Pokud difunduje do krevního řečiště do červených krvinek je eliminován oxyhemoglobinem. Reakcí NO s oxyhemoglobinem (oxyHb) vzniká methemoglobin (metHb) a dusičnan.

Vysoká koncentrace NO spolu s molekulárním kyslíkem dává vzniknout oxidu dusičitému (NO_2). NO_2 je silný a toxický oxidant. Může dále dimerizovat za vzniku N_2O_4 , který již nemá charakter radikálu, ale vyskytuje se v atmosféře jako polutant. Vyšší dávky NO_2 či N_2O_4 způsobují poškození epitelálních buněk, dýchacích cest včetně fibrózy.[5]

V přítomnosti kyslíku podléhá oxid dusnatý autooxidaci. Produktem této reakce je NO_2 či N_2O_3 . Rychlost autooxidace závisí na koncentraci NO a také O_2 , za anaerobních podmínek neprobíhá. Primárním místem autooxidace je v biologických systémech hydrofobní prostředí (buněčné membrány).[6]

Většina reakcí NOS se děje prostřednictvím S-nitrosylace, což je modifikace postranního řetězce cysteinu pomocí NO. Nitrosylace může probíhat u většiny proteinů, není nijak omezena buněčným typem či funkcí. Nitrosylace je v mnoha ohledech velmi podobná fosforylaci. Oba dva typy reakcí jsou zdrojem efektorů v mnoha buněčných funkcích.[7]

1.3. Lokalizace

NOS se nachází v celé buňce v závislosti na své funkci a chemickém osudu produkovaného NO. Přestože NO reguluje genovou transkripci a je schopen poškodit DNA, nejsou přímé důkazy o tom, že by se NOS nacházela přímo v jádře.[4]

V souvislosti s tím, že je NO schopen difundovat z místa syntézy do intracelulárních i extracelulárních částí, se může NO nacházet v presynaptickém, synaptickém či postsynaptickém prostoru. Pokud je produkce NOS v postsynaptické oblasti zvýšená, dochází k difuzi do presynaptické oblasti, kde má zpětný efekt na uvolňující se neurotransmitery. Specifická syntáza NO mitochondrií (mtNOS) v mozku byla popsána v souvislosti s inhibicí cytochrom oxidázy.[9] mtNOS je připojena na komplex I (NADH-ubichinonreduktáza) a komplex IV (cytochrom c-oxidáza) dýchacího řetězce. MtNOS je považována za hlavní mediátor oxidativního poškození během ischemie. Mitochondriální dysfunkce a snížení koncentrace mtNOS v hipokampu jsou signálem jaterní encefalopatie. Aktivita a exprese mitochondrií a mtNOS v mozku je závislá na věku. Schopnost NO inhibovat dýchací řetězec a tím i tvorbu energie má zásadní vliv na funkci neuronů. Dále bylo zjištěno, že je marker stárnutí mozku. Dysfunkce mitochondrií se projevuje patogenezi neurodegenerativních chorob jako je Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba či epileptické záchvaty.[10] Vývoj mozku v prenatálním i postnatálním vývoji je regulován intramitochondriálním O_2^- a NO v ustáleném stavu. Ustálený stav zajišťuje aktivita mtNOS a Mn-superoxid dismutáza.[11]

Signalizace NO se projevuje také při mitochondriální biogenezi. Součástí biogeneze je vznik a proliferace buněk v játrech, srdci a mozku. Dále je spolu s buněčnou smrtí důležitá pro udržení rovnováhy v mitochondriích. Biogeneze je regulována cytosolickým NO, který aktivuje guanylát cyklázu a produkci cGMP. Zvyšující se hladina cGMP aktivuje transkripční faktory např. jaderné transkripční faktory NRF-1 a mitochondriální transkripční faktory a tím je odstartován proces mitochondriální biogeneze. Celý proces je inhibován oxidací a nitrací mitochondriálních proteinů.[10]

NO jako součást imunitního systému je přítomen během infekce a zánětu a hraje zde zásadní roli. K antimikrobiálnímu působení NO dochází přes několik mechanismů jako je mutace DNA, inhibice syntézy a oprav DNA, inaktivace enzymů, atd.[13] Funkce červených krvinek je udržována transportem a uvolněním NO a to

prostřednictvím tvorby ATP. Mezi tyto funkce patří transport kyslíku do namáhaných tkání a orgánů a regulace tlaku.[12] Aplikace ATP do endoteliálních buněk zvyšuje syntézu NO.

V hladkém svalstvu a endoteliích je lokalizován P2x purigenní receptor a výsledkem jeho aktivace je syntéza NO. Další složkou krve schopnou produkovat NO jsou krevní destičky. Primární funkce krevních destiček je udržování homeostázy a prevence před ztrátou krve během poranění. NO jakožto inhibitor krevních destiček se ukázal být také zprostředkovatelem aktivace guanylát cyklázy spouštějící protein kinázovou dráhu, která zabraňuje ztrátě krve.[17]

1.3.1 Neuronální syntéza oxidu dusnatého

Syntéza NO v nervovém systému hraje zásadní roli ve fyziologii savců.[13] nNOS se nachází cytoplazmě, mitochondriích, jádře a v nervovém systému v oddělených populacích neuronů v mozečku, kůře, hipokampu, mozgovém kmeni, atd. [13] Lokalizace v podstatě navazuje na distribuci NMDA receptorů obsahující PDZ doménu.[16] Distribuce v mozku nemusí být pouze neuronální, byla objevena také v astrocytech. V průběhu vývoje embrya dochází k nejintenzivnější expresi nNOS ve vyvíjejícím se nervovém systému v čichových neuronech, thalamu a mozkové kůře.[62]

Aktivita nNOS je regulována různými způsoby jako jsou například vazba na kalmodulin, interakce protein-protein nebo fosforylace.[20]

Regulace nNOS fosforylací patří mezi nejdůležitější mechanismy, kterými je negativně regulována enzymová aktivita.[19] Některé výzkumy nasvědčují tomu, že takto inhibovaná syntéza během mozkové ischemie může omezit škody způsobené NO. Další možností regulace nNOS je vazba vápníku na kalmodulin, čímž dochází k její aktivitě. nNOS se může vázat také na různé izoformy kaveolinu v kaveolách membrány a může tak regulovat aktivitu kompeticí s vápníkem a inhibovat syntézu NO. V kosterním svalstvu se váže na kaveolin-3 a v hladkém svalstvu na kaveolin-1. SNP's genu v promotoru nNOS může výrazně přispět k rozvoji chorob.[18]

Existuje několik typů nNOS. V příčně pruhovaném a kosterním svalstvu a nervové tkáni dochází nejčastěji k expresi nNOS λ . U člověka gen pro tuto syntázu leží na 12. chromozomu.[90] nNOS je složena z několika domén, které obsahují vazebné místo. Jsou to reduktázová doména obsahující vazebné místo pro NADPH a flavonoidy a kyslíková doména obsahující vazebné místo pro hem, L-arginin a nejspíše H₄ biopterin.[16] nNOS může asociovat buď s hrubým endoplazmatickým retikulem, což je

typické v oblasti mozku nebo se sarkolemou v případě kosterního svalstva. Vazba se sarkolemou je zprostředkována připojením N-koncové části na dystrofin.[8] nNOS je v nativním stavu inaktivní a pro svou aktivaci vyžaduje vazbu vápníku na kalmodulin, stejně jako je tomu u iNOS.[16] Působení NO syntetizovaným nNOS mohou způsobovat Alzheimerovu chorobu, Parkinsonovu chorobu atd. Tomu lze předejít nNOS inhibitory, díky jejichž výzkumu se zjistilo, že poskytují zásadní snížení rozsahu některých chorob (např. infarkt).[23] Inhibitory nNOS můžeme dělit na skupinu jednoduchých inhibitorů, kam patří kofaktory a substráty, jejichž inhibice je založená na kompetici. Další skupinou je inhibice založená na určitém mechanismu a dále sem patří inhibice v souvislosti s interakcí protein – protein a enzym - regulační protein. [15]

