

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Účinek sulforafanu na regionální průtok krve mozkem

**Martin Nedecký
Středočeský kraj**

Kutná Hora 2022

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 6: Zdravotnictví

Účinek sulforafanu na regionální průtok krve mozkem

Effect of sulforaphane on regional cerebral blood flow

Autor: Martin Nedecký

Škola: Gymnázium Jiřího Ortena, Jaselská 932, 284 80 Kutná Hora

Kraj: Středočeský kraj

Konzultant: prof. MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D. Fyziologický ústav
AV ČR, PhDr. Petr Němeček, Ph.D. Gymnázium Jiřího Ortena

Kutná Hora 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval samostatně a použil jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Kutné Hoře dne

Martin Nedecký

Poděkování

Rád bych poděkoval prof. MUDr. Jakubu Otáhalovi, Ph.D. a PhDr. Petru Němečkovi, Ph.D. za vedení mé seminární práce.

Anotace

Práce se zabývá vlivem účinné látky sulforafanu na regionální průtok krve mozkiem. Cílem bylo ověřit, zda má sulforafan protektivní účinky na mozkovou tkáň a zda by ho bylo možné využít k léčbě epilepsie. Teoretická část obsahuje shrnutí základních informací o sulforafanu, epilepsii a o regionálním krevním průtoku. Použitou metodou byla transcallosální elektrická stimulace a technologie Laser Doppler Flowmetry. Práce potvrdila, že sulforafan zvyšuje regionální mozkový průtok a má tak potenciál v léčbě epilepsie.

Klíčová slova

sulforafan, regionální mozkový krevní průtok, epilepsie, LDF, transcallosální stimulace

Annotation

The study deals with the effect of the active substance sulforaphane on regional blood flow through the brain. The aim was to verify whether sulforaphane has protective effects on brain tissue and whether it could be used for the treatment of epilepsy. The theoretical part contains a summary of basic information about sulforaphane, epilepsy and regional blood flow. The method used was transcallosal electrical stimulation and Laser Doppler Flowmetry. The work confirmed that sulforaphane increases regional cerebral blood flow and thus has potential in the treatment of epilepsy.

Keywords

sulforaphane, regional cerebral blood flow, epilepsy, LDF, transcallosal stimulation

Obsah

Úvod.....	6
1 Teoretická část	7
1.1 Sulforafan	7
1.2 Epilepsie	8
1.2.1 Epidemiologie	8
1.2.2 Etiologie	8
1.2.3 Epileptogeneze a patogenetický mechanismus	9
1.2.4 Klasifikace záchvatů	9
1.2.5 Status epilepticus	10
1.2.6 Diagnostika	10
1.2.7 Léčba.....	11
1.3 Regulace regionálního průtoku krve mozem	12
1.4 Modelový organismus-laboratorní potkan	13
2 Cíl práce a hypotézy	14
2.1 Cíl.....	14
2.2 Hypotéza	14
3 Metodická část	15
3.1 Materiály a metody	15
3.2 Chirurgická příprava	15
3.3 Postup.....	16
3.4 Vyhodnocení měření	16
4 Výsledky	18
5 Diskuze	25
6 Závěr	27
Použitá literatura a zdroje	28
Seznam zkratk	31

ÚVOD

Epilepsie je chronické onemocnění mozku, které se projevuje opakovanými epileptickými záchvaty, tedy náhlou a přechodnou dysfunkcí mozkové aktivity. Její léčba je doposud zaměřená především na potlačení symptomů, ale neřeší samotnou příčinu. V naší práci chceme využít poznatků o změnách krevního průtoku mozku v průběhu epileptického záchvatu a po jeho odeznění. Po odeznění záchvatu je v postižené části mozku krevní průtok snížen, což způsobuje poškození neuronálních buněk v důsledku hypoxie a nedostatku energetických substrátů. Tomu je třeba zabránit. My se proto budeme v experimentální části práce věnovat výzkumu účinku sulforafanu na zvýšení regionálního průtoku krve mozku. Jedná se o látku, které je v poslední době věnována velká pozornost kvůli jejímu potenciálu v léčbě kardiovaskulárních a nádorových onemocnění.

V teoretické části jsou shrnuty poznatky o epilepsii, fyziologické regulaci regionálního krevního průtoku mozku, seznámení se s látkou sulforafanem a jejími účinky. Tyto teoretické poznatky jsou využity jako východisko pro realizaci experimentu a jeho vyhodnocení v diskuzní části práce.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Sulforafan

Sulforafan je malá lipofilní molekula patřící mezi isothiokyanáty. Přirozeně se nachází v brukvovité zelenině ve formě glukorafaninu. Sulforafan v rostlině vzniká při jejím poškození. Ve vakuolách rostlinných buněk se nachází glukorafanin. (Sivapalan & kol, 2018) Pokud dojde k mechanickému poškození rostliny, vakuola praskne a dojde k jeho vylití. Glukorafanin pak zreaguje s plazmatickou bílkovinou myrosinem na glukózu a SFN. (Russo & kol., 2018)

Sulforafan je v poslední době, díky jeho širokému spektru biologických účinků, předmětem mimořádného zájmu. Možnost jeho použití je zkoumána v mnoha odvětvích medicíny, například jako potenciální lék onkologických, kardiovaskulárních nebo neurodegenerativních onemocnění. (Russo & kol., 2018) Většina publikací se dosud zaměřovala na jeho genomické účinky skrze nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). (Sandouka & Shekh-Ahmad, 2021) Nedávno byly prokázány i jeho negenomické účinky v podobě vazodilatace mozkových arteriol. (Parfenova & kol., 2019)

Během epileptických záchvatů, především epileptického statu, dochází k tvorbě volných kyslíkových radikálů (ROS) a indukci oxidativního stresu (OS). (Geronzi & kol, 2018) Generace ROS a oxidativní stres jsou běžné následky poškození buněk. Jedná se o cytotoxické mechanismy, které hrají zásadní roli v patofyziologii epilepsie a způsobují smrt neuronálních buněk. V poslední době přibývá důkazů, že inhibice ROS může vést ke snížení neuronálního poškození při záchvatech a epileptickém statu. (Shekh-Ahmad & kol, 2019) Roli sulforafanu z hlediska jeho vlivu na oxidativní stres popsali ve své studii S. Sandouka a T. Shekh-Ahmad (2021). Ve studii byl zkoumán neuroprotektivní účinek SFN skrze upregulaci transkripčního faktoru nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), který je hlavním regulátorem redoxní rovnováhy v buňce. Jeho aktivace hraje klíčovou roli v buněčné obraně proti oxidativnímu stresu prostřednictvím transkripční upregulace obranných enzymů fáze II a antioxidantních stresových proteinů. (Alfieri & kol, 2011) Výsledky jasně ukázaly, že sulforafan snížil tvorbu ROS během epileptiformní aktivity, a kromě toho významně snížil smrt nervových buněk, vyvolanou SE. SFN má tedy potenciál skrze stimulaci Nrf2 modifikovat vývoj epilepsie.

Helena Parfenova a kol. (2019) se ve své studii zabývali vazodilatačními účinky sulforafanu. Ze studie vyplývá, že sulforafan zvyšuje průtok krve mozkem pomocí negenomového mechanismu, který je zprostředkován endogenní enzymatickou stimulací CSE/CBS katalyzovanou sulforafanem. Vzniklý sulfan stimuluje draselné kanály (BK a K_{ATP}) endoteliálních buněk hladké svaloviny. Influx draslíku vede k hyperpolarizaci membrány a tak k vazodilataci mozkových arteriol. Přitom nedochází ke změně kardiovaskulárních parametrů (střední arteriální tlak, tepová frekvence ...) ani tělesné teploty.

1.2 Epilepsie

Epilepsií rozumíme chronické onemocnění způsobené excesivní patologickou synchronní aktivitou mozkové kůry a projevující se opakovanými epileptickými záchvaty. (Rektor & Ošlejšková, 2010) Z této definice jasně vyplývá, že jeden izolovaný záchvat je považován pouze za syndrom, který může být způsoben mnohými příčinami. Po odstranění příčiny dojde k vymizení epileptických projevů. Nejdůležitějšími kritérii epilepsie je paroxysmálnost a periodičnost. Projevem epilepsie je epileptický záchvat. Jedná se o náhlou a přechodnou dysfunkci mozkové kortikální aktivity, která trvá několik sekund, minut, výjimečně i hodin. V interiktálním neboli mezizáchvatovém období může být nemocný úplně bez potíží. Klinicky je epileptický záchvat definován jako intermitentní, paroxysmální a stereotypní porucha vědomí, chování nebo motorických či senzitivních funkcí. (Ambler, 2006)

1.2.1 Epidemiologie

Světová zdravotnická organizace (WHO) uvádí, že epilepsie postihuje celosvětově asi 50 milionů lidí, což z ní dělá jedno z nejběžnějších neurologických onemocnění světa. Odhadovaný podíl v běžné populaci se pohybuje mezi 4 a 10 pacienty s aktivní epilepsií na 1000 lidí. Incidence epilepsie je skoro třikrát vyšší v rozvojových zemích. To je dané především zvýšeným rizikem nákazy parazitárními onemocněními, traumata či neuroinfekcí. Všechny tyto faktory pak mohou vést k rozvoji epilepsie. „Důležitou roli v incidenci hraje také věk, což je dáno tím, že naprostá většina geneticky podmíněných epileptických syndromů se manifestuje do 25–30 let, a naopak ve vyšším věku, zhruba od 65–70 let narůstá incidence epileptických syndromů se strukturální příčinou, jakou jsou traumata, cévní mozkové příhody, tumory či neurodegenerativní onemocnění.“ (Bušek, 2013)

1.2.2 Etiologie

Příčiny vzniku epilepsie mohou být různé a často bývají multifaktoriální. Na základě revize Mezinárodní ligy proti epilepsii (ILAE) z roku 2017 rozeznáme celkem šest příčin vzniku epilepsie: strukturální, genetické, infekční, metabolické, autoimunitní a neznámé etiologie.

Strukturální etiologie se týká abnormalit viditelných pomocí zobrazovacích metod, např. MRI nebo PET. V případě, že se shoduje strukturální změna z klinickými projevy záchvatu, je tato oblast pravděpodobnou epileptickou lézí. Strukturální epilepsie může být získaná, např. CMP nebo úraz, i genetická, např. vývojové malformace kortexu.

V případě genetická etiologie je epilepsie přímým důsledkem genetické mutace, u které jsou záchvaty základním projevem. (Perucca & kol, 2020) Ve většině případů ještě nejsou konkrétní geny zodpovědné za vznik epilepsie známy. Obecně se mutace většinou objevují u genů kódujících některé z podjednotek neuronálních iontových kanálů, což vede ke změnám v excitabilitě neuronů. (Bušek, 2013)

Infekční etiologie je celosvětově nejčastější příčinou vzniku epilepsie. Mezi příklady infekčních onemocnění patří např. tuberkulóza, HIV, mozková malárie a další. (Vezzani & kol, 2015)

Příčinou epilepsií s metabolickou etiologií jsou předpokládána nebo známá metabolická onemocnění. Ta mohou být získaná, ale často také geneticky podmíněná. Identifikace konkrétních metabolických příčin je zásadní pro použití správných léčebných postupů a prevenci potenciálního kognitivního poškození. (Reddy & Saini, 2020)

Autoimunitní etiologie se týká epilepsií vzniklých přímým důsledkem imunitně zprostředkovaného zánětu CNS. Výzkum v této oblasti je tématem hlavně v posledních několika letech. (Husari & Dubey, 2019)

I přes pokročilé diagnostické metody přetrvává skupina pacientů s epilepsií neznámé etiologie. Určení etiologie samozřejmě závisí na dostupnosti a rozsahu vyšetření, což se v různých zemích světa výrazně liší. (Marušič & kol, 2018)

1.2.3 Epileptogeneze a patogenetický mechanismus

Epileptogeneze neboli vývoj epilepsie je proces vzniku hyperexcitabilních neuronových sítí, během něhož dochází ke změnám ve fyziologii mozku, způsobených některou z etiologických příčin uvedených výše. Období, během kterého tyto změny probíhají se označuje jako latentní perioda. (Lee & kol, 2017) V mozku v tomto období dochází ke ztrátě neuronů a abnormální synaptické reorganizaci, což vede k nadměrné excitabilitě neuronů a následnému výskytu epileptických záchvatů.

Pro rozvoj epilepsie jsou klíčové dvě oblasti, tzv. iritační a epileptogenní zóna. Iritační zónou je myšlena různě rozsáhlá populace neuronů v mozkovém kortexu, která je zvýšeně excitabilní. Samy o sobě ale nedokáží neurony iritační oblasti epileptický záchvat vyvolat, protože jejich aktivita nedosahuje nadprahové hodnoty. K synchronizaci a překročení nadprahové hodnoty slouží epileptogenní zóna, které může, ale nemusí být součástí iritační zóny. V epileptogenní zóně dochází k abnormálním synchronním neuronálním výbojům s projevy hyperautorytmicity a hypersynchronie. Pokud dojde k překročení nadprahové hodnoty, vzniká epileptický záchvat. Ten je charakterizován vždy lokalizací výboje a jeho šířením.

Pokud se zaměříme na celulární úroveň, jsou za vznik epilepsie zodpovědné funkční změny v receptorech a iontových kanálech. Jejich poškození vede k destabilizaci situace na buněčné membráně, která může být zvýšeně excitabilní. Další úrovní poruchy je pak dysregulace excitačních a inhibičních mechanismů. (Rektor & Ošlejšková, 2010)

1.2.4 Klasifikace záchvatů

Mezinárodní liga proti epilepsii (ILAE) vydala v roce 2017 revizi ke klasifikaci epileptických záchvatů. Jejím snahou bylo zdůraznit, že rozhodující pro určení, zda je záchvat generalizovaný nebo fokální, je jeho začátek. Rovněž byla přidána nová kategorie pro záchvaty, u nichž není počátek známý. (Marušič & kol, 2018)

Epileptické záchvaty jsou v prvním kroku rozděleny podle začátku na fokální, generalizované a záchvaty s neznámým počátkem. Dále jsou všechny typy děleny podle přítomnosti motorických projevů. Fokální záchvaty navíc rozlišujeme podle stavu vědomí.

Generalizované epileptické záchvaty jsou charakterizované rychlým šířením, postihují prakticky celý mozek. Pokud jsou záchvaty od počátku generalizované, označujeme je jako

primárně generalizované. Záchvaty, která začaly jako parciální a později se rozšířily do celého mozku označujeme jako sekundárně generalizované. (Rektor & Ošlejšková, 2010). Nejčastějšími typy jsou myoklonické, atonické a tonicko-klonické záchvaty (Bušek, 2013) Pro fokální záchvaty je typická lokalizace epileptického výboje vycházejícího z epileptického ložiska, jehož lokalizace je určující pro symptomatiku záchvatů. (Bušek, 2013) Takové záchvaty se mohou dále šířit nebo sekundárně generalizovat. Parciální záchvaty se dělí do dvou základních skupin: bez poruchy vědomí a s poruchou vědomí. Záchvatů s neznámým počátek nelze kvůli nedostatku informací zařadit s jistotou ani do jedné z kategorií. U tohoto typu není počátek zpozorován. Záchvaty s neznámým počátkem lze po získání potřebných informací zařadit mezi fokální nebo generalizované. (Marušič & kol, 2018)

1.2.5 Status epilepticus

Status epilepticus je epileptický záchvat, který přetrvává déle než 30 minut nebo jde o sérii záchvatů, mezi nimiž nedochází k nabytí vědomí. (Trinka & kol, 2015) Jedná se o velmi závažný, život ohrožující stav. Hrozí energetické vyčerpání organismu, mozková hypoxie a mozkový edém. (Ambler, 2006) V případě generalizovaného statusu tonicko-klonických záchvatů je mortalita kolem 20 % a narůstá s délkou trvání statusu. (Rektor & Ošlejšková, 2010) Proto se doporučuje zavolat lékařskou pomoc už po 5 minutách od začátku záchvatu, pokud nedojde k úpravě vědomí.

1.2.6 Diagnostika

Pro správnou diagnostiku epilepsie jsou klíčové tři otázky: je záchvatový stav epileptickým záchvatem, o kterém typ záchvatu se jedná a o který epileptický syndrom se jedná. Zásadní význam pro správnou diagnostiku epilepsie má detailně odebraná anamnéza, která může pomoci v lokalizaci epileptického ložiska. Po klinickém vyšetření obvykle následuje elektroencefalografie (EEG). (Hasan & Tatum, 2021) V interiktálním záznamu je možné nalézt abnormality, jako jsou pomalé vlny nebo patologická paroxysmální aktivita. Normální EEG záznam ale epilepsii nevylučuje, proto je důležité snímat EEG v průběhu klinického záchvatu, který lze vyvolat např. fotostimulací nebo spánkovou deprivací. (Gibbon & kol, 2018) Protože je důležité změny EEG vždy porovnat s klinickým stavem pacienta, je možné zvolit video-EEG, kdy se synchronně zaznamenává obrazový záznam a mnohokanálové EEG. Ze zobrazovacích metod je používána např. počítačová tomografie (CT), magnetická rezonance (MR) nebo SPECT a PET. (Sidhu, Meneka, & kol, 2018) Na CT se po podání kontrastní látky může ukázat strukturální porucha, která by mohlo být příčinou epileptických záchvatů. MR je vedle EEG nejdůležitější diagnostickou metodou, která je vždy indikována v případě negativního CT nálezu nebo u pacientů na epileptochirurgický výkon. SPECT a PET slouží k zobrazení změny prokrvení tkáně, které se u epileptického ložiska liší od běžné tkáně. V interiktálním období je pozorována hypoperfuze, resp. hypometabolismus, zatímco na začátku záchvatu dochází hyperperfuzi. (Lewis, 1997) Poslední metodou pro správné diagnostikování epilepsie je neuropsychologické a psychologické vyšetření. Epileptický proces může totiž vést ke změně kognitivních funkcí, proto se zaznamenává vývoj

kognitivních funkcí v čase. Zvláštním vyšetřením je tzv. Wadův test, kdy dojde k chvilkovému vyřazení jedné z hemisfér a zkoumá se samostatně funkce druhé hemisféry. (Rektor & Ošlejšková, 2010)

1.2.7 Léčba

K léčbě epilepsie se využívá léků označovaných jako antiepileptika nebo též antikonvulziva. (Perucca E. , 2019) Tyto léky neléčí epilepsii jako takovou, ale pouze potlačují její projevy, epileptické záchvaty. Historie antiepileptik sahá do počátku 20. století, kdy se objevily první léky jako je např. fenobarbital. (Pacifci & Gian, 2016) Od té doby došlo k významnému posunu jak kvality, tak kvantity léčiv. Antiepileptika upravují excitabilitu neuronů prostřednictvím ovlivnění receptorů a iontových kanálů. Mohou ovlivňovat sodíkové, vápníkové nebo draslíkové kanály, posilovat GABAergní inhibici nebo tlumit excitační glutamatergní neurotransmisi. Některá z antiepileptik mají silný účinek na fokální záchvaty, ale mohou zhoršovat některé typy generalizovaných záchvatů. Taková antiepileptika bývají označována jako úzkospektrá. Oproti tomu širokospektrá antiepileptika působící slabším účinkem na více molekulárních struktur, potlačují jak fokální, tak generalizované záchvaty. (Kuba, 2010) V případě farmakorezistence může být indikována epileptochirurgická léčba. Chirurgická léčba si klade za cíl vyléčit epilepsii resekci části mozkové tkáně, odpovědné za vznik záchvatů, nebo zábránění šíření patologické elektrické aktivity do druhé hemisféry (hemisferotomie). Dalšími alternativami v případě, že resekce nelze provést, je např. stimulace nervus vagus (VNS). (Bělohávková & kol, 2018)

Přes velký pokrok ve farmacii zhruba 20-30 % pacientů nedosáhne při léčbě antiepileptiky uspokojivé kompenzace. Tento stav nazýváme farmakorezistentní epilepsií. Mezinárodní liga proti epilepsii (ILEA) definuje farmakorezistentní epilepsii takto: Jedná se o epilepsii, u níž se nepodaří dlouhodobě plně kompenzovat pacienta za použití dvou vhodně zvolených antiepileptik v adekvátních terapeutických dávkách, v monoterapii nebo kombinované terapii. (Kwan & kol., 2010) Mechanismy vedoucí k farmakorezistenci známe jen málo, ale předpokládá se souvislost s transportními proteiny. Velká naděje tkví v použití molekulárně genetických metod, identifikaci genů odpovídajících za transport a receptci AEDs. V ČR se odhaduje počet farmakorezistentních pacientů na 25 000. Jak je zmíněno výše, terapií farmakorezistentní epilepsie může být epileptochirurgický zákrok, který ale nelze provést u každého pacienta. (Rektor & Ošlejšková, 2010)

1.3 Regulace regionálního průtoku krve mozkiem

Regulace průtoku krve mozkiem je nezbytná pro jeho normální funkci. Mozek totiž spotřebovává velké množství energie, ale nemá dostatek energetických rezerv. Proto je nucen přijímat energetické substráty za chodu skrze své cévní zásobení. (Kisler & kol, 2017) Vzhledem k dynamickým a regionálně odlišným energetickým požadavkům je třeba, aby byl průtok krve přísně regulován. V případě nesprávné regulaci by mohlo dojít k fatálnímu poškození mozku. S ohledem na důležitost této problematiky je o její pochopení dlouhodobý zájem. (Ladecola, 2017)

Velkým posunem k pochopení této problematiky byl koncept neurovaskulární jednotky, který vzešel z prvního setkání Stroke Progress Review Group z července roku 2001. Díky tomu se začala neurodegenerativní onemocnění spojovat s cerebrovaskulárními onemocněními.

Struktura neurovaskulární jednotky se v cerebrovaskulární síti významně liší. Z Willisova okruhu odbíhají na povrch mozku piální arterie a arterioly, tvořící vysoce kolateralizovanou síť. Piální arterioly jsou tvořené několika vrstvami buněk hladké svaloviny a jsou bohatě inervovány nervovými vlákny z periferních autonomních a senzoryckých ganglií. Od piálních arterií postupně odbíhají penetrující arterioly, které jsou tvořeny už jenom jednou nespojitou vrstvou buněk hladké svaloviny, postrádají perivaskulární nervy. Penetrující arterioly jsou obklopeny perivaskulárním prostorem, na nějž navazují výběžky astrocytů. U kapilár jsou buňky hladké svaloviny částečně nahrazovány pericyty. (Ladecola, 2017)

Důležitým pojmem v regulaci regionálního krevního průtoku mozkiem je neurovaskulární spojení (neurovascular coupling). V mozku se CBF mění úměrně spotřebě energie každé jeho oblasti. Průtok je tedy vyšší v oblastech s vyšší spotřebou energie a nižší v oblastech s nižší spotřebou energie. Kromě toho zvýšení neuronální aktivity vede ke zvýšení CBF omezeného na určitou malou část mozku (funkční hyperémie). Této skutečnosti využívá např. funkční magnetická rezonance (fMRI). (Claassen & kol, 2021)

Mozek vyžaduje správné načasování v dodání kyslíku a glukózy a odstranění potenciálně toxických látek omezené na aktivované oblasti. Tyto úvahy vedly k formování možného mechanismu regulace pomocí zpětné vazby. Mnohé z metabolitů (CO_2 , H^+ , adenosin, laktát) jsou totiž silné vazodilatátory. Na druhou stranu jiné důkazy podporují model dopředné vazby. Glutamát uvolněný synaptickou aktivitou aktivuje postsynaptické glutamátové receptory, což vede k aktivaci signálních drah závislých na Ca^{2+} , a to následně k uvolnění vazoaktivních látek. Oba systémy se vzájemně nevylučují a mohou být tedy přijaty společně. (Ladecola, 2017)

1.4 Modelový organismus-laboratorní potkan

V biomedicínském výzkumu jsou hlodavci díky fyziologické podobnosti s člověkem již řadu let nejvíce využívanými modelovými organismy. (Bryda, 2013) Hlodavci jsou méně nároční na chov, jsou menší než jiní složití savci, například primáti, proto jsou ve výzkumu výhodnější volbou. Dnes vděčí hlodavci za svou popularitu především své snadné dostupnosti, nízkým nákladům na chov, krátkému reprodukčnímu cyklu a schopnosti prospívat v zajetí. (Bryda, 2013)

Ve výzkumu jsou používány nejčastěji dvě skupiny hlodavců, myši a potkani. Přestože v poslední době zaujímají myši ve srovnání s potkany stále významnější roli, zejména v neurovědách a behaviorálních výzkumech mají potkani řadu jasných výhod. (Żakowski, 2020) S potkany se snáze manipuluje, v kontaktu s člověkem jsou klidnější, stres se u nich projevuje v nižší míře, což méně zkresluje výsledky měření. (Meijer & kol, 2007) Pro studium průtoku krve mozkiem je důležité, že stavba neurovaskulárního spojení a regulace mozkového průtoku je analogická jako u člověka.

Větší velikost potkanů je užitečná zejména v experimentech, které zahrnují chirurgii a zobrazovací metody. (Jonckers & kol, 2011) Navíc možnost přesné orientace na mozku potkanů, díky jeho velmi dobře zmapované podobnosti s lidským mozkiem, je ve výběru modelového organismu zásadní. (Swanson & kol, 2018) Behaviorální výzkum ukazuje, že potkani jsou vhodnější pro studium učení a poznávání, protože jsou schopnější učit se úkolům lépe než jiné druhy. (Moulin & kol, 2020) To umožňuje vědcům nahlédnout do základních principů učení a chování.

2 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1 Cíl

Cílem našeho výzkumu je zjistit, zda podání účinné látky sulforafanu zvyšuje regionální průtok krve mozkem při vyvolané odpovědi na transcallosální elektrickou stimulaci potkana 24 hodin po aplikaci.

2.2 Hypotéza

U skupiny potkanů, kterým byl sulforafan podán, dojde k signifikantnímu navýšení regionálního průtoku krve mozkem v porovnání s kontrolní skupinou a sulforafan bude mít protektivní účinek na mozkovou tkáň.

3 METODICKÁ ČÁST

Veškeré experimenty byly prováděny na oddělení vývojové epileptologie FGÚ AVČR. Celý experiment byl schválen resortní komisí AVČR (č.j. 50/2017). V praktické části seminární práce je zkoumán vliv účinné látky sulforafanu na regionální průtok krve mozkiem. Cílem experimentu bylo zjistit, zda aplikace sulforafanu ovlivňuje regulaci regionálního mozkového průtoku krve (rCBF).

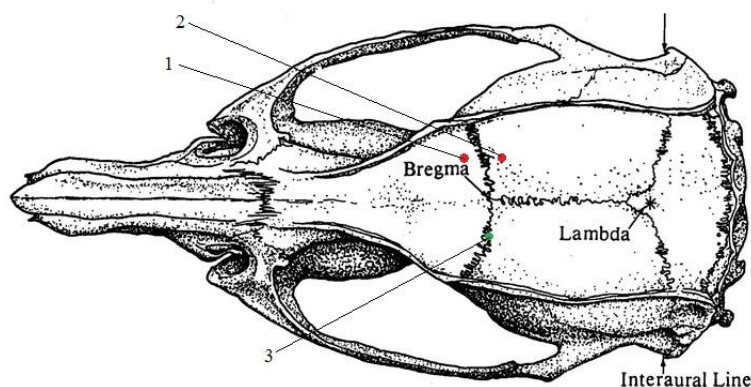
3.1 Materiály a metody

Do výzkumu bylo zařazeno 8 dospělých samců laboratorních potkanů kmene Wistar, jejichž hmotnost se pohybovala mezi 250 a 260 g.

K měření byl využit Laser Doppler Flowmeter a digitalizační jednotka CED Power 1401. V práci byly použity látky dimethylsulfoxid (DMSO), sulforafan (SFN), fosfátový pufr (PBS), urethan a mesocain.

3.2 Chirurgická příprava

Potkani byli uspáni intraperitoneálním podáním celkového anestetika urethanu v množství 1,2 g/kg váhy zvířete. Před zahájením kožní incize byl ještě lokálně aplikován mesocain. Řez byl veden sagitálně v mediální linii na lebce potkana. Následně byly v oblasti operační rány odstraněny přebytečné měkké tkáně. Obnažené kosti neurokrania byly důkladně očištěny a jejich povrch vysušen. Do lebky nad pravou senzomotorickou kůrou, cca 2 mm laterálně od bregmy byly vyvrtány 2 otvory vzdálené od sebe 2 mm v kraniokaudálním směru. Následně do nich byly epidurálně umístěny stimulační stříbrné elektrody. Nad kontralaterální hemisféru byla ve stejné vzdálenosti umístěna sonda Laser Doppler Flowmeter (LDF). Ta byla umístěna do spongiosní kostní tkáně tak, aby detekovala signál z přiléhající mozkové kůry. Tímto způsobem připravená experimentální zvířata byla uložena do stereotaktického rámu. Jejich tělesná teplota byla udržována na 37 °C pomocí vyhřívací podložky a pravidelně kontrolována pomocí rektálního teploměru.



Obr. 1: Schéma uložení stimulačních elektrod a sondy LDF na lebce experimentálního potkana. 1. Stimulační elektroda 2. Stimulační elektroda 3. Sonda LDF (Paxinos & Watson, 1998)

3.3 Postup

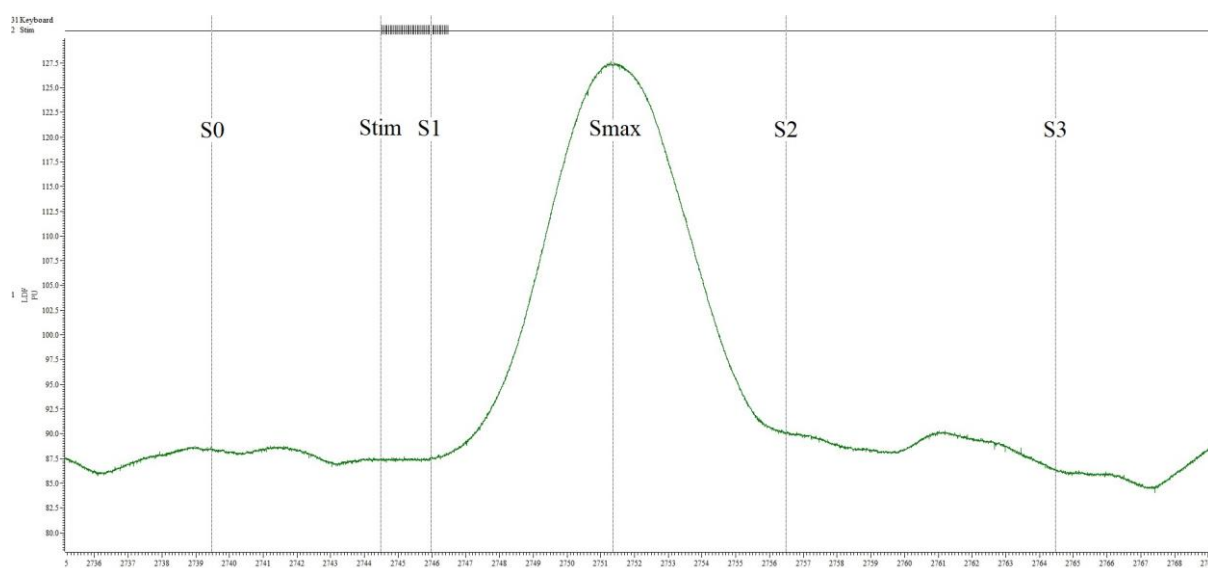
Pro provedení experimentu byl sledovaný soubor (n=8) rozdělen do tří skupin, u nichž byly monitorovány změny regionálního mozkového průtoku v průběhu transcallosální stimulace se vzrůstající frekvencí (5, 10, 15, 20 Hz) po dobu 2-ms. První skupině potkanů (n=3) byl aplikován roztok sulforafanu (SFN), dimethylsulfoxidu (DMSO) a fosfátového pufru (PBS), o výsledné koncentraci dimethylsulfoxidu 0,5 %. Roztok byl podán 24 hodin před měřením. Druhé skupině (n=3) bylo aplikováno samotné rozpouštědlo dimethylsulfoxid (DMSO) s fosfátovým pufrům (PBS). Třetí skupině (n=2) nebyl aplikován žádný roztok.

Stimulátor vytvářel stimulační bifazické pulzy o délce 2-ms a síle 2,5 mA. Mezi každou stimulací byla pauza o délce 2 minut. Pulzy o stejné frekvenci následovaly u jednoho jedince vždy třikrát po sobě. Výsledky všech tří měření byly zprůměrovány. Po skončení experimentu byla všechna zvířata předávkována anestetikem.

Pro zjištění odpovědi při epilepsii byly napodobeny stavy jednotlivého záchvatu (SS) a epileptického statu. Jednotlivý záchvat byl simulován pomocí stimulace 20 Hz po dobu 10-s a epileptický status (SE) pomocí 5x zopakovaného stimulačního protokolu jednotlivého záchvatu s pauzami 5-s.

3.4 Vyhodnocení měření

K měření byla použita digitalizační jednotka CED Power 1401 a software CED Spike2.



Graf 1: Ukázkový průběh odpovědi na stimulaci po podání sulforafanu

Na následujícím grafu je znázorněn ukázkový průběh odpovědi po stimulaci. Je na něm znázorněno několik kurzorů: S0 – začátek měření, Stim – začátek stimulace, S1 – začátek odpovědi, Smax – lokální maximum, S2 – konec odpovědi, S3 – konec měření. Celkový čas měření odpovídá 20 sekundám (S0-S3). Základní linie byla určena průměrem všech hodnot 5 sekund před počátkem stimulace (S0-Stim)

Pro stimulaci se zvyšující se frekvencí byly hodnoceny následující parametry (během 20sekundového časového okna počínaje začátkem stimulace) - plocha pod křivkou

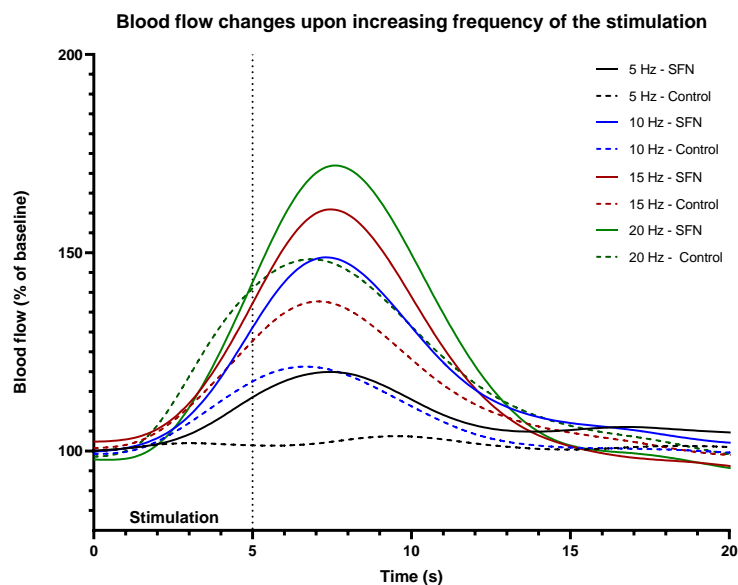
(umožňující určit zvýšení/snížení průtoku krve), lokální maximum (největší pozorované zvýšení průtoku krve); L_{max}), amplituda ($L_{max} - L_{min}$), průměrná odchylka (průměrný rozdíl oproti výchozí hodnotě během celého záznamu, stanovený v absolutní hodnotě), čas k dosažení L_{max} (časy byly počítány od začátku stimulace; TL_{max}) a rychlost amplitudy ($(L_{max} - L_{min}) / (TL_{max} - TL_{min})$). Úplně stejné parametry byly použity pro analýzu stimulace podobné SE (graf 9-18) s tím rozdílem, že časové okno bylo 120 s. V této práci jsou uvedeny pouze parametry, u nichž vyšel faktor skupiny u dvoucestné ANOVY signifikantně. Dvoucestná ANOVA byla využita k rozhodnutí, zda je efekt skupiny signifikantní napříč časovými body. Poté byl proveden post hoc uncorrected Fisher's LSD test, který jednotlivé body (5, 10, 15, 20 Hz) porovnal.

Výsledky byly vyhodnocovány v programu GraphPad Prism 9.3.0. Hladina statistické signifikance byla stanovena na $p=0,05$ (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, # $P<0.001$, ## $P<0.0001$). Všechna data jsou reprezentována průměrem \pm SEM, mimo SE a nepřerušovaný SE (graf 9 a 18), k jejichž hodnocení byl použit nepárový jednovýběrový t-test.

4 VÝSLEDKY

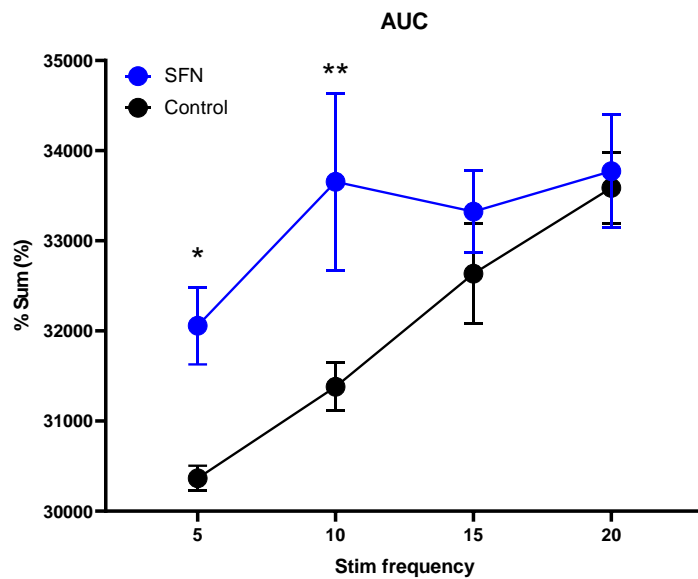
V praktické části jsme sledovali změny průtoku krve mozkiem na zvyšující se frekvenci transcallosální stimulace senzomotorické kůry u tří skupin potkanů – experimentální, kontrolní a naivní kontroly. Experimentální skupině byl aplikován roztok sulforafanu (10 mg/kg váhy zvířete), dimethylsulfoxidu a fosfátového pufru. Kontrolní skupině byl aplikován pouze roztok dimethylsulfoxidu a fosfátového pufru a třetí skupina, tzv. naivní kontroly, nedostala žádný roztok. Vzhledem k tomu, že mezi kontrolní skupinou a naivními kontrolami nebyly patrné rozdíly, jsou znázorněny společně a v textu dále uvedeny jako kontrolní skupina.

Výsledky jsou rozděleny do dvou částí. První se skládá z jednotlivých záchvatů (SS), druhá z epileptického statu (SE) a nepřerušovaného epileptického statu. Uvedeny jsou pouze výsledky, u nichž vyšel faktor skupiny u dvoucestné ANOVY signifikantně.



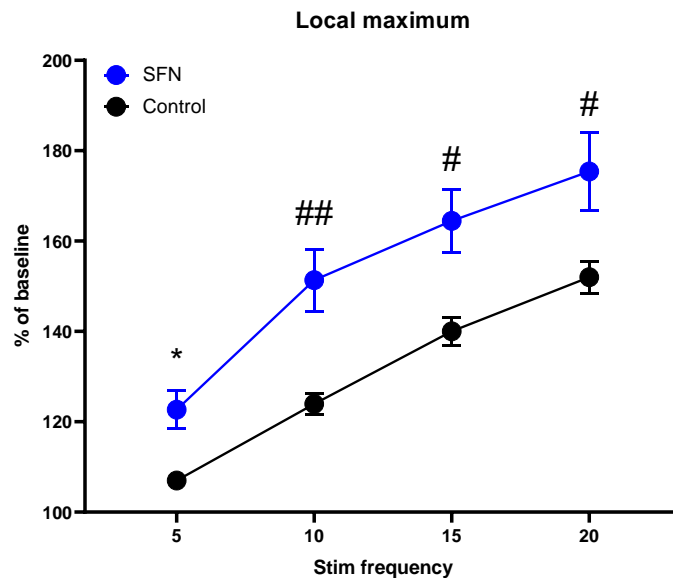
Graf 2: Souhrnný graf závislosti změny CBF na zvyšování frekvence stimulace a podání sulforafanu. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty všech měření.

Z uvedeného souhrnného grafu jednotlivých záchvatů vyplývá, že u experimentální skupiny dochází ke zvýšení regionálního průtoku krve mozkiem. Tento nárůst je u všech frekvencí stimulace vyšší než u kontrolní skupiny. Graf tedy dokazuje benefiční účinky SFN na zvýšení průtoku krve mozkiem (rCBF).



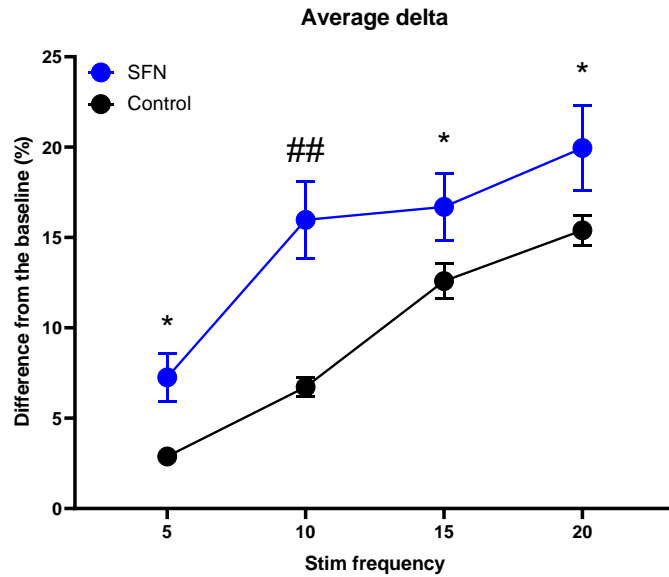
Graf 3: Vliv podání sulforafanu na objem krve, který proteče monitorovanou oblastí, po elektrické stimulaci

Graf znázorňuje plochu pod křivkou, tedy integrál průtoku. Plocha pod křivkou je dána objemem krve, který proteče monitorovanou oblastí za definovaný úsek času. Plocha pod křivkou je větší u SFN. Největší rozdíl můžeme pozorovat při stimulaci 10 Hz. Při dalším zvyšování frekvence stimulace k dalšímu nárůstu nedocházelo, pravděpodobně z důvodu dosažení maximální vazodilatace cév v monitorované oblasti.



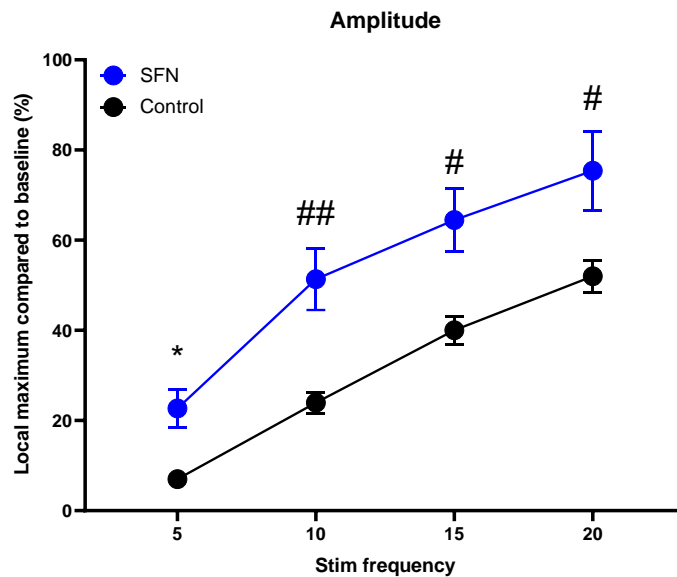
Graf 4: Vliv podání sulforafanu na hodnoty lokálního maxima po stimulaci

Lokální maximum je maximální průtok indukovaný stimulací. Byl určen v úseku 20 sekund po začátku stimulace jako bod s nejvyšší hodnotou. Roste téměř rovnoměrně s velikostí stimulace. Pro SFN vychází ve všech bodech vyšší, což je důkazem, že sulforafan zvyšuje rCBF.



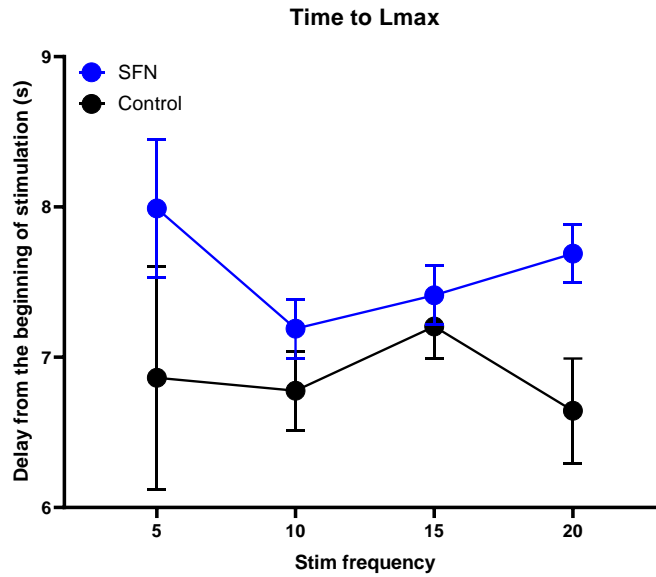
Graf 5: Vliv podání sulforafanu na průměrnou odchylku průtoku od základní hodnoty

Na grafu vidíme průměrnou odchylku. Její hodnota je absolutním rozdílem průměru všech bodů v měřeném úseku 20 sekund a hodnoty základní linie (100 %). Největší rozdíl mezi experimentální a kontrolní skupinou byl při stimulaci 10 Hz.



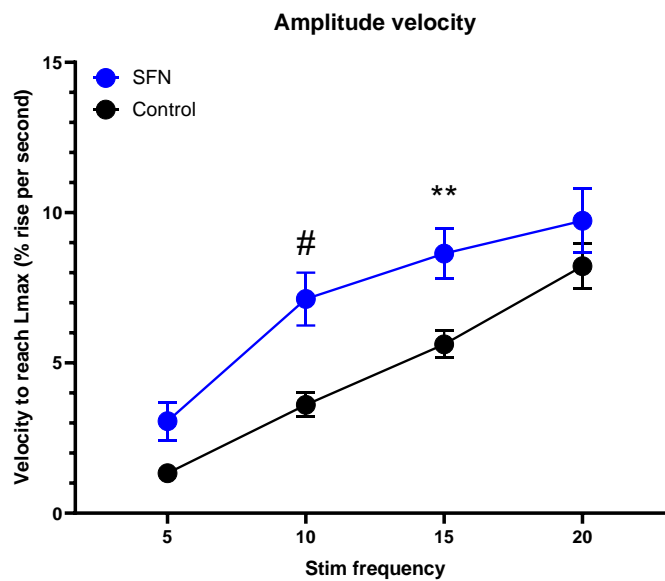
Graf 6: Vliv podání sulforafanu na hodnotu amplitudy průtoku po elektrické stimulaci

Na grafu je znázorněná amplituda. Je dána jako rozdíl mezi lokálním minimem, který byl určen základní linií, a lokálním maximem. Amplituda je vyšší u SFN. Oproti normální situaci dojde při aplikaci SFN k nárůstu do vyšších hodnot rCBF.



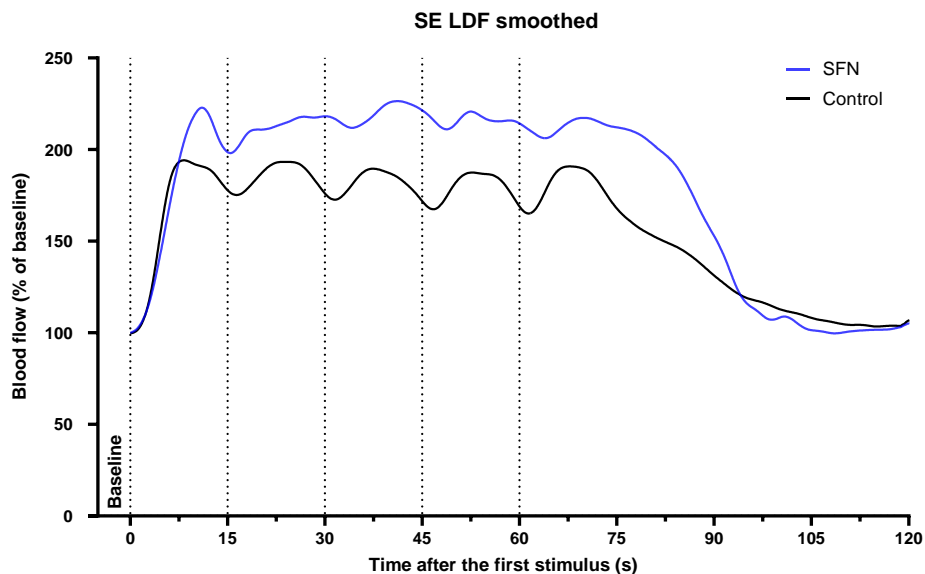
Graf 7: Vliv podání sulforafanu na čas potřebný k dosažení lokálního maxima po stimulaci

Graf ukazuje čas do lokálního maxima, určený jako rozdíl hodnoty času od začátku stimulace do lokálního maxima. Výsledky nejsou v žádném bodě signifikantní.



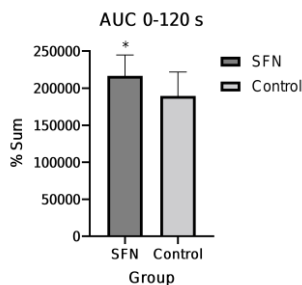
Graf 8: Vliv podání sulforafanu na rychlost stoupání průtoku po stimulaci

Graf udává rychlost stoupání a je měřen od počátku stimulace do lokálního maxima. Hodnoty byly určeny jako podíl amplitudy a času do lokálního maxima. U experimentální skupiny dosahuje rychlost stoupání vyšších hodnot, protože je lokální maximum vyšší.

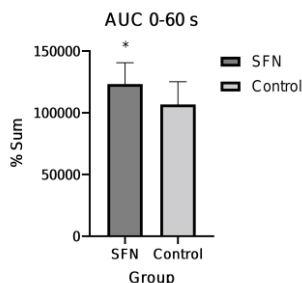


Graf 9: Vliv podání sulforafanu na průběh průtoku u napodopení epileptického stavu

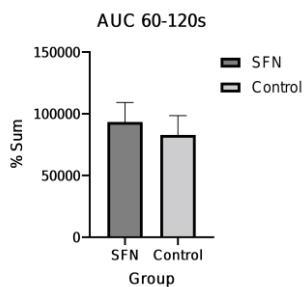
Graf je napodobením průběhu epileptického stavu. Status epilepticus je označení pro záchvat trvající déle než 5 minut nebo pro sérii min 2 záchvatů, mezi nimiž nedojde k nabytí vědomí. Důvodem, proč jsme zařadili SE-like do našeho výzkumu je, že při něm dochází k největšímu poškození mozku a bylo tedy důležité zjistit, zda by mohla aplikace SFN v tomto případě pomoci. Zjistili jsme, že efekt SFN se od SS významně neliší. Opět dochází ke stejnému benefičnímu působení SFN na rCBF.



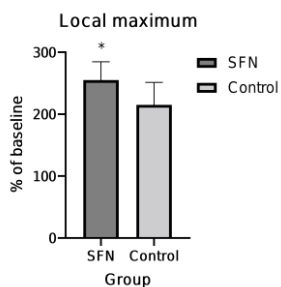
Graf 10: Vliv podání sulforafanu na objem krve, který proteče monitorovanou oblastí 0-120 vteřin po elektrické stimulaci napodobující epileptický status



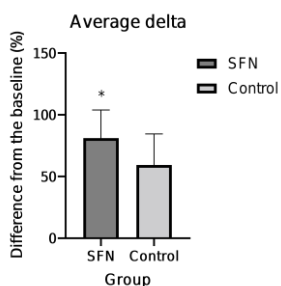
Graf 11: Vliv podání sulforafanu na objem krve, který proteče monitorovanou oblastí 0-60 vteřin po elektrické stimulaci napodobující epileptický status



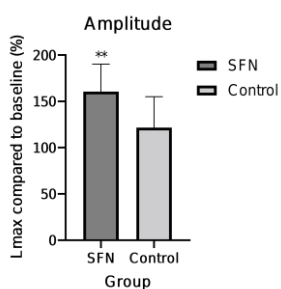
Graf 12: Vliv podání sulforafanu na objem krve, který proteče monitorovanou oblastí 60-120 vteřin po elektrické stimulaci napodobující epileptický status



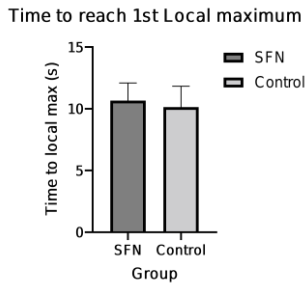
Graf 13: Vliv podání sulforafanu na hodnoty lokálních maxim po stimulaci napodobující epileptický status



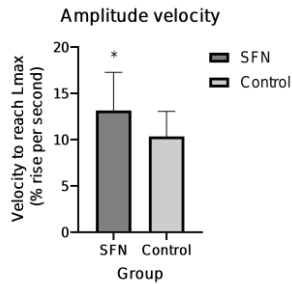
Graf 14: Vliv podání sulforafanu na průměrnou odchylku průtoku od základní hodnoty po stimulaci napodobující epileptický status



Graf 15: Vliv podání sulforafanu na hodnoty amplitud průtoku po elektrické stimulaci napodobující epileptický status



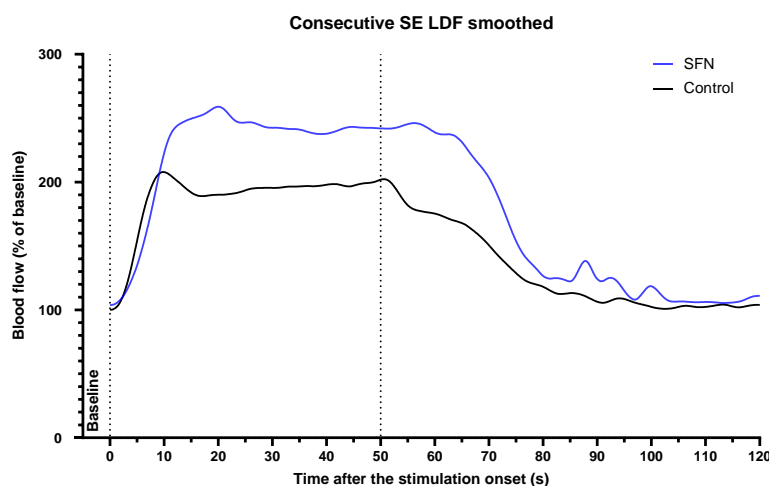
Graf 16: Vliv podání sulforafanu na čas potřebný k dosažení lokálního maxima po stimulaci napodobující epileptický status



Graf 17: Vliv podání sulforafanu na rychlost stoupání průtoku po stimulaci napodobující epileptický status

Na prvních třech grafech vidíme plochu pod křivkou. Graf 10 reprezentuje plochu pod křivkou v celkovém měřeném úseku (120 sekundách od počátku stimulace), na grafech 11 a 12 byl časový úsek rozdělen od počátku stimulace do konce stimulace a od konce stimulace do konce měření. Všechny hodnoty vyšly signifikantně.

Na zbylých grafech můžeme vidět lokální maximum, průměrnou odchylku od základní linie, amplitudu a rychlost stoupání. Všechny dosahují u experimentální skupiny vyšších hodnot. Naopak podání sulforafanu nemá žádný vliv na čas do prvního lokálního maxima. K statistickému hodnocení byl použit párový jednovýběrový t-test.



Graf 18: Vliv podání sulforafanu na průběh průtoku u napodobení nepřerušovaného epileptického statusu

Graf ukazuje stimulaci 20 Hz po dobu 50 sekund. Statistická analýza není možná pro nedostatečně početný soubor. K dispozici byly pouze tři měření proti čtyřem. Záměrem tohoto měření bylo zjistit, zda se výsledek bude lišit od SS nebo SE.

5 DISKUZE

V našem výzkumu jsme vycházeli z poznatků Parfenové a kol. (2019), jejichž výzkum se věnoval akutnímu účinku sulforafanu na průtok krve mozkem a mechanismu jeho působení. Jejich studie ale nerozpracovává konkrétní terapeutický přínos. Nás proto zaujalo možné využití jejich poznatků v léčbě epileptogeneze. Při epileptickém záchvatu dochází v důsledku sníženého průtoku krve mozkovou tkání k hypoxii a nedostatečnému zásobení energetickými substráty. To má za následek vznik volných kyslíkových radikálů (ROS) a oxidativního stresu (OS), což může vést k poškození nervových buněk. Pokud zvýšíme průtok krve mozkem, můžeme zabránit tomuto poškození a tím i dalšímu rozvoji epilepsie.

Parfenová a kol. zkoumali ve své studii přímý vasodilatační efekt sulforafanu na cévy mozku. Sulforafan podávali systémově v dávce 0,4 mg/kg váhy zvířete současně se zahájením měření nebo lokálně v dávce od 10 μ M do 1 mM. Jako experimentální soubor zvolili mláďata prasat (1-5 dní; 1,5-3,0 kg; obě pohlaví). Pro svou práci použili metodu kraniálního okna. V experimentální části měřili hladinu H_2S v periarachnoideálním kortikálním mozkomíšním moku a změny průtoku pomocí měření průměru piálních arteriol. K celkové anestézii využili α -chlorázu (50 mg/kg + 5 mg dle potřeby iv). Měření probíhala v intervalech 10 minut po dobu 2 hodin. Systémové podání sulforafanu způsobilo vazodilataci piálních arteriol, ke které došlo 5-10 minut po aplikaci a přetrvávala déle než 2 hodiny. Maximální vasodilatační odpověď (cca 25% nárůst) byla pozorována 20-80 min po podání. V závěru své práce uvádí vysvětlení mechanismu akutního působení sulforafanu na krevní průtok mozkem. Sulforafan má schopnost stimulovat endogenní enzymatickou produkci vasodilatačního mediátoru H_2S prostřednictvím akutní aktivace CSE/CBS v neurovaskulární jednotce. Vyvolaná enzymatická tvorba H_2S aktivuje BK a K_{ATP} kanály, což vede k vazodilataci mozkových arteriol. Tímto závěrem vyvrací původní myšlenku, že by sulforafan sám byl donorem H_2S . V neposlední řadě dokazují propustnost sulforafanu skrze hematoencefalickou bariéru.

Oproti tomu my jsme se v naší práci zabývali dlouhodobým efektem sulforafanu, který zůstal neprozkoumaný. Podávali jsme dávku 10 mg sulforafanu/kg váhy zvířete, a to 24 hodin před zahájením měření. Narozdíl od Parfenové v našem případě nešlo o sledování spontánního účinku sulforafanu na kontinuální průtok, ale o sledování účinků sulforafanu na průběh odpovědi po elektrické stimulaci. Tomu odpovídala i zvolená metoda. V naší práci byla využita technologie Laser Doppler Flowmeter, která nám sice neumožňuje změřit aktuální průtok, ale můžeme pomocí ní zaznamenat jeho relativní změnu po stimulaci. Tato metoda nám ale na druhou stranu neumožnila vyloučit ani potvrdit trvalý vazoaktivní efekt sulforafanu.

Podařilo se nám prokázat, že sulforafan má účinek na regionální průtok krve mozkem při vyvolané odpovědi na transcallosální elektrickou stimulaci potkana i 24 hodin po aplikaci. Je vysoce pravděpodobné, že v této fázi (24 hodin po aplikaci) se již nejedná o přímý vazoaktivní efekt sulforafanu, jak ho popsala Parfenová a kol., ale spíše o důsledek indukce Nrf2/Keap1 dependentních enzymů.

Nrf2 je za normálních okolností vázaný na protein Keap 1. Reaktivní formy kyslíku, reaktivní formy dusíku a další endogenní nebo exogenní látky, např. sulforafan mohou komplex Nrf2-Keap 1 rozdělit. Po fosforylaci cytoplazmatickými kinázami se Nrf2 dostane do jádra, kde se

naváže na prvek antioxidační ochrany (ARE). Následuje upregulace obranných enzymů fáze II a antioxidačních stresových proteinů, např. hem oxygenázy-1 (HO-1) nebo NAD(P)H-chinon oxidoreduktázy-1 (NQO1). Tyto antioxidační proteiny vázané na Nrf2/ARE obnovují bazální redoxní stav v buňkách vystavených oxidativnímu stresu a zánětlivým mediátorům.

Vzhledem k tomu, že většina volných radikálů jsou vazoaktivní látky, dojde pravděpodobně k ovlivnění regulace průtoku krve mozkovými oblastmi. Tento mechanismus by vysvětloval i naše pozorování účinků sulforafanu na průtok 24 hodin po aplikaci, když už je sulforafan z organismu vyloučen. Sulforafan vysoce specificky aktivuje Nrf2/Keap1 systém, což vede k indukcii antioxidačních enzymů a v konečném důsledku může dojít k ovlivnění regulace mozkové cirkulace.

Hlavním přínosem naší práce je zjištění, že sulforafan působí protektivně na mozkovou tkáň, protože dokáže lépe pokrýt energetické potřeby mozku skrze mechanismus zvýšení regionálního krevního průtoku. Tato jeho schopnost je klíčová při extrémní, většinou patologické aktivitě mozku, jakou představuje například epileptický záchvat.

Přesný mechanismus, který by vysvětloval zvýšené odpovědi sulforafanu na stimulaci zůstává neobjasněný a bude vyžadovat další výzkum.

6 ZÁVĚR

Hlavním cílem experimentálních měření bylo zjistit, zda podání sulforafanu zvyšuje rCBF při vyvolané odpovědi na transcallosální elektrickou stimulaci potkana 24 hodin po aplikaci. Dále jsme chtěli ověřit, zda má sulforafan protektivní účinky na mozkovou tkáň a zda by ho bylo možné využít k léčbě epilepsie.

Měření byla průkazná a jasně ukázala rozdíl ve změně regionálního mozkového průtoku krve. Výsledná data, tedy potvrzují, že u potkanů, kterým byl sulforafan podán, je hodnota regionálního krevního průtoku v mozku signifikantně vyšší. Byly zaznamenány protektivní účinky sulforafanu na mozkovou tkáň, což ukazuje jeho potenciál v léčbě epilepsie.

Prováděný experiment byl součástí dlouhodobější práce na oddělení Vývojové epileptologie FGÚ AVČR, ale celou experimentální část této práce jsem prováděl samostatně. V další fázi bude následovat zhodnocení biodistribuce glukózy pomocí pozitronové emisní tomografie (PET), kde by se měla ukázat spojitost s epileptogenními ložisky.

POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE

- Alfieri, A., & kol. (1. Zář 2011). Targeting the Nrf2–Keap1 antioxidant defence pathway for neurovascular protection in stroke. *The Journal of Physiology*, stránky 4125-4136.
- Ambler, Z. (2006). *Základy neurologie: učebnice pro lékařské fakulty*. Praha: Galén.
- Armstead, M. W. (zář 2016). Cerebral Blood Flow Autoregulation and Dysautoregulation. *Anesthesiol Clinics*, stránky 465–477.
- Bělohávková, A., & kol. (2018). Chirurgická léčba epilepsie u dětí: současné trendy. *Neurologie pro praxi*, 88-91.
- Bryda, E. C. (Květen 2013). The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research. *Missouri medicine*, stránky 207-211.
- Bušek, P. (2013). Epilepsie. *Medicína pro praxi 3*, stránky 111-114.
- Claassen, J. A., & kol. (26. Březen 2021). Regulation of cerebral blood flow in humans: physiology and clinical implications of autoregulation. *Physiological reviews*, stránky 1487-1559.
- Fisher, S. R., & kol. (2017). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *ILAE position paper*, stránky 522-530.
- Geronzi, U., & kol. (18. Květen 2018). Oxidative stress in epilepsy. *Expert review of neurotherapeutics*, stránky 427-434.
- Gibbon, M. F., & kol. (28. Zář 2018). Sleep and epilepsy: unfortunate bedfellows. *Archives of disease in childhood*, stránky 189–192.
- Hasan, F. T., & Tatum, O. W. (1. Březen 2021). Ambulatory EEG Usefulness in Epilepsy Management. *Journal of clinical neurophysiology : official publication of the American Electroencephalographic Society*, stránky 101-111.
- Husari, K., & Dubey, D. (16. Červen 2019). Autoimmune Epilepsy. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, stránky 685–702.
- Jardim, F. R., & kol. (21. Duben 2020). Effects of sulforaphane on brain mitochondria: mechanistic view and future directions. *Journal of Zhejiang University SCIENCE*.
- Jonckers, E., & kol. (18. Duben 2011). Functional Connectivity fMRI of the Rodent Brain: Comparison of Functional Connectivity Networks in Rat and Mouse. *Plos one*.
- Kisler, K., & kol. (18. Květen 2017). Cerebral blood flow regulation and neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, stránky 419–434.
- Kuba, R. (2010). Antiepileptika a jejich klinické použití v epileptologii. *Praktické lékařství*, 62-66.
- Kwan, P., & kol. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 1069-1077.
- Ladak, Z., & kol. (18. Březen 2021). Sulforaphane (SFA) protects neuronal cells from oxygen & glucose deprivation (OGD). *PLoS One*.
- Ladecola, C. (27. Zář 2017). The neurovascular unit coming of age: a journey through neurovascular coupling in health and disease. *Neuron*, stránky 17-42.

- Lee, H., & kol. (17. Červenec 2017). Altered intrinsic functional connectivity in the latent period of epileptogenesis in a temporal lobe epilepsy model. *Experimental neurology*, stránky 89–98.
- Lewis, H. D. (8. Červenec 1997). Functional brain imaging with cerebral perfusion SPECT in cerebrovascular disease, epilepsy, and trauma. *Neurosurgery clinics of North America*, stránky 337–344.
- Marušič, P., & kol. (19. Březen 2018). Nové klasifikace epileptických záchvatů a epilepsií ILAE 2017. *Neurologie pro praxi*, stránky 32–36.
- Meijer, M. K., & kol. (Duben 2007). Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. *Laboratory animals*, stránky 161–173.
- Moulin, T. C., & kol. (23. Listopad 2020). Rodent and fly models in behavioral neuroscience: An evaluation of methodological advances, comparative research, and future perspectives. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, stránky 1–12.
- Pacifici, & Gian, M. (2016). Clinical Pharmacology of Phenobarbital in Neonates: Effects, Metabolism and Pharmacokinetics. *Current pediatric reviews*, stránky 48–54.
- Parfenova, H., & kol. (9. Říjen 2019). Vasodilator effects of sulforaphane in cerebral circulation: A critical role of endogenously produced hydrogen sulfide and arteriolar smooth muscle KATP and BK channels in the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, stránky 1987–1996.
- Patel, S., & kol. (28. Zář 2018). H₂S mediates the vasodilator effect of endothelin-1 in the cerebral circulation. *Heart and Circulatory Physiology*, stránky 1759–1764.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Academic Press*, str. 11.
- Perucca, E. (1. Srpen 2019). Antiepileptic drugs: evolution of our knowledge and changes in drug trials. *Epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape*, stránky 319–329.
- Perucca, P., & kol. (27. Duben 2020). The Genetics of Epilepsy. *Annual review of genomics and human genetics*, stránky 205–230.
- Reddy, C., & Saini, G. A. (16. Říjen 2020). Metabolic Epilepsy. *Indian journal of pediatrics*, stránky 1025–1032.
- Rektor, I., & Ošlejšková, H. (2010). *Stručná epileptologie pro praxi*. Olomouc: Solen.
- Russo, M., & kol. (24. Květen 2018). Nrf2 targeting by sulforaphane: A potential therapy for cancer treatment. *Critical reviews in food science and nutrition*, stránky 1391–1405.
- Sandouka, S., & Shekh-Ahmad, T. (27. Říjen 2021). Induction of the Nrf2 Pathway by Sulforaphane Is Neuroprotective in a Rat Temporal Lobe Epilepsy Model. *Antioxidants (Basel)*.
- Sharma, A. (2011). Regional Cerebral Blood Flow. V J. Kreutzer, *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology* (stránky 2135–2136). New York: Springer-Verlag New York Inc.
- Shekh-Ahmad, T., & kol. (1. Srpen 2019). Reactive oxygen species in status epilepticus. *Epilepsy & behavior*.
- Schepici, G., Bramanti, P., & Mazzon, E. (16. Listopad 2020). Efficacy of Sulforaphane in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*.

- Sidhu, Meneka, K., & kol. (31. Srpen 2018). Neuroimaging in epilepsy. *Current opinion in neurology*, stránky 371–378.
- Sivapalan, T., & kol. (8. Březen 2018). Bioavailability of Glucoraphanin and Sulforaphane from High-Glucoraphanin Broccoli. *Molecular nutrition & food research*, stránky 1-10.
- Song, Y. k. (28. Červen 2015). Dysfunction of Neuro-vascular/metabolic Coupling in Chronic Focal Epilepsy. *IEEE transactions on bio-medical engineering*, stránky 97–110.
- Stroke Progress Review Group. (nedatováno). Načteno z National Institute of Neurological Disorders and Stroke: <https://www.ninds.nih.gov/About-NINDS/Strategic-Plans-Evaluations/Strategic-Plans/Stroke-Progress-Review-Group>
- Swanson, L. W., & kol. (17. Leden 2018). Brain maps 4.0-Structure of the rat brain: An open access atlas with global nervous system nomenclature ontology and flatmaps. *The Journal of comparative neurology*, stránky 935-943.
- Thomas, A., & Brooks-Kayal, A. (2013). Chapter 36 - Excitation–Inhibition Epilepsies. *Neural Circuit Development and Function in the Healthy and Diseased Brain*, 709-730.
- Trinka, E., & kol. (4. Zář 2015). A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*, stránky 1515–1523.
- Vágnerová, M. (2004). *Psychopatologie pro pomáhající profese*. Praha: Portál.
- Vezzani, A., & kol. (30. Zář 2015). Infections, inflammation and epilepsy. *Acta neuropathologica*, stránky 211–234.
- Żakowski, W. (1. Květen 2020). Animal Use in Neurobiological Research. *Neuroscience*, stránky 1-10.

SEZNAM ZKRATEK

AEDs	antiepileptika
CBF	průtok krve mozkem
CBS	cysathionin beta syntáza
CNS	centrální nervová soustava
CSE	cystathionin gama-lyáza
CT	výpočetní tomografie
DMSO	dimethylsulfoxid
EEG	elektroencefalografie
fMRI	funkční magnetická rezonance
HO-1	hem oxygenáza-1
ILAE	Mezinárodní liga proti epilepsii
LDF	Laser Doppler Flowmeter
NQO1	NAD(P)H-chinon oxidoreduktázy-1
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OS	oxidativní stres
PBS	fosfátový pufr
PET	pozitronová emisní tomografie
rCBF	regionální průtok krve mozkem
ROS	volné kyslíkové radikály
SE	epileptický status
SFN	sulforafan
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie
SS	jednotlivý záchvat
VNS	stimulace nervus vagus
WHO	Světová zdravotnická organizace