

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra fyziologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv stresu na expresi 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázy v mozku  
laboratorního potkana

---

Effect of stress on expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain

Andrea Kuželová

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Jiří Pácha, DrSc.

Praha 2013

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací s názvem: „Vliv stresu na expresi 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázy v mozku laboratorního potkana“ vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Jiřího Páchy, DrSc., s použitím literatury uvedené na konci mé diplomové práce v seznamu použité literatury.

V Praze dne 09. 08. 2013

.....

Andrea Kuželová

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Jiřímu Páchovi, DrSc. za cenné rady, připomínky a vedení mé diplomové práce. Dále celému kolektivu na oddělení Fyziologie epitelu, zejména pak Ing. Peteru Ergangovi a Mgr. Matúši Sotákovi za jejich výpomoc a spolupráci.

Poděkování patří také Grantové agentuře Univerzity Karlovy, která mi umožnila získat stipendium, kterým bylo provedení práce finančně podporováno.

V neposlední řadě chci poděkovat celé své rodině a mému příteli Pavlovi Drábikovi za morální a finanční podporu při studiu.

Diplomová práce se zabývá vlivem stresu na činnost CA1 oblasti hippocampu. Hlavním úkolem bylo zjistit, zda stresová zátěž ovlivní lokální metabolismus glukokortikoidů, a zda se v CA1 oblasti hippocampu účinkem stresové reakce změní hladiny kortikosteroidních receptorů. K odpovědi na tyto otázky byly použity celkem tři kmeny potkanů. Potkani kmene Fisher, Lewis a Wistar, kteří se mezi sebou vzájemně liší v aktivitě osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny. Naše výsledky prokázaly, že stresová zátěž nemá žádný vliv na změnu exprese MR mRNA. Naopak snižuje hladiny GR mRNA v CA1 dorzální oblasti hippocampu. Také jsme potvrdili, že u potkanů kmene Lewis a Wistar nedojde po stresu ke změně glukokortikoidního metabolismu. U Fisher potkanů se v CA1 ventrální oblasti hippocampu zvýšila exprese 11 $\beta$ -HSD1 mRNA, a s tím tedy i metabolismus kortikosteronu.

This thesis examines the influence of stress on the activity of hippocampal CA1 area. The main task was to determine whether the stress load affects the changes of the local metabolism of glucocorticoids, and whether the levels of corticosteroid receptors in the CA1 hippocampus are modulated in response to stress. In order to answer these questions, the experiments were carried out using three different rat strains - Fisher, Lewis and Wistar which differ in their activities of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Our results demonstrate that stress has no effect on expression of MR mRNA. Conversely, stress reduces the levels of GR mRNA in CA1 area of the dorsal hippocampus. Moreover, we confirmed that the Lewis and Wistar rats didn't change metabolism of glucocorticoids after stress response. By the Fisher rats increased levels of 11 $\beta$ -HSD1 mRNA expression and therefore increased the metabolism of corticosterone.

## Klíčová slova

---

Stres, glukokortikoidy, glukokortikoidní receptory, mineralokortikoidní receptory, HPA osa, 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenáza typu I, CA1 oblast hippocampu.

Stress, glucocorticoids, glucocorticoid receptors, mineralocorticoid receptors, HPA axis, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type I, CA1 region of the hippocampus.

1. Seznam zkratk	7
2. Úvod	11
3. Literární přehled	12
3.1. OSA HYPOTHALAMUS-HYPOFÝZA-NADLEDVINY	12
3.1.1. Stresová dráha	13
3.1.2. Propojení HPA osy	14
3.1.3. Hypothalamus	15
3.1.3.1. Paraventriculární jádro	17
3.1.3.2. Kortikotropin-uvolňující hormon	18
3.1.4. Hypofýza	20
3.1.4.1. Adenohypofýza	20
3.1.4.2. Adrenokortikotropní hormon (ACTH)	21
3.1.5. Nadledviny	23
3.1.5.1. Glukokortikoidy	23
3.1.6. Porovnání činnosti HPA osy u potkanů a myši	27
3.2. 11 $\beta$ -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENÁZA	29
3.2.1. 11 $\beta$ -HSD2	31
3.2.2. 11 $\beta$ -HSD1	33
3.2.2.1. 11 $\beta$ -HSD1 v CNS	34
3.3. HIPPOKAMPUS	36
4. Cíle práce	42
5. Materiál a metody	43
5.1. Použitá zvířata	43
5.2. Použité chemikálie	44
5.3. Použité přístroje	44
5.4. Stresový protokol	45
5.5. RIA	46
5.6. Laserová mikrodisekce (LMD)	46
5.7. Izolace totální RNA	47
5.8. Příprava cDNA	48
5.9. Kvantifikace cDNA	48