1.4 Interakce oxidu dusnatého s ostatními buněčnými molekulami

Jak už bylo řečeno, působení NO v těle je závislé na koncentraci. Jeho patofyziologie je spojena s nadprodukcí nNOS a iNOS v mozku nebo mechanismem glutamátové excitotoxicity, dále oxidativním a nitrosativním stresem. Volné radikály a reaktivní formy kyslíku a dusíku poškozují důležité části buňky, mezi které patří jádro, mtDNA, membrány a cytoplazmatické proteiny. Nejrizikovějším faktorem obecně pro neurodegenerativní choroby je věk. Během života dochází k ukládání volných radikálů a ROS, RNS a jejich kumulaci a vzniku poškození. Nejvíce jsou volnými radikály poškozovány neurony, jelikož mají nízký obsah antioxidantu glutathionu, vysoký obsah polynenasycených mastných kyselin (PUFA) a spotřebu vysokého obsahu kyslíku pro metabolické procesy probíhající v mozku.[57] Kvůli vysokému počtu dvojných vazeb jsou PUFA snadno ovlivňovány volnými radikály a podléhají lipidové peroxidaci. Peroxidace lipidů je nekontrolovaný proces, při kterém dochází k poškození polynenasycených mastných kyselin lipidů peroxidy vodíku, z něhož pak dalšími reakcemi vznikají sekundární produkty.[15]

Výsledkem glutamátové excitotoxicity je nadměrná aktivace NMDA receptorů, tím dochází k nadměrnému vstupu Ca^{2+} , aktivaci nNOS a vzniku NO, který může dále reagovat s ostatními ROS za vzniku vysoce toxických radikálů (např. peroxynitrit).[86] Nadprodukce NO způsobuje smrt neuronů, která je podstatou mnoha neurodegenerativních chorob, poškození proteinů, lipidů a DNA. K poškození DNA může dojít přímou reakcí RNS a DNA, která zvyšuje množství genotoxických produktů peroxidace lipidů (např. peroxidu vodíku). Nebo modifikací proteinů nitrací a S-

nitrosylací. Výsledným produktem nitrace je nitrotyrosin, který vzniká přidáním $-\text{NO}_2$ k uhlíku v pozici 3 tyrosinu. Podstatou S-nitrosylace je reakce NO s thiolovou skupinou cysteinu, což působí na jeho změnu aktivity.

Negativní působení NO bylo objeveno také v mitochondriích, ve kterých inhibuje respirační řetězec, a to buď vratnou inhibicí cytochrom oxidázy, nebo nevratnou inhibicí mitochondriálních komponentů.[50] NO odstraňuje železo z železo-sírného centra v cytochromu-c a tím inhibuje syntézu ATP a aktivuje se kaspáza-3, která je signálem pro apoptózu. Redukcí cytochrom c dochází k přesunu elektronu na molekulární kyslík za vzniku superoxidu. Nadměrné množství NO v buňce reaguje se superoxidem za vzniku peroxynitritu.[41] Peroxynitrit patří mezi inhibitory komplexů dýchacího řetězce, kam patří: komplex I (NADH dehydrogenáza), komplex II (sukcinát dehydrogenáza), komplex III (cytochrom c reduktáza) a komplex V (ATP syntáza). K inhibici dochází několika mechanismy: oxidace cysteinu, nitrace tyrosinu nebo poškozením železo-sírného centra. Komplex IV (cytochrom c oxidáza) je vůči inhibici peroxynitritu rezistentní a může být inhibován NO.[20]

NO interaguje také s endoplazmatickým retikulem (ER), což má za následek inhibici aktivity PDI a hromadění polyubikvitovaných proteinů. Výsledným efektem může být neuronální smrt.[26]

Nitrosativní stres se podílí na poškozování buněčných struktur a vzniku neurodegenerativních chorob. Mezi RNS patří S-nitrosothiol, N_2O_3 či peroxynitrit. Dusíkaté radikály inaktivují dýchací řetězec, inhibují proteiny a DNA.[53]

U vzniku neurodegenerativních chorob dále stojí proces imunitní odpovědi, ve kterém se spouští zánětlivá reakce. Mezi hlavní gliové buňky, které se protizánětlivého procesu účastní, patří mikroglie a astrocyty. Za fyziologických podmínek aktivované astrocyty uvolňují trofické faktory (např. NGF), které zvyšují pravděpodobnost přežití neuronů. Aktivované mikroglie produkují cytokiny, interleukin 1- β a volné radikály (NO a O_2^-). Pokud dojde k nekontrolované nadprodukci těchto látek a akumulaci, začnou být škodlivé a přispívají k neurodegeneraci.[20]

Nadprodukce superoxidu nepoškozuje pouze mitochondrie, ale narušuje činnost NMDA receptorů a tím narušuje účinnost hematoencefalické bariéry. Hematoencefalická bariéra je hranice, která reguluje transport látek z krve do CNS, z krve do mozkomíšního moku a zahrnuje i transport opačným směrem. Narušení hematoencefalické bariéry je součástí akutních i chronických neuropatologických poruch (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba,...)[37]

2 Epileptické záchvaty

Epilepsie je označení pro poruchu funkce mozku, která je charakterizována periodickými a nepředvídatelnými záchvaty.[22] Proces, kterým je vyvolána epilepsie, se označuje jako epileptogeneze.[27] Epileptický výboj v mozku dává vzniknout epileptickým záchvatům, které trvají vteřiny až minuty. Mozkové buňky jsou buňky vzrušivé a s ostatními buňkami jsou propojeny výběžky a na jejich impulzy odpovídají elektrickými výboji. Pokud se výboje začnou tvořit nekontrolovaně a ve velkém množství bez předchozího podráždění, mluvíme o epileptických výbojích.[64] Epileptické záchvaty se dělí na fokální a generalizované, které zahrnují kůru obou hemisfér.[23] Fokální záchvaty můžeme dále dělit na simplexní, během kterých je vědomí zachováno, a komplexní, při kterých dochází ke ztrátě vědomí.[22] Vznik záchvatů je závislé na vyzrállosti mozku, stáří, životním stylu (léky, intoxikace alkoholem,..) a na mnoha dalších faktorech. Můžou mít vliv na paměť, vědomí, chování nebo na emocionální stav.[23] Prof. Shorvon z Instrukce neurologie dělí epilepsii do 4 kategorií:

- 1)idiopatická
- 2)symptomatická
- 3)vyvolaná
- 4)kryptogenní

Na vzniku idiopatické epilepsie se podílí převážně geny a dědičnost. Nemá nějaké zvláštní neuroanatomické či neuropatologické projevy. Symptomatická epilepsie může být získaná nebo také způsobena geneticky a objevují se u ní anatomické a patologické abnormality a další klinické projevy, které mohou být známkou vyvíjející se choroby. Provokativní epilepsie je vyvolaná faktory prostředí bez neuroanatomických či neuropatologických změn. Kryptogenní epilepsie je vrozená, není u ní zjištěna příčina.[25]

Epileptické záchvaty jsou rozděleny na dvě velké skupiny - ložiskové a generalizované.

<i>Klasifikace epileptických záchvatů</i>	<i>Rozdělení</i>	<i>Hlavní projevy</i>
Ložiskové	Simplexní	bez ztráty vědomí
	Komplexní	ztráta vědomí
	Ložiskové záchvaty druhotně generalizované	přecházející do generalizovaných záchvatů
Generalizované	Absence	záraz, zblednutí/zčervenání
	Myoklonické	rychlé sval. záškuby, bez ztráty vědomí
	Klonické	kratší frekvence záškubů, bez ztráty vědomí
	Tonické	křeče trupu, pád
	Tonicko-klonické	ztráta vědomí, pád, cyanóza
	Atonické	ztráta sval. napětí, pád k zemi
Neklasifikované epileptické záchvaty		

Tab.1 – Klasifikace epileptických záchvatů [21 s. 24]

Záchvaty vznikají dvěma událostmi – vysokofrekvenčními akčními potenciály a synchronizací neuronové populace. Na úrovni neuronů se epileptická aktivita skládá z trvalé neuronální depolarizace, což vede ke vzniku akčního potenciálu, fázi plató, ukončení AP a hluboké repolarizace a hyperpolarizace. Depolarizace na membráně neuronů způsobuje přítok Ca^{2+} , který otevírá napěťově ovládané sodné kanály pro Na^{+} a vznikají opakující se akční potenciály.[21 s. 12] Opakované výboje vedou:

- 1) ke zvýšení extracelulární koncentrace K^{+} , což má za následek depolarizaci okolních neuronů
- 2) hromadění Ca^{2+} v presynaptické oblasti, což vede k rozsáhlému uvolňování neurotransmiteru
- 3) aktivaci NMDA receptoru depolarizací a další vtok Ca^{2+} a aktivaci neuronů.[24]

Nejvýznamnější v patofyziologii epileptogeneze je epileptické ohnisko. Jeho základem je epileptický neuron, který na příchozí vzruchy reaguje vznikem akční depolarizace, jejíž podstatou je silnější a delší depolarizace (Paroxysmal depolarization

shift) než u excitačního postsynaptického potenciálu. Pro vznik akční depolarizace je důležité otevření kanálů pro malé ionty jako jsou Na^+ a K^+ aktivací non-NMDA receptorů. Následuje plató fáze, pro kterou je nezbytné otevření vápenatých kanálů jako výsledek aktivace NMDA receptorů. Pro vznik epilepsie je zapotřebí dostatečné množství epileptických neuronů.[21 s. 12,]

2.1 Status epilepticus

Porucha, která se vyznačuje záchvaty trvající déle jak 30 min nebo za sebou následujících záchvatů, se nazývá status epilepticus (SE). SE může způsobit nervové poškození, jako například poškození hipokampu. Celý mechanismus zahrnuje nadměrnou aktivaci glutamátových receptorů a vznik excitotoxicity. U mladších dětí se častěji vyskytuje bez předešlých neurologických abnormalit a záchvatů. Zatímco u starších dětí se primárně vyskytuje u těch, kteří trpí na záchvaty. Existují dvě formy SE – celkový SE s křečemi, kam patří dlouhotrvající záchvaty. Druhou formou je SE bez křečí, která se projevuje změnou chování, paměti, úrovně vědomí. SE je životu nebezpečná porucha a je nezbytné ji léčit.[26]

Poškození neuronů nejvíce postihuje hipokampus, ale i oblast mimo něj jako jsou entorhinální a perirhinální korové oblasti nebo amygdala.[40]

2.2 Epileptogeneze

Epileptogeneze je proces, který je vyvolán inzultem, tím může být poranění mozku, mrtvice, porodní trauma, aj. Poté následuje latentní fáze, která může trvat i několik let a je ukončena výskytem prvního spontánního záchvatu a rozvojem epilepsie.[39]

Primární epileptogeneze vede ke spuštění neurotoxické kaskády a výsledkem je taková přestavba tkáně, která má větší tendenci ke vzniku spontánních výbojů a později i vzniku klinických záchvatů. Inzult způsobuje zvýšené vyplavování glutamátu a zvýšenou aktivaci NMDA-receptorů, kterými ve velkém množství vstupuje vápník do buňky. Zvýšený vstup vápníku má za následek nekrózu a apoptózu neuronů. K nejvíce citlivým oblastem mozku patří hipokampus (oblast CA1).[56]

Součástí sekundární epileptogeneze je další rozvoj onemocnění. Jeden z několika mechanismů, který se podílí na vzniku sekundární epileptogeneze, je kindlingový mechanismus. Kindlingový mechanismus (rozněcování) je opakovaná stimulace prahovou intenzitou, která vede k progresivnímu prodlužování záchvatů a dochází

postupně k šíření epileptické aktivity i mimo oblast vzniku. Tento a další mechanismy byly experimentálně prokázány na zvířatech.[49] Celý proces epileptogeneze je dlouhodobý a může trvat i několik měsíců než dojde k rozvoji epilepsie. Hlavním rizikem je vznik fokální epilepsie s menší možností vyléčení.

Důležitou roli v epilepsii hrají excitační (glutamát a aspartát) a inhibiční neurotransmitery (GABA).[21 s. 13]

2.3 Význam glutamátu a oxidu dusnatého při rozvoji epileptických záchvatů

Glutamát je jedním z nejdůležitějších excitačních neurotransmiterů v CNS, současně však může působit také jako neurotoxin.[36] Nejvyšší koncentrace dosahuje v hipokampu, ve vnější vrstvě mozkové kůry a míše. Účastní se procesu zrání mozku, učení, paměti a patologických procesů.[21 s.13, 14; 36] Glutamát vzniká deaminací glutaminu. K jeho uvolnění dochází po depolarizaci presynaptické membrány a je závislé na Ca^{2+} . [34] Receptory excitačních aminokyselin se rozdělují na dvě skupiny: ionotropní a metabotropní. Mezi ionotropní řadíme AMPA, NMDA a KA receptory. Metabotropní receptory jsou spřažené s G-proteiny. Glutamát může, svým působením na ionotropní i metabotropní receptory, být součástí degenerace neuronů, která následuje po SE, mozkové ischemii nebo poranění mozku. Výsledkem je zvýšený průtok Na^+ a Ca^{++} iontů do intracelulárního prostoru a aktivace velkého množství enzymů (proteázy, fosfolipázy, endonukleázy, atd.), které je pak zahrnuto do procesu buněčné smrti.[35] Na zesílení neurotoxického účinku glutamátu může mít vliv NO. K jeho nadměrné syntéze dochází během SE přes iNOS. Takto vzniklý NO inhibuje enzymy mitochondriálního dýchacího řetězce a způsobuje oxidativní stres.[28] Dochází k inaktivaci akonitázy, která reguluje množství superoxidu, který se začne v mozku hromadit. Superoxid dále reaguje s NO za vzniku ONOO^- , jehož toxické účinky byly zmíněny v kapitole 1.2 Chemické reakce.[66] Nadprodukce superoxidu nepoškozuje pouze mitochondrie, ale narušuje činnost NMDA receptorů a tím narušuje účinnost hematoencefalické bariéry. [37]

2.4 Léčba epileptických záchvatů

Epileptické záchvaty mohou být léčeny farmaky (antiepileptika) nebo chirurgicky. Chirurgická léčba se používá jako alternativní možnost pro farmakorezistentní pacienty. Předoperační diagnostika zahrnuje identifikaci

epileptogenní zóny, což je oblast iniciace záchvatů, jejíž odstranění je nezbytné k jejich vymizení. Iritativní zóna je kortikální oblast schopná generovat interiktální výboje. Čím více se tyto oblasti překrývají, tím přesnější je jejich identifikace a odstranění, které vede k vymizení záchvatů.[48]

3 Parkinsonova nemoc

Parkinsonova nemoc (PD) je progresivní degenerace dopaminergních neuronů v substantia nigra a součástí je i zánik dalších jader mozkového kmene, jehož důsledkem je nedostatek dopaminu a dalších neuromediátorů v mozku.[58,42] Dopamin se v CNS váže na dopaminergní receptory a slouží k přenosu impulsů z jedné buňky na druhou. Postihuje pacienty především v pozdním věku (nad 60 let) Mezi hlavní znaky PD patří hypokineze (nedostatek volných a reflexních pohybů), bradykineze (zpomalenost pohybů), rigidita (ztuhlost) a tremor (mimovolní pohyby). Je velmi často spojena s psychickými problémy, jako jsou např. deprese, a demencí.[25]

Existují dvě hypotézy popisující mechanismy, které napomáhají vzniku a rozvoji PD - endotoxická a exotoxická hypotéza. Podle endotoxické hypotézy během metabolismu dopaminu, který je exprimován buňkami obsahující melanin, vznikají kyslíkové volné radikály a reaktivní formy železa. Součástí exotoxické hypotézy je látka MPTP (methylfenyltetrahydropyrimidin), jejíž příznaky jsou stejné jako u PD. Stejný účinek byl objeven v průmyslových zplodinách, herbicidech a pesticidech. Existují i dědičné formy PD a v souvislosti s tímto byly objeveny konkrétní geny, jejichž mutace a následně chybně kódované proteiny napomáhají vzniku této nemoci. Vzniklé mutované proteiny zaujímají chybnou konformaci a shlukují se a vytvářejí buněčné inkluze. Na vzniku se podílí více faktorů – genetické faktory, faktor věku či faktory zevního prostředí.[63]

Za sporadickou formu PD je zodpovědné hromadění oxidativně poškozených bílkovin spolu s poruchou funkce proteazomů, které mají za fyziologických podmínek podmíněk na starost chybné proteiny odstranit.[43] α -synuklein, ubikvitin a parkin patří mezi nejčastější proteiny, jejíž mutace je spojena se vznikem familiární formy PD. α -synuklein je za fyziologických okolností nesbalený, presynaptický protein. V případě, že se zvýší koncentrace α -synukleinu nebo se změní pH či přítomnost některých kovů, má schopnost polymerizovat a může dosáhnout v konečném stádiu formy nerozpustných agregátů. Jeho depozita se nenachází pouze u Parkinsonovy choroby, ale i u dalších, které se souhrnně nazývají synukleinopatie (např. multisystémová atrofie). Neznáme přesnou funkci α -synukleinu, předpokládá se však, že má vliv na funkci vezikul, synaptickou plasticitu či metabolismus dopaminu. Parkin je protein, v jehož genu je známo několik desítek mutací, má svou funkci v odbourávání proteinů pomocí UPS a váže bílkoviny určené k degradaci v proteazomu. Ubikvitin je globulární protein,

který se váže na proteiny určené k degradaci a takto označené proteinu jsou transportovány do proteazomu, vakuoly nebo lyzozomu.[41]

Dělení PN	
Podle rodinného výskytu	90% sporadická
	5-10% familiární
Podle vzniku	95% late-onset
	5-10% early-onset
Podle genetické příčiny	5-10% monogenní forma
	90% bez genetické příčiny

Tab. 2 Klasifikace Parkinsonovy nemoci [41]

Mezi hlavní příznaky Parkinsonovy nemoci patří motorické poruchy – klidový třes, porucha vzpřímeného postoje, pomalá a šouravá chůze, nadměrné slinění. Objevují se však také nemotorické příznaky: psychiatrické (deprese, živé sny), senzitivní-senzorické (bolest, pocity ztrnulosti) a autonomní (váhový úbytek, poruchy termoregulace).[42]

3.1 Vznik a rozvoj Parkinsonovy nemoci

Stejně jako u většiny neurodegenerativních chorob, i u PD hraje hlavní roli v neuronálním poškození zvýšený oxidativní stres, porucha funkce mitochondrií a excitotoxicita.[43] Patofyziologie PD je spojena s produkcí NO nadměrnou expresí nNOS a iNOS v mozku, mechanismem glutamátové excitotoxicity nebo modifikací proteinů nitrací a S-nitrosylací. Výsledným produktem nitrace je nitrotyrosin, který byl nalezen v in vivo modelech substantia nigra PD. Podstatou S-nitrosylace je reakce NO s thiolovou skupinou cysteinu. Nitrosylaci podléhají i další proteiny jako například NMDAR, kaspáza 3 a 9 či p21 a výsledkem této reakce je modifikace genové transkripce, apoptózy, vezikulárního transportu, aj. V mitochondriích inhibuje peroxyinitrit (vzniklý reakcí NO a O_2^-) komplex I v elektron-transportním řetězci a odstraňuje železo z železo-sírného centra v cytochromu c a tím inhibuje syntézu ATP a aktivuje se kaspáza-3, která je signálem pro apoptózu, která postihuje dopaminergní neurony. U vzniku PD stojí také proces imunitní odpovědi, ve kterém se spouští

zánětlivá reakce. Mezi hlavní buňky, které se protizánětlivého procesu účastní, patří mikroglie. Během imunitní odpovědi na zánět či poškození dochází k uvolňování ROS/RNS, které může přispívat k neurodegeneraci. Nadměrnou expresí iNOS vzniká NO, které odstraňuje železo z transferinu a napomáhá vzniku vysoce reaktivnímu hydroxylovému radikálu Fentonovou reakcí.[50]

3.2 Léčba Parkinsonovy nemoci

Dopamin je důležitý neurotransmitter v CNS. Ztrátou buněk obsahující dopamin, při vzniku PD, ztrácí CNS schopnost regulovat a kontrolovat pohyby. Dopamin neprostupuje přes hematoencefalickou bariéru, nemůže být proto používán samostatně k léčbě PD. K farmakologické léčbě se používá Levodopa (L-dopa), který prostupuje hematoencefalickou bariérou do CNS, kde konvertuje na dopamin. Při dlouhodobém používání L-dopa byly zjištěny vedlejší účinky např. nekontrolovatelné pohyby (záškuby) či wearing-off fenomén, kdy se zkracuje doba účinnosti L-dopa. Příčinou je progrese nemoci a zhoršení vstřebávání v zažívacím traktu.[44]

4 Alzheimerova nemoc

AD je porucha mozku charakterizována postupující demencí, objevující se nejčastěji u lidí středního až pozdního věku.[31] „V průběhu tohoto onemocnění dochází k neuropatologickým a neurochemickým změnám, mezi které patří degenerace nervových buněk, přítomnost neurotických plaků, neurofibrilárních tanglů a rozsáhlá depozice amyloid β peptidu“.[30] AD patří z více jak 50% mezi nejčastější příčinu demence. Demence je definována jako ireverzibilní klinický syndrom způsobený ve většině případů neurodegenerativním poškozením mozku. Později napadá i vyšší funkce jako jsou paměť, myšlení, orientace. Demenci rozdělujeme do dvou skupin:

Primární: degenerativního původu

Sekundární: symptomatická, ve které se uplatňují i další faktory (choroby, intoxikace, úraz,...)

AD patří do skupiny primární demence parietotemporálního poškození.[30]

Mezi faktory ovlivňující AD patří kromě věku i výskyt onemocnění v rodině. Velmi malé množství AD je přímo zděděno. Dalšími faktory jsou biotické i abiotické, které mohou vzniku napomáhat. AD postihuje hipokampus a mozkovou kůru.[31]

Existují dva typy AD:

1.Časný nástup AD

Tento typ AD je vzácný a postihuje asi 5% lidí trpících AD a projevuje se do 55 let. Příčinou jsou zděděné genové mutace na chromozomech 21, 14, 1, jejichž výsledkem je vznik chybného proteinu. Mutací chromozomu 21 vzniká chybný APP, chromozomu 14 potom chybný preselinin 1 (AP-1) a chromozomu 1 chybný PS-2. [32]

2.Pozdní nástup AD

Většina případů AD je postihnuta touto formou, která se projevuje v pozdním věku po 60. roku. Na vzniku se podílejí genetické, environmentální a také životní styl. Nebyla nalezena konkrétní mutace genu, která by byla zodpovědná za pozdní formu AD. Byl však nalezen gen apolipoproteinu E (ApoE), který se s nejvyšší pravděpodobností účastní na vzniku na tomto typu AD. Jeho hlavní funkcí je vazba cholesterolu a dalších tuků v krvi. Existuje několik forem genu, nejběžnější je APOE $\epsilon 4$, která byla objevena u téměř poloviny případů s pozdní formou AD.[32]

4.1 Charakteristické markery

Neurofibrilární tangly jsou charakteristická pro různé druhy demence. Vznikají jako důsledek hyperfosforylace tau proteinem, který je rozpustný a v nativní formě je nesbalený a nevyskytuje se u něj sekundární forma kvůli vysokému obsahu prolinu a glycinu. V případě, že se v těle vyskytne patologie, změní se na nerozpustnou vláknitou formu, která je rozpoznávána během neurodegenerativních onemocnění.[33]

Hlavní složkou neuritických plaků je amyloid β ($A\beta$), který je produktem proteolytického štěpením APP. APP je štěpeno 3 proteázami α -, β -, and γ -sekretáza a za vznik $A\beta$ je zodpovědná β – sekretáza. APP je štěpeno na dvě třídy peptidů s různou funkcí – rozpustný APP a $A\beta$. $A\beta$ zaujímá formu beta listu.[58] V okolí amyloidních plaků se nachází mikroglie, které patří do kategorie imunitních buněk a jsou schopny fagocytózy. Vznikají v kostní dřeni a jsou přítomny v mozku. Jejich aktivace může mít dvojitý účinek, obranný mechanismu, který odstraňuje amyloidní plaky nebo uvolňování škodlivých látek např. prozánětlivé látky, kyslíkové radikály, proteázy. [29]

4.2 Patologie Alzheimerovy nemoci

I s rozvojem AD je spojena nadprodukce NO, jejichž hlavním zdrojem jsou iNOS a eNOS. Neurotoxicita NO je navozena oxidativním stresem, který je popsán v kapitole 1.4 Interakce NO s ostatními buněčnými komponenty.[59] Mechanismus neurotoxicity $A\beta$ zahrnuje změnu homeostáze vápníku, reakce imunitního systému na zánět a zvýšenou produkci volných kyslíkových a dusíkatých radikálů.[54] $A\beta$ mohou poškozovat neurony aktivací mikroglíí, jak už bylo řečeno výše.

5 Huntingtonova nemoc

Huntingtonova nemoc (HD) je progresivní autozomálně dominantní onemocnění, které je charakteristické selektivní ztrátou neuronů v oblastech corpus striatum a V. a VI. vrstvě mozkové kůry. Patří mezi neurodegenerativní dědičná onemocnění s časným nástupem mezi 35. - 50. rokem a s velmi rychlým vývojem.[47] Mezi příznaky HD patří poruchy motoriky, změna osobnosti a progredující demence.[51] Genetický základ HD je ve zmnožení tripletů CAG, který patří glutaminu.[47] Tento gen (Htt) kóduje protein huntingtin.[46] Htt je umístěn na krátkém rameni chromozomu 4. Za fyziologických podmínek obsahuje gen Htt 9-35 repetice CAG a pokud však dojde k překročení počtu 41 repetice, dojde k plnému rozvinutí HD. K expresi huntingtinu dochází ve všech lidských i zvířecích buňkách. Nejvyšší koncentrace dosahuje v mozku, nižší pak v játrech, srdci a v plicích. Mutovaný huntingtin se zkracuje a slučuje se do inkluzí, které jsou toxické. Toxicita se projevuje například poškozením neuronu a narušení funkce i okolních neuronů a glií, které mají v CNS důležitou podpůrnou funkci.[45] Inkluze se mohou přemisťovat do jader neuronů, kde způsobují jejich smrt.[47] HD je dělen na stupně 0-4. Stupeň 1 je charakterizován ztrátou 50% neuronů, ale zachováním velkého množství v putamenu a ventrálním striatu. V posledním stádiu 4 nejsou prakticky už žádné neurony v dorsálním striatu, neurony ve ventrálním striatu jsou však zachovány. Pacient, který dosáhne tohoto posledního stádia, je upoután na lůžko. HD se nejčastěji projevuje choreou (mimovolné rychlé pohyby), mohou se objevovat i psychické problémy - deprese, psychóza, paranoia, aj.[47]

Mechanismus vzniku HD je spojen, jak už bylo řečeno v předešlých kapitolách, s excitotoxicitou a oxidativním stresem. Oxidativní stres je spojen s produkcí volných radikálů, včetně nadprodukce NO, která vede k řadě buněčných změn, které byly detailně popsány v kapitole Parkinsonova a Alzheimerova nemoc.[52] Důležitou roli v excitotoxicitě hraje neurotransmitter glutamát. Mechanismus byl popsán v kapitole 2. Epileptické záchvaty.

6 Detekce oxidu dusnatého

NO je vysoce reaktivní plyn, který má krátkou životnost 3-5s. Může být stanoven přímo nebo nepřímo ze svých produktů. Stanovení lze rozdělit na přímá a nepřímá. Mezi přímá stanovení patří: chemiluminiscence, elektrochemická detekce, elektronová spinová rezonance.

6.1 Přímá stanovení

Metoda chemiluminiscence patří mezi nejcitlivější metody měření NO s detekčním limitem 20 pmol. Její podstatou je měření luminiscence, tedy záření látky, které se nachází ve viditelné oblasti světla nebo blízko ní. Vlnová délka emitovaného světla leží mezi 640-3000 nm. Principem této metody je reakce NO s ozonem za vzniku oxidu dusičitého v excitovaném stavu. Při návratu molekul na základní hladinu je přebytečná energie vyzařována ve formě světla. Množství vyzářeného světla je přímo úměrné koncentraci NO.

Elektrochemickou metodou měříme produkci NO jednotlivými buňkami a jeho poločas rozpadu. Používá se referenční elektroda Ag/AgCl ponořená do roztoku NO o napětí 0,9 V. Principem této metody je oxidace NO na dusičnany a množství oxidovaného NO je úměrné proudu protékajícího mezi elektrodami.[5]

Velkou výhodou elektronové spinové rezonance (ESR) je možnost dokázat přítomnost molekul obsahující nepárové elektrony (NO) i ve velmi nízkých koncentracích.[55] *„Mechanismus detekce je založen na vložení NO do vnějšího magnetického pole, kdy dochází k orientaci magnetického momentu elektronu do dvou orientací lišící se energií. Dodáním záření o vhodné energii můžeme měřit hodnotu rozdílu mezi oběma spinovými stavy elektronu. Výsledkem měření je spektrum elektronové spinové rezonance.“* [5]

6.2 Nepřímá stanovení

Další možností, jak detekovat NO, je nepřímou metodou z jeho produktů. Patří sem mimo jiné i fluorescenční detekce, chemiluminiscenční reakce nebo oxidace hemoglobinu. Existují i další nepřímé metody, já se však zmíním pouze o níže zmíněných.

Nepřímá chemiluminiscenční metoda je založená na reakci NO s luminolem, který patří do skupiny chemiluminiscenčních činidel, které jsou schopné detekovat

reaktivní formy kyslíku a dusíku v biologických systémech. NO reaguje s peroxidem vodíku za vzniku peroxodusitanu, který následně oxiduje luminol a vyvolává emisi záření.

Oxidace hemoglobinu patří mezi metody s velkou reakční rychlostí, nenáročností provedení a citlivostí pro NO. Podstatou je reakce NO s oxyhemoglobinem, jejíž výsledkem je methemoglobin (metHb) a dusičnan (NO_3^-). Detekuje se změna absorpčního maxima z 415nm (hemoglobinu) na 406 nm (metHb).[5]

Pro fluorescenční měření NO je potřeba fluorescenční spektrometr a aromatické diaminy (např. DANDS, DAF-2, DAN). Aromatické diaminy reagují v přítomnosti kyslíku s NO za vzniku triazolů a vyzáření energie. [55]

6.3 Detekce v biologických systémech

Měření NO v biologických systémech je komplikované z několika důvodů. Především je to krátká životnost NO a nízká koncentrace, která je dána vysokou reaktivitou se superoxidem. Mezi dostupné metody, které se používají k měření NO, patří:

1. Elektronová rezonance, která detekuje NO v komplexu s hemoglobinem
2. Spektrofotometrie, která detekuje metHb vzniklý reakcí NO s oxyHb
3. Fotonásobič schopný změřit chemiluminiscenci vzniklou reakcí plynného NO s ozonem

Společnou nevýhodou zmíněných metod je nízká selektivita a citlivost. Proto se v současnosti používají mikrosenzory, které jsou schopny měřit NO v reálném čase *in situ*. Jedním z nich je například porfyrinový mikrosenzor, jehož podstatou je elektroda pokrytá nikl porfyrinem detekující NO do koncentrace 300 μM uvolňující se z buněk.[61] Jeho výhodou je velikost, která ve vnitřním průměru dosahuje 200 μm a méně.[60]

Závěr

Tato práce shrnuje znalosti o oxidu dusnatém, jeho možnostech působení, významu ovlivnění vzniku a vývoje neurodegenerativních onemocnění a na závěr byly zmíněny možnosti detekce. Mezi hlavní patofyziologické mechanismy působení oxidu dusnatého patří nitrosativní stres, glutamátová excitotoxicita, nadprodukce oxidu dusnatého v mozku, inhibice respiračního řetězce a také aktivace mikroglíí během protizánětlivé odpovědi organismu. Zmíněná neurodegenerativní onemocnění, která jsem použila jako modelová, byla vybrána na základě jejich četnosti v populaci. Patří mezi ně epileptické záchvaty, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc a Huntingtonova nemoc. Většina z těchto onemocnění vzniká sporadicky a nejrizikovějším faktorem, přispívající k jejich vzniku, je věk. Výjimku tvoří Huntingtonova nemoc a epileptické záchvaty. Huntingtonova nemoc je dědičné autozomálně dominantní onemocnění a u vzniku epileptických záchvatů stojí určitý inzult, jehož následkem je taková přestavba tkáně, která má větší tendence ke vzniku spontánních záchvatů.

Byly použity převážně elektronické články, které shrnují poznatky z výzkumů starších i novějších. V současné době probíhá výzkum především na pochopení mechanismu vzniku těchto onemocnění, který by mohl v budoucnu předcházet jejich dalšímu rozvoji a aplikovat včasnou léčbu, což by snížilo počet smrtelných případů. Touto problematikou bych se chtěla zabývat také během magisterského studia v souvislosti i s ostatními onemocněními, která jsou charakterizována neurodegenerací.

Použitá literatura

1. IGNARRO, Edited by Louis J. Nitric oxide: biology and pathobiology. 2nd ed. London: Academic, 2009. ISBN 978-012-3738-660
2. J. S. BECKMAN, L. LIAUDET, P. PACHER. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews* [online]. 2007-01-01, vol. 87, issue 1, s. 315-424 [cit. 2014-03-07]. DOI: 10.1152/physrev.00029.2006. Dostupné z: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00029.2006>
3. J. S. BECKMAN, W. H. KOPPENOL. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *The American Physiological Society* [online]. 1996, vol. 96, s. 1424-1437 [cit. 2014-03-06]. Dostupné z: <http://bit.ly/Rf4sen>
4. O. FERON, MICHEL. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1997-11-1, vol. 100, issue 9, s. 2146-2152 [cit. 2014-03-06]. DOI: 10.1172/JCI119750. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/119750>
5. L. BENEŠ, Z. KUPKOVÁ. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chemické Listy* [online]. 2004, vol. 98, s. 116-122 [cit. 2014-03-07]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_03_01.pdf
6. NĚMCOVÁ, Tereza. *Diplomová práce*. Brno, 2010. Dostupné z: is.muni.cz/th/175480/prif_m/DIP.PRACE.doc. Diplomová práce. MASARYKOVA UNIVERZITA. Vedoucí práce prof. RNDr. I. Kučerovi, DrSc.
7. A. DOCTOR, B. GASTON, D. SINGEL, et al. Nitrosothiol Signaling in Respiratory Biology: which, where, how, and why?. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2006, vol. 173, issue 11, s. 1186-1193 [cit. 2014-03-13]. DOI:10.1164/rccm.200510-1584PP. Dostupné z: <http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200510-1584PP>
8. P. ANDREW, O. FERON. Enzymatic function of nitric oxide synthases: which, where, how, and why?. *Cardiovascular Research* [online]. 1997-11-1, vol. 43, issue 3, s. 521-531 [cit. 2014-03-13]. DOI: 10.1016/S0008-6363(99)00115-7. Dostupné z: [http://cardiovascres.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/S0008-6363\(99\)00115-7](http://cardiovascres.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1016/S0008-6363(99)00115-7).

9. S.L. ARNAIS, J.BUSTAMANTE, A.CZERNICZYNIIEC. Brain nitric oxide synthases and mitochondrial function. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2007, vol.12, s. 1034-1040 [cit. 2014-03-13]. Dostupné z:
<http://www.bioscience.org/2007/v12/af/2123/fulltext.htm>
10. A. BOVERIS, NAVARRO. Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants☆: which, where, how, and why?. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2008, vol. 60, 13-14, s. 1534-1544 [cit. 2014-03-14]. DOI: 10.1016/j.addr.2008.05.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X0800166X>
11. P. BROOKES, A. BOVERIS. Mitochondrial nitric oxide synthase: which, where, how, and why?. *Mitochondrion* [online]. 2004, vol. 3, issue 4, s. 187-204 [cit. 2014-03-14]. DOI: 10.1016/j.mito.2003.10.001. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567724903001788>
12. Q. FENG, J. SCOTT. Nitric Oxide, from its Chemistry to Biology and Disease. *The Open Nitric Oxide Journal* [online]. 2011, vol. 3, s. 6-7 [cit. 2014-03-16]. Dostupné z:
<http://benthamsciencepublisher.com/open/tonoj/articles/V003/SI0006TONOJ/6TONOJ.pdf>
13. R. G. KNOWLES, S. MONCADA. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal* [online]. 1994, vol. 298, s. 249-258 [cit. 2014-03-17]. Dostupné z: <http://www.biochemj.org/bj/298/0249/2980249.pdf>
14. P. J. ANDREW, B. MAYER. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research* [online]. 1999, vol. 43, s. 521-531 [cit. 2014-03-17]. Dostupné z:
<http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/43/3/521.full.pdf+html>
15. Peroxidace lipidů jako příklad oxidačního poškození biomolekul. In: *WikiSkripta* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-03-20]. Dostupné z: <http://bit.ly/1uwSJqx>
16. O. FERON, MUNGRUE. NNOS at a glance: implications for brain and brawn. *Journal of Cell Science* [online]. 2004-06-01, vol. 117, issue 13, s. 2627-2629 [cit. 2014-03-20]. DOI: 10.1242/jcs.01187. Dostupné z: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.01187>
17. K. B. ANDERSON, S. T. HALPIN, D. M. SPENCE, et al. The Red Blood Cell and Nitric Oxide: Derived, Stimulated, or Both?. *The Open Nitric Oxide Journal*

- [online]. 2011, vol. 3, s. 8-15 [cit. 2014-03-20]. Dostupné z:
<http://benthamscience.com/open/tonoj/articles/V003/SI0006TONOJ/8TONOJ.pdf>
18. O. FERON, T. MICHEL. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?. *Journal of Clinical Investigation* [online]. 1997-11-1, vol. 100, issue 9, s. 2146-2152 [cit. 2014-03-20]. DOI: 10.1172/JCI119750. Dostupné z: <http://www.jci.org/articles/view/119750>
19. G. BROWN, O. FERON. Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase: which, where, how, and why?. *FEBS Letters* [online]. 1995, vol. 369, 2-3, s. 136-139 [cit. 2014-03-23]. DOI: 10.1016/0014-5793(95)00763-Y. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001457939500763Y>
20. H.-M. GAO, B. LIU, J.-Y. WANG, et al. Role of Nitric Oxide in Inflammation-Mediated Neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2002, vol. 962, issue 1, s. 318-331 [cit. 2014-03-22]. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04077.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04077.x>
21. KOMÁREK, Vladimír. *Epileptické záchvaty a syndromy*. 1. vyd. Praha: Galén, c1997, 183 s. ISBN 80-858-2456-6.
22. E. GURGUL-CONVEY, K. HANZELKA, S. LENZEN, et al. Is there a role for neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in cytokine toxicity to pancreatic beta cells?. *Nitric Oxide* [online]. 2012, vol. 27, issue 4, s. 235-241 [cit. 2014-03-22]. DOI: 10.1016/j.niox.2012.08.075. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1089860312003722>
23. F. M. PAINTER. Epilepsy and Seizure Disorders: A Review of Literature Relative to Chiropractic Care of Children. *J Manipulative Physiol Ther.* [online]. 2001, vol. 24, s. 199-205 [cit. 2014-05-05]. Dostupné z: http://chiro.org/pediatrics/ABSTRACTS/Epilepsy_and_Chiropractic.shtml
24. E. BROMFIELD, J. CAVAZOS, J. SIRVEN. An Introduction to Epilepsy. *American Epilepsy Society* [online]. 2006, s. 1-26 [cit. 2014-03-25]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2510/pdf/basicore.pdf>
25. M. NIRENBERG, G.UHL, R.VAUGHAN, et al. The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience* [online]. 1996, vol. 16, s.

- 436-447 [cit. 2014-03-26]. Dostupné z:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8551328>
26. T. GOTOH, K. HANZELKA, S. LENZEN. Nitric Oxide and Endoplasmic Reticulum Stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* [online]. 2006-07-01, vol. 26, issue 7, s. 1439-1446 [cit. 2014-04-01]. DOI: 10.1161/01.ATV.0000223900.67024.15. Dostupné z:
<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.0000223900.67024.15>
27. M. PATEL. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2004, vol. 37, issue 12, s. 1951-1962 [cit. 2014-04-01]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.021. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584904006823>
28. ITOH, K., K. YOSHIKAWA, M. WATANABE, , et al. Magnetic resonance and biochemical studies during pentylentetrazole-kindling development: The relationship between nitric oxide, neuronal nitric oxide synthase and seizures. *Neuroscience* [online]. 2004, vol. 129, issue 3, s. 757-766 [cit. 2014-04-02]. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.09.025. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452204008498>
29. M. BRODNEY, L. LAU. *Alzheimer's disease*. London: Springer, c2008, 179 p. ISBN 35-407-4228-X.
30. R. JIRÁK, J. LAŇKOVÁ. *Demence: doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře : 2007*. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP, 2007, 10 s. Doporučené postupy pro všeobecné praktické lékaře. ISBN 978-80-86998-13-8.
31. CH.VAN BROECKHOVEN, J. THEUNS. Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implications for susceptibility. *Human Molecular Genetics* [online]. 2000, vol. 9, s. 2383-2394 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z:
<http://hmg.oxfordjournals.org/content/9/16/2383.full.pdf>
32. *Alzheimer's Disease Genetics Fact Sheet* [online]. 2011 [cit. 2014-04-04]. Dostupné z:
<http://www.nia.nih.gov/alzheimers/publication/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet>
33. D. FRANCO-BOCANEGRA, M. MERAZ-RÍOS, D. TORAL RIOS, et al. Early Onset Alzheimer's Disease and Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2014, vol. 2014, s. 1-14 [cit. 2014-04-05]. DOI:

- 10.1155/2014/375968. Dostupné
z: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/375968/>
34. D. FRANCO-BOCANEGRA, M.J.HUDSPITH, , D. TORAL RIOS, et al.
Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS
injury. *British Journal of Anaesthesia* [online]. 1997-06-01, vol. 78, issue 6, s.
731-747 [cit. 2014-04-05]. DOI: 10.1093/bja/78.6.731. Dostupné
z: <http://bja.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/bja/78.6.731>
35. B. S. MELDRUM. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of
Physiology and Pathology. *The Journal of Nutrition* [online]. 2000, s. 1007-1015
[cit. 2014-04-10]. Dostupné z:
<http://nutrition.highwire.org/content/130/4/1007S.full.pdf+html>
36. R. J. VANDENBERG. Molecular pharmacology and physiology of glutamate
transporters in the central nervous systém. *Clinical and Experimental
Pharmacology and Physiology* [online]. 1998, vol. 25, issue 6, s. 393-400 [cit.
2014-04-11]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1681.1998.tb02221.x/pdf>
37. Ch. BETZEN, R. WHITE, Ch. M. ZEHENDNER, et al. Oxidative stress
upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium. *Free Radical
Biology and Medicine* [online]. 2009, vol. 47, issue 8, s. 1212-1220 [cit. 2014-
04-11]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.034. Dostupné
z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584909004523>
38. M. PATEL, R. WHITE, Ch. M. ZEHENDNER, et al. Mitochondrial dysfunction
and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radical
Biology and Medicine* [online]. 2004, vol. 37, issue 12, s. 1951-1962 [cit. 2014-
04-11]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.021. Dostupné
z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584904006823>
39. K. LUKASIUK , A. PITKÄNEN, CH. M. ZEHENDNER, et al. Mechanisms of
epileptogenesis and potential treatment targets: cause and consequence of
epileptic seizures. *The Lancet Neurology* [online]. 2011, vol. 10, issue 2, s. 173-
186 [cit. 2014-04-13]. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70310-0. Dostupné
z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442210703100>
40. BEN-ARI, F. E. DUDEK, Ch. M. ZEHENDNER, et al. Primary and Secondary
Mechanisms of Epileptogenesis in the Temporal Lobe: There Is a Before and an
After. *Epilepsy Currents* [online]. 2010, vol. 10, issue 5, s. 118-125 [cit. 2014-

- 04-13]. DOI: 10.1111/j.1535-7511.2010.01376.x. Dostupné
z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1535-7511.2010.01376.x>
41. COOPER, K. HANZELKA, S. LENZEN, et al. Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 1999, vol. 1411, 2-3, s. 290-309 [cit. 2014-04-16]. DOI: 10.1016/S0005-2728(99)00021-3. Dostupné
z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272899000213>
42. M. BAREŠ. Diagnostika a klinické příznaky Parkinsonovy nemoci. *Neurologie pro praxi* [online]. 2001, vol. 1, s. 22-24 [cit. 2014-04-16]. Dostupné z:
<http://solen.cz/pdfs/neu/2001/01/08.pdf>
43. A. CHERUBINI, E. MARIANI, M.C. POLIDORI, et al. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. *Journal of Chromatography B* [online]. 2005-11-15, vol. 827, issue 1, s. 65-75 [cit. 2014-04-16]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.04.023. Dostupné
z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023205003041>
44. *Levodopa* [online]. 2014 [cit. 2014-04-18]. Dostupné
z: <http://www.epda.eu.com/en/parkinsons/medinfo/levodopa/>
45. BEZPROZVANNY, R. HAYDEN. Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2004, vol. 322, issue 4, s. 1310-1317 [cit. 2014-04-20]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.08.035. Dostupné
z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X04017735>
46. S. E. BROWNE, A. C. BOWLING, U. MacGARVEY, et al. Oxidative Damage and Metabolic Dysfunction in Huntington's Disease: Selective Vulnerability of the Basal Ganglia. *Annals of Neurology* [online]. 2004, vol. 41, issue 5, s. 646-653 [cit. 2014-04-22]. Dostupné z:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.410410514/pdf>
47. C.A. GUTEKUNST, S. LI, H. YI. Nuclear and Neuropil Aggregates in Huntington's Disease: Relationship to Neuropathology. *The Journal of Neuroscience* [online]. 1999, vol. 19, s. 2522-2534 [cit. 2014-04-22]. Dostupné z:
<http://www.jneurosci.org/content/19/7/2522.full.pdf+html>
48. M. HÁJEK, P. KRŠEK, M. TICHÝ. Pokroky v diagnostice dětských epileptochirurgických

- kandidátů. *Neurologie pro praxi* [online]. 2003, vol. 4, s. 188-192 [cit. 2014-04-23]. Dostupné z: <http://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2003/04/06.pdf>
49. J. a M. GAITO, R. HAYDEN. The kindling effect as a model of epilepsy. *Psychological Bulletin* [online]. 1976, vol. 83, issue 6, s. 1097-1109 [cit. 2014-04-27]. DOI: 10.1037/0033-2909.83.6.1097. Dostupné z: <http://content.apa.org/journals/bul/83/6/1097>
50. K. AQUILANO, S. BALDELLI, M. R. CIRIOLO, G. ROTILIO. Role of Nitric Oxide Synthases in Parkinson's Disease: A Review on the Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Polyphenols. *Neurochemical Research* [online]. 2008, vol. 33, issue 12, s. 2416-2426 [cit. 2014-05-05]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11064-008-9697-6>
51. Huntingtonova choroba. In: *WikiSkripta* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Huntingtonova_choroba
52. M. COMA, F.X.GUIX, I. URIBESALGO, et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology* [online]. 2005, vol. 76, issue 2, s. 126-152 [cit. 2014-04-28]. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2005.06.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030100820500064X>
53. P. KLATT, S. LAMAS. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *European Journal of Biochemistry* [online]. 2001, vol. 267, issue 16, s. 4928-4944 [cit. 2014-04-29]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1432-1327.2000.01601.x/pdf>
54. T. MALINSKI. Nitric Oxide and Nitroxidative Stress in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. 2007, vol. 11, s. 207-218 [cit. 2014-04-29]. Dostupné z: <http://iospress.metapress.com/content/117166465k651666/fulltext.pdf>
55. J.KLÍMA. Spektroskopie EPR a její využití při studiu mechanismů elektrochemických reakcí. [online]. s. 1-8 [cit. 2014-05-02]. Dostupné z: <http://lynette.natur.cuni.cz/stepanek/vyuka/EPR.pdf>
56. BEN-ARI, M. COMA, F. E. DUDEK, F.J. MUÑOZ. Primary and Secondary Mechanisms of Epileptogenesis in the Temporal Lobe: There Is a Before and an After. *Epilepsy Currents* [online]. 2010, vol. 10, issue 5, s. 118-125 [cit. 2014-

- 05-02]. DOI: 10.1111/j.1535-7511.2010.01376.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1535-7511.2010.01376.x>
57. L. BARBEITO, A. DRECHSEL, A. G. ESTÉVEZ, et al. Nitric Oxide-Mediated Oxidative Damage and the Progressive Demise of Motor Neurons in ALS. *Neurotoxicity Research* [online]. 2012, vol. 22, issue 4, s. 251-264 [cit. 2014-05-02]. DOI: 10.1007/s12640-012-9322-y. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12640-012-9322-y>
58. E. RŮŽIČKA. Parkinsonova nemoc. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2006, vol. 69, s. 241-258 [cit. 2014-05-03]. Dostupné z: <http://bit.ly/1kJhsRM>
59. M. HOLZER, U. GÄRTNER, H. LÜTH, et al. Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Research* [online]. 2001, vol. 913, issue 1, s. 57-67 [cit. 2014-05-03]. DOI: 10.1016/S0006-8993(01)02758-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899301027585>
60. T. F. LUSCHER, S. MESAROS, TSCHUDI, et al. Direct In Situ Measurement of Nitric Oxide in Mesenteric Resistance Arteries: Increased Decomposition by Superoxide in Hypertension. *Hypertension* [online]. 1996-01-01, vol. 27, issue 1, s. 32-35 [cit. 2014-05-03]. DOI: 10.1161/01.HYP.27.1.32. Dostupné z: <http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.HYP.27.1.32>
61. F. BEDIQUI, J. DEVYNCK, S. TREVIN, et al. Chemically modified microelectrodes designed for the electrochemical determination of nitric oxide in biological systems: Increased Decomposition by Superoxide in Hypertension. *Electroanalysis* [online]. 1996, vol. 8, issue 12, s. 1085-1091 [cit. 2014-05-03]. DOI: 10.1002/elan.1140081202. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/elan.1140081202>
62. J. MCNAMARA. Cellular and Molecular Basis of Epilepsy. *The Journal of Neuroscience* [online]. 1994, vol. 14, s. 3413-3425 [cit. 2014-05-03]. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/content/14/6/3413.full.pdf>
63. P. GOOK, A. HSU, P. WERNER, et al. Protein Nitration in Parkinson's Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* [online]. 1998, vol. 57, issue 4, s. 305-367 [cit. 2014-05-03]. Dostupné z:

http://journals.lww.com/jneuropath/Abstract/1998/04000/Protein_Nitration_in_Parkinsova_Disease.6.aspx

64. VOJTĚCH, Zdeněk. *Epilepsie dospělých: [základní informace]*. Vyd. 1. Praha: TRITON, 2000, 59 s. ISBN 80-725-4096-3.