5.10. Statistika .....	49
6. Výsledky.....	50
6.1. Hladiny kortikosteronu .....	50
6.2. Změny v genové expresi.....	50
6.2.1. 11 $\beta$ -HSD1 mRNA .....	51
6.2.2. MR mRNA .....	52
6.2.3. GR mRNA .....	54
6.2.4. CRH-R1 mRNA .....	55
6.2.5. CRH-R2 mRNA .....	57
6.2.6. Hladiny UCN-2.....	58
6.2.7. Hladiny PAC1-R.....	60
6.2.8. Hladiny PACAP .....	61
7. Diskuze.....	63
8. Závěr.....	69
9. Seznam použité literatury .....	71

## 1. Seznam zkratk

---

6PG	6-fosfoglukonolaktát
11 $\beta$ -HSD1	11beta-hydroxysteroiddehydrogenáza typu 1
11 $\beta$ -HSD2	11beta-hydroxysteroiddehydrogenáza typu 2
11HSD	11beta-hydroxysteroiddehydrogenáza
ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADH	antidiuretický hormon
AME	syndrom zdánlivého mineralokortikoidního nadbytku
ANOVA	statistická analýza rozptylu
AP-1	aktivační protein-1
AV ČR	Akademie věd České republiky
AVP	argininvasopresin
C-11	jedenáctý uhlík v řetězci
CA1d	CA1 dorzální oblast hippocampu
CA1i	CA1 intermediální oblast hippocampu
CA1v	CA1 ventrální oblast hippocampu
cAMP	cyklický adenosinmononukleotid
CBG	globulin vázající kortikosteroidy
CBX	karbenoxolon
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CLIP	kortikotropinu podobný peptid intermediálního laloku
CNS	centrální nervová soustava
CoA	koenzym A
CREB	transkripční faktor
CRF	kortikotropin-uvolňující faktor
CRH	kortikotropin-uvolňující hormon
CRH-R1	receptor pro kortikotropin-uvolňující hormon typu 1

CRH-R2	receptor pro kortikotropin-uvolňující hormon typu 2
CS	kortikosteron
DA	dopamin
DG	gyrus dentatus
DH	dorzální hippokampus
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
EC	enthorinální kůra
EPSP	excitační postsynaptický potenciál
ER	endoplazmatické retikulum
F344	potkani kmene Fisher
FSH	folikuly-stimulující hormon
H6PDH	hexóza-6-fosfátdehydrogenáza
HPA osa	osa hypothalamus-hypofýza-nadledviny
Hsp	protein teplotního šoku
G6P	glukóza-6-fosfát
G $\alpha$ S	alfa-stimulační podjednotka trimerního G-proteinu
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GHRH	růstový hormon-uvolňující hormon
GLUT	glukózový transportér
GnRH	gonadotropin-uvolňující hormon
GR	glukokortikoidní receptor
GRE	glukokortikoidy regulovaná oblast genu
GT	glukóza-6-fosfát translokáza
IGF-1	insulinu podobný růstový faktor-1
IL-1	interleukin 1



IL-6	interleukin 6
LDL	lipoproteinová částice s nízkou hustotou
LEW	potkani kmene Lewis
LH	luteinizační hormon
LMD	laserová mikrodisekce
LPH	lipotropin
LS	laterální septum
LTD	proces dlouhodobé deprivace
LTP	proces dlouhodobé potenciace
Lys	aminokyselina lysin
mMR	membránový mineralokortikoidní receptor
MR	mineralokortikoidní receptor
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MSH	melanocyty-stimulující hormon
NAD <sup>+</sup>	nikotinaminadeninukleotid oxidovaný
NADPH	nikotinaminadeninukleotidfosfát redukovaný
NF-κB	nukleační faktor kappa B
nGRE	negativně glukokortikoidy regulovaná oblast genu
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -asparagová kyselina
N-POC	<i>N</i> -pro-opiokortin
NPP	<i>N</i> -terminální peptid proopiomelanokortinu
P450 <sub>ssc</sub>	cytochrom P450 štěpící postranní řetězec cholesterolu
PAC1-R	receptor hypofyzárního adenylát-cyklázu aktivujícího polypeptidu typu 1
PACAP	hypofyzární adenylát-cyklázu aktivující polypeptid
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyetylen glykol

PKA	proteinkináza typu A
POMC	proopiomelanokortin
pre-POMC	pre-proopiomelanokortin
PRL	prolaktin
PTSD	posttraumatická stresová porucha
PVN	paraventriculární jádro hypothalamu
RIA	radioimunoesej
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SDR	proteinová rodina dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem
SS	somatostatin
ST	stria terminalis
TNF- $\alpha$	tumornekrotizující faktor-alfa
TRH	thyreotropin-uvolňující hormon
TSH	thyreotropin-stimulující hormon
Tyr	aminokyselina tyrosin
UCN	urokortin
VGCC	napětově závislý kanál pro vápenaté ionty
VH	ventrální hippokampus
VIP	vasoaktivní intestinální peptid
VPAC1	vasoaktivní intestinální peptid-preferující receptor typu 1
VPAC2	vasoaktivní intestinální peptid-preferující receptor typu 2
WIS	potkani kmene Wistar

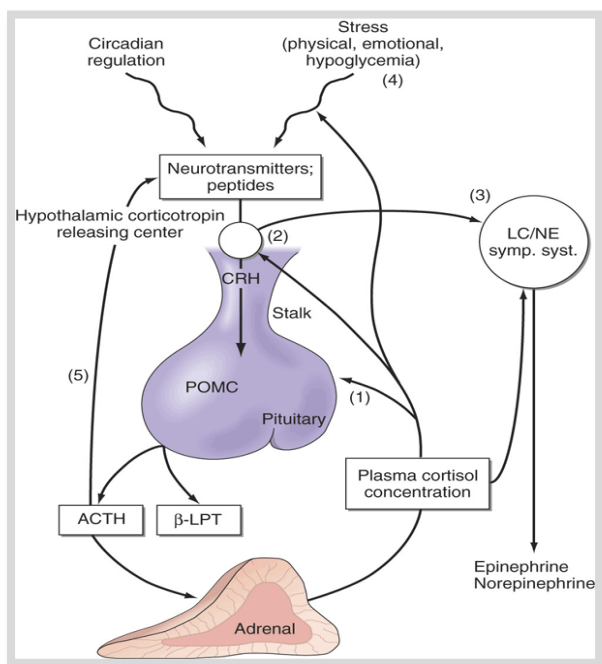
Stres je jakýkoliv podnět vedoucí k narušení vnitřního prostředí organismu, což může mít za následek celou řadu psychických a fyzických změn. Stresová reakce zahrnuje v první řadě aktivaci sympatického nervového systému, který umožní organismu okamžitě zareagovat. Následně se začínají uvolňovat glukokortikoidy z kůry nadledvin, které jsou důležité pro zpětné nastavení homeostáze. Sekrece glukokortikoidů je regulována osou hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA). HPA osa je nejdůležitější neuroendokrinní soustavou, která je do velké míry nadřazena většině ostatních žláz v těle. Glukokortikoidy mají celou řadu účinků, které jsou zahajovány vazbou na kortikosteroidní receptory. Ty jsou četně umístěné ve většině tkání včetně specifických struktur mozku. Jak silná bude biologická odpověď glukokortikoidů na přichodící stimul, závisí nejen na jejich plazmatické koncentraci, ale i na aktivitě lokálního intracelulárního metabolismu. Glukokortikoidy se mohou vázat na receptory pouze v přítomnosti hydroxylové skupiny na 11. uhlíku (Harris et al., 2001). V cytozolu řady buněk proto najdeme enzym, který má schopnost neaktivní formy glukokortikoidů (u člověka kortizon, u potkanů 11-dehydrokortikosteron) měnit na aktivní (u člověka kortizol, u potkanů kortikosteron). Jedná se o 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázu typu 1 (11 $\beta$ -HSD1). Koncentrace těchto aktivních forem glukokortikoidů musí být udržována již od prenatálního vývoje ve správném fyziologickém rozmezí (Shoener et al., 2005). Pokud je hladina zvýšena působením chronického stresu, nebo naopak snížena například nedostatečnou aktivitou glukokortikoidy metabolizujícího enzymu, dochází k projevům řady onemocnění. V dnešní době je pozornost zaměřena zejména na účinek glukokortikoidů na učení a paměť. Stresem zvýšené hladiny glukokortikoidů mohou ovlivnit funkci nervových buněk, synaptických receptorů či iontových kanálů (Maggio & Segal, 2010). Právě tímto způsobem pak může stres měnit procesy učení a paměti. Oblast mozku, která zodpovídá za zapamatování si nových informací, je hippokampus. Hippokampus obsahuje vysoké hladiny obou kortikosteroidních receptorů (de Kloet et al., 2000), jeho činnost je regulována kromě glukokortikoidů i ostatními hormony HPA osy jako například kortikotropin-uvolňujícím hormonem (Chalmers et al., 1995), navíc exprimuje enzym 11 $\beta$ -HSD1, má četné spoje s limbickým systémem (Segal et al., 2010), s PVN (Maggio & Segal, 2009) a sám ovlivňuje činnost stresové dráhy. Z těchto údajů je patrné, že je hippokampus se stresovou dráhou úzce spojený. Objasnit, do jaké míry je činnost hippokampu ovlivňována stresem zvýšenými hladinami glukokortikoidů, je cílem současných studií.

#### 3.1. OSA HYPOTHALAMUS-HYPOFÝZA-NADLEDVINY

Osa hypothalamus-hypofýza-nadledviny neboli HPA (z angl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*) osa je hlavní neuroendokrinní systém organismu zajišťující adaptaci na změny (Abelson et al., 2007). Jedná se o velmi důležitou dráhu, která řídí obsáhlou škálu procesů – reaguje na jakýkoliv stresový podnět, má vliv na příjem, skladování a výdej energie, spoluvytváří emoce, nálady, má vliv na imunitní systém, je důležitá pro rozmnožování, pro sexualitu, a řadu dalších procesů. Funkce HPA osy vyplývá z propojení přímými a zpětnými interakcemi mezi hypothalamem, hypofýzou a nadledvinami a faktem, že spojuje všechny tři život-udržující systémy v těle – nervovou, endokrinní a imunitní soustavu. Tyto systémy mají shodné ligandy (neuropeptidy, steroidy, cytokiny, neurotransmitery) a receptory, pomocí kterých se mohou vzájemně ovlivňovat (Chesnokova & Melmed, 2002). Mechanismy, které regulují míru jejich interakce, se vyskytují na několika úrovních, všechny jsou důležité pro zachování správné funkce orgánů a k udržování homeostáze (Chesnokova & Melmed, 2002). Souhra těchto soustav může být narušena stresovými podněty. Na ty HPA osa reaguje jednak změnou aktivity imunitního systému, díky čemuž se na jedinci může stres podepsat poruchou imunity (Besedovsky & del Rey, 2011), ale zejména nastartováním produkce glukokortikoidů v kůře nadledvin. Samotné glukokortikoidy a jejich nízko- a vysoko-afinní receptory pak zpětnovazebně ovlivňují její činnost (Reul et al., 2000). Z tohoto důvodu je HPA osa často označovaná jako stresová dráha. Reaguje na stresové stimuly a vytváří adekvátní odpověď, která zajistí udržení stálého vnitřního prostředí organismu. Stres můžeme charakterizovat jako stav organismu, který nastane po jakékoliv výrazněji působící zátěži, ať fyzické či psychické. Stres je impulzem k aktivaci obranných mechanismů. Nemusí být proto nutně synonymem něčeho špatného a nechtěného. Stres je důležitý pro přežívání. Pokud je stres krátkodobý, může vést k vyšším fyzickým a psychickým výkonům a motivovat nás. Ovšem vzhledem k dnešní době, kdy je celá společnost zaměřena na výkon, trpí lidé účinky stresu chronického. Vystavování se náročným situacím způsobuje řadu psychických a fyziologických změn, které se projevují neklidem, náladovostí, podrážděností, zaživačnými problémy, nespavostí, a řadou dalších. Pokud je působení stresu dlouhodobé, často vede k úzkostnému nebo depresivnímu chování a může vyvolávat různé zdravotní potíže. Proto studie, které se zabývají aplikováním chronického stresu na zvířecí modely, nejčastěji potkany či myši, mohou poskytnout důležité informace o faktorech, které HPA osu ovlivňují a vedou ke vzniku daných onemocnění.

### 3.1.1. Stresová dráha

Na molekulární úrovni je stres spojen se zvyšujícími se hladinami glukokortikoidů v krvi. Tomuto zvýšení předchází aktivace stres-senzitivních oblastí paraventriculárního jádra hypothalamu (PVN). PVN obsahuje jednak senzory reagující na změnu vnitřního prostředí a zároveň neuroendokrinní neurony, které na vyvolanou změnu odpovídají (Wamsteeker Cusulin et al., 2013). Tyto tzv. parvocelulární neurosekreční buňky produkují na podnět kardiovaskulárních, respiračních či viscerálních stimulů dva peptidy – vasopresin (AVP) a kortikotropin-uvolňující hormon (CRH) (Aguilera, 1998). AVP a CRH jsou hypothalamo-hypofyzárním traktem přenášeny do předního laloku hypofýzy, kde ovlivňují produkci adrenokortikotropního hormonu (ACTH) (Aguilera, 1998). ACTH po uvolnění do cirkulace aktivuje tvorbu a uvolňování glukokortikoidů z kůry nadledvin. Glukokortikoidy mají v těle rozsáhlé množství účinků – regulují metabolické a homeostatické procesy (Harris et al., 2001), jsou esenciální pro správnou činnost HPA osy, mají vliv na vývoj mozku (Wyrwoll et al., 2011), mají protizánětlivý a protialergický účinek (Ganong, 2005), jsou důležité pro správné fungování CNS (Wyrwoll et al., 2011), jsou důležité pro učení a paměť (Liston et al., 2013; Lozano et al., 2013; Yau & Seckl, 2012), mají vliv na činnost iontových kanálů (O'Regan et al., 2001), aktivují katecholaminy k mobilizaci energie (Ganong, 2005), a řadu dalších. Velmi důležitá funkce glukokortikoidů je i zpětnovazebné zastavení činnosti HPA osy. Glukokortikoidy inhibují tvorbu CRH a AVP, což způsobí ukončení štěpení prekursoru ACTH proopiomelanokortinu (POMC). Snížení hladiny ACTH v krvi následně zastavuje tvorbu glukokortikoidů a organismus je připraven reagovat na další podněty.



Obr. 1.

Schématické znázornění HPA osy. Hypothalamus produkuje v závislosti na řadě různých stimulů kortikotropin-uvolňující hormon (CRH), který v hypofýze aktivuje štěpení proopiomelanokortinu (POMC), jehož produktem je mimo jiné i adrenokortikotropní hormon (ACTH), který následně v nadledvinách spouští syntézu a uvolňování glukokortikoidů – u potkana především kortikosteronu, u člověka kortizolu. Ty následně negativní zpětnou vazbou ovlivňují činnost některých mozkových struktur. Na stres v první řadě reaguje sympatický nervový systém, který stimuluje uvolňování adrenalinu či noradrenalinu z dřeně nadledvin. (LC – locus coeruleus)

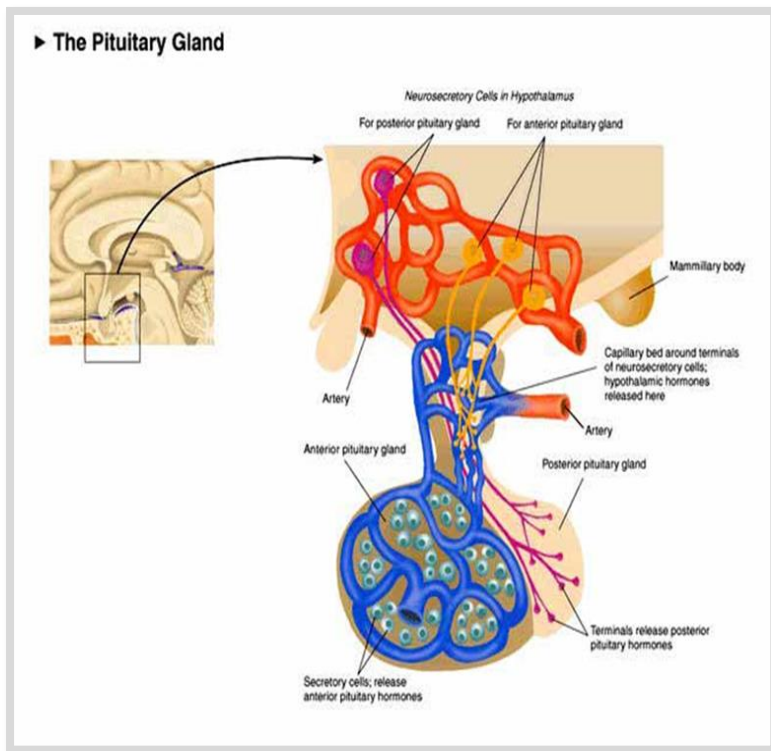
Zdroj: [http://highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/0071402357/156720/figure321\\_3.html](http://highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/0071402357/156720/figure321_3.html)

### 3.1.2. Propojení HPA osy

Pro celou dráhu je velmi důležité propojení hypothalamu s hypofýzou, které je dvojího typu. S předním lalokem hypofýzy, tzv. adenohypofýzou je hypothalamus spojen prostřednictvím cév. Spojení se zadním lalokem hypofýzy neboli neurohypofýzou je umožněno svazkem nervových vláken. Propojení těchto dvou orgánů můžeme vidět na obrázku č. 2.

Přímé cévní propojení mezi hypothalamem a předním lalokem hypofýzy je portálního charakteru. Systém začíná i končí kapilárami, aniž by přitom krev prošla srdcem. Cévy primární kapilární pleteně hypothalamu procházejí tzv. infundibulem neboli stopkou hypofýzy a vytvářejí v předním laloku sekundární pletěň kapilár. Krev přicházející z hypothalamu je obohacena o hypothalamické hormony, které v adenohypofýze stimulují nebo inhibují sekreci hypofyzárních hormonů. Za místo vzniku tohoto portálního systému se považuje oblast označovaná jako *eminetia mediana*, která leží v předním hypothalamu (Ganong, 2005). Jedná se o mozkovou oblast, která patří mezi tzv. cirkumventrikulární orgány, tedy orgány, které leží mimo hematoencefalickou bariéru.

Nervové propojení mezi hypothalamem a neurohypofýzou se označuje jako tzv. hypothalamo-hypofyzární trakt, který slouží pro transport oxytocinu a vasopresinu do hypofýzy (Herman et al., 2012). Trakt začíná v hypothalamu v jádrech nc. supraopticus a nc. paraventricularis. Nemyelinizované nervové výběžky procházejí infundibulem do hypofýzy, kde jejich axonální zakončení tvoří podstatný objem zadního laloku. Neurohypofýza patří taktéž mezi cirkumventrikulární neboli paraventriculární, orgány. Tyto oblasti mozku se v porovnání s běžnými kapilárami CNS vyznačují odlišnou strukturou. Jsou fenestrovány, jejich endotelové buňky jsou propojeny pomocí „gap junctions“ (vodivých spojů) a obsahují mnoho transportních vezikulů. Umožňují tak přestup hormonů z krve a zároveň neurosekreci. Zadní lalok hypofýzy slouží k vyplavování hypothalamických hormonů AVP a oxytocinu do krve. Tyto peptidy vznikají v těle hypothalamických neuronů a pomocí axonálního transportu jsou po navázání na neurofyzin transportovány do zadního laloku, odkud jsou většinou ihned vyplavovány do krve, popřípadě mohou být skladovány ve formě tzv. Herringových tělísek (Ganong, 2005). Propojení hypofýzy a nadledvin je umožněno oběhovou soustavou. Všechny hormony hypofýzy jsou vyplavovány do krve, která je přenáší do nadledvin.



Obr. 2.

Propojení mezi hypothalamem a hypofýzou je dvojího charakteru – cévní a neurální. Součástí hypothalamu je primární kapilární pleteň, která se v adenohypofýze napojuje na sekundární neurální pleteň. Dohromady tak vytvářejí pravý portální oběh. Neurální propojení vychází z paraventriculárního a supraoptického jádra hypothalamu. Axony jejich neuronů končí v neurohypofýze.

Zdroj:

<http://group14.pbworks.com/w/page/16025094/PITUITARY-GIGANTISM>

### 3.1.3. Hypothalamus

Hypothalamus je poměrně malou mozkovou oblastí nacházející se v přední části mezimozku. Leží pod *sulcus hypothalamicus*, který ho odděluje od thalamu a zároveň těsně nad mozkovým kmenem (Čihák et al., 2004). Jedná se o velmi komplexní mozkovou oblast, jejíž šedá hmota je seskupena do jader a okrsků. Jádra (*nuclei*) jsou tvořena buňkami jednoho typu, které jsou vedle sebe hustě uspořádané a dobře ohraničené. Okrsky (*areae*) jsou tvořeny naopak více buněčnými typy, které nemají ostré ohraničení vůči svému okolí a mají řídké uspořádání.

Celý hypothalamus je předožadně uspořádaný do tří podélných pruhů a tvoří periventriculární, mediální a laterální zónu. V příčném dělení se rozlišuje: přední hypothalamus (*regio hypothalamica anterior*) – obsahující preoptická jádra, *nuclei praeoptici medialis a lateralis*, dále *nucleus suprachiasmaticus*, *nucleus supraopticus*, *nucleus paraventricularis*, *nucleus hypothalamicus anterior*; střední hypothalamus (*regio hypothalamica media*) – obsahuje jádra *nucleus arcuatus*, *nuclei tuberales*, *nucleus hypothalamicus ventromedialis*, *nucleus hypothalamicus dorsomedialis*, *nucleus*

*hypothalamicus dorsalis*, *nucleus hypothalamicus paraventricularis posterior*, *nucleus infundibularis*; zadní hypothalamus (*regio hypothalamica posterior*) – obsahuje jádra mamilárních těl, *nuclei corporis mamillaris mediales a laterales*, *nucleus hypothalamicus posterior*; a dorzální hypothalamus (*regio hypothalamica dorsalis*) - tvořený pouze jedním jádrem, *nucleus ansae lenticularis* (Čihák et al., 2004). Některá jádra fungují jako nadřazené centrum pro autonomní nervovou soustavu, jiná mají neuroendokrinní funkce, některá tvoří a přenáší hormony zadního laloku hypofýzy, jiná jsou velmi důležitá pro propojení s limbickým systémem, pro čich, další hrají roli například při udržování cirkadiánních rytmů. Neurosekreční neurony hypothalamu produkují různé peptidy a katecholaminy, které jsou uvolňovány do krevního oběhu a působí jako hormony. Některé z nich jsou vyplavovány do systémového oběhu a ovlivňují tak vzdálené cílové tkáně. Jiné se uvolňují do portálních cév a ovlivňují činnost adenohipofýzy. Většina hypothalamických hormonů je peptidového charakteru, výjimku tvoří dopamin, který patří mezi katecholaminy. Všechny hypothalamické hormony jsou shrnuty v tabulce 1.

Tab. 1. Přehled hypothalamem produkováných hormonů. Zdroj: [en.wikipedia.org/wiki/Hypothalamus](http://en.wikipedia.org/wiki/Hypothalamus)

Hypothalamický hormon	Vznik	Efekt
<b>Thyreoliberin</b> (Thyreotropin uvolňující hormon) (TRH)	Parvocelulární sekreční neurony	Stimuluje uvolňování thyreotropinu (TSH) z předního laloku hypofýzy.  Stimuluje uvolňování prolaktinu z předního laloku hypofýzy.
<b>Dopamin</b> (Prolaktin inhibující hormon) (DA)	Dopaminní neurony nc. arcuate	Inhibuje uvolňování prolaktinu z předního laloku hypofýzy.
<b>Růstový hormon – uvolňující hormon</b> (GHRH)	Neuroendokrinní neurony nc. arcuate	Stimuluje uvolňování růstového hormonu z předního laloku hypofýzy.



<b>Somatostatin</b> (růstový inhibující hormon) (SS)	Neuroendokrinní buňky periventrikulárního jádra	Inhibuje uvolňování růstového faktoru z předního laloku hypofýzy. Inhibuje uvolňování TSH z předního laloku hypofýzy.
<b>Gonadotropin uvolňující hormon</b> (GnRH)	Neuroendokrinní buňky preoptické oblasti	Stimuluje uvolňování folikuly-stimulujícího hormonu (FSH) z předního laloku hypofýzy. Stimuluje uvolňování luteinizačního hormonu (LH) z předního laloku hypofýzy.
<b>Kortikotropin uvolňující hormon</b> (CRH, CRF)	Parvocelulární neurosekreční neurony	Stimuluje uvolňování adrenokortikotropního hormonu (ACTH) z předního laloku hypofýzy.
<b>Oxytocin</b>	Magnocelulární neurosekreční buňky	Kontrakce močového měchýře, laktace.
<b>Vasopresin</b> (antidiuretický hormon) (ADH, AVP)	Magnocelulární neurosekreční buňky	Zvyšuje permeabilitu vody v buňkách distálních tubulů a sběrného kanálku ledvin, čímž zvyšuje resorpci vody a produkci koncentrované moči.

### 3.1.3.1. Paraventriculární jádro

Jedná se o jádro hypothalamu, jehož úlohou je reagovat na stresové a fyziologické změny organismu. Své jméno jádro získalo podle umístění – „para-ventrikulární“ znamená „vedle komory“. Přiléhá totiž ke třetí mozkové komoře. Jedná se o vysoce prokrvenou oblast, která je chráněna hematoencefalickou bariérou. Výjimku tvoří neurony procházející skrze *eminentia mediana* a tvořící neurohypofýzu. Součástí PVN jsou dva základní typy neuronů – magnocelulární neurosekreční buňky a parvocelulární neurosekreční buňky. Magnocelulární

neurony jsou neurony produkující AVP a oxytocin (Teruyama et al., 2012). Kromě PVN najdeme tyto neurony v supraoptickém jádře (Teruyama et al., 2012). Neurony parvocelulární mají své zakončení v oblasti *eminetia mediana*, kde také vylučují své hormony do primárního kapilárního plexu, odkud jsou přenášeny do adenohipofýzy. Parvocelulární buňky produkují CRH a AVP, které společně regulují vylučování ACTH (Polito et al., 2011). Vstupy do PVN přicházejí z mnoha oblastí mozku. Pro příklad, vstupy z hippocampu jsou důležité pro regulaci stresové reakce (Wamstecker et al., 2013), vstupy ze suprachiasmatického jádra nesou informace o světle a cirkadiálních rytmech (Wong & Schumann, 2012), vstupy z *nc. arcuatu* nesou informace o kardiiovaskulárním systému (Sapru, 2013).

### 3.1.3.2. Kortikotropin-uvolňující hormon

CRH („corticotropin-releasing hormone“) je neuropeptid s 41 aminokyselinami, který zodpovídá za endokrinní, autokrinní, imunologické a behaviorální reakce savců na stres. Spolu s peptidy označovanými jako urokortiny (UCN-1, UCN-2, UCN-3) patří CRH do společné rodiny proteinů, které sdílí 18 - 43 % sekvenční homologie (Laryea et al., 2012). CRH je tvořen zejména parvocelulárními neurosekrečními buňkami PVN, ale jisté hladiny CRH mRNA najdeme i v amygdale, stria terminalis a v hippocampu (Laryea et al., 2012). V periferních tkáních je exprimován například v placentě (Thomson, 2012), imunitních buňkách (Baker et al., 2003), kardiiovaskulárním systému (Szczepanska-Sadowska et al., 2010) či reprodukčních orgánech (Makrigiannakis et al., 2004). CRH se může v těle vázat na 2 typy receptorů – CRH receptor typu 1 (CRH-R1) a CRH receptor typu 2 (CRH-R2). CRH receptory jsou 7x membránou procházející proteinové struktury spřažené s trimerními G-proteiny. Vazba CRH na receptor vyvolá konformační změnu, která aktivuje  $G_{\alpha_s}$  podjednotku.  $G_{\alpha_s}$  stimuluje adenylyát cyklázu a cAMP aktivuje proteinkinázu A (PKA) (Lovenberg et al., 1995). Činnost PKA v buňce pak závisí na lokalizaci a sestřihové variantě receptoru (Laryea et al., 2012). V mozku je činnost CRH v extrahypothalamických strukturách spojena s neuromodulací (Laryea et al., 2012). Proto jsou tyto receptory hojně zkoumány ve spojitosti s depresemi a úzkostmi. CRH-R1 a CRH-R2 mají přibližně ze 70 % stejné nukleotidové složení (Chalmers et al., 1995), přesto se výrazně liší svojí lokalizací a afinitou k CRH. CRH-R1 má vyšší afinitu k CRH a je hlavním receptorem ovlivňujícím

činnost HPA osy při stresové reakci (Laryea et al., 2012). Antagonistou CRH-R1 je antalarmin, který se často používá k objasnění role CRH při stresu, zánětu či reprodukci (Kalantaridou et al., 2004). V poslední době byl využíván CRH-R1 i pro výzkum narkomanie a alkoholismu. Na základě pre-klinických studií se předpokládalo, že by malé molekuly antagonistů CRH-R1 mohly omezit vyvolání či recidivu narkomanie. Contoreggi et al. (2013) ovšem pomocí neuropsychiatrických klinických pokusů zjistil, že antagonisté CRH-R1 vykazují smíšenou účinnost a jejich využití při léčbě pacientů tedy není vhodné. CRH-R1 může kromě CRH vázat i UCN-1, s tím že všechny tři typy urokortinů (UCN-1, UCN-2 a UCN-3) se váží na CRH-R2 (Reyes et al., 2001).

CRH má značný vliv na funkci imunitního systému. Imunitu ovlivňuje jednak nepřímo, aktivací globální stresové reakce, jednak přímo skrze lokální působení zánětlivé odpovědi. Stres má obecně imunosupresivní a protizánětlivý efekt. Ovšem pokud se zaměříme na jeho vliv podrobněji, zjistíme, že spíše způsobuje rozsáhlé změny v činnosti imunitního systému. V některých případech totiž může stres naopak vyvolat přehnanou reakci prvků imunitní/zánětlivé odezvy. Stresem aktivované vylití CRH z hypothalamu vede k systematické sekreci glukokortikoidů. Tyto koncové produkty stresové reakce následně působí na činnost imunitních/zánětlivých pochodů. Imunitní buňky produkují zejména tumor-nekrotizující faktor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 a IL-6, které zpětně stimulují sekreci CRH (Beishuizen & Thijs, 2003). V jiných případech mohou glukokortikoidy a katecholaminy selektivně potlačit buněčnou imunitu a naopak upřednostnit humorální imunitní reakci (Elenkov et al., 1999).

Zvýšená produkce CRH byla pozorována v souvislosti s Alzheimerovou chorobou a depresí (Raadsheer et al., 1995). Vysoké hladiny CRH byly nalezeny u lidí, kteří spáchali sebevraždu (Austin et al., 2003). K rapidnímu zvýšení hladin CRH v krvi dochází také v krevním oběhu matky během těhotenství (Makrigiannakis et al., 2004). Jeho koncentrace mohou dosáhnout až desetitisícového násobku oproti negavidním ženám (Thomson, 2012). Tato vysoká množství CRH jsou produkována placentou. V průběhu těhotenství proto ztrácí hypofýza matky citlivost k CRH, aby nedocházelo k neúměrnému uvolňování ACTH, resp. následně i glukokortikoidů. Po porodu se senzitivita obnovuje. Tento přeskok z nečinnosti k opětovné produkci ACTH může být důvodem vzniku poporodních depresí (Thomson, 2012). Důvod nadprodukce CRH gravidních žen byl odhalen teprve nedávno. Bylo zjištěno, že CRH v placentální tkáni ovlivňuje glukózové transportní proteiny (GLUT), a tak pravděpodobně existuje souvislost mezi CRH a růstem plodu (Thomson, 2012). Fahlbusch et al. (2012)

dokládá, že CRH zvyšuje v placentě expresi leptinu a  $11\beta$ -HSD2, což může taktéž podporovat výživu plodu a ovlivňovat metabolismus glukokortikoidů. Dle Makrigiannakis et al. (2004) se CRH taktéž podílí na implantaci blastocysty. Důkazy nasvědčují tomu, že CRH ovlivňuje i načasování porodu. CRH reguluje signalizační systémy, které kontrolují kontraktilitu hladké svaloviny děložní stěny. V placentě stimuluje produkci CRH kortizol, a to aktivací jaderného faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B) (Thomson, 2012). NF- $\kappa$ B může být taktéž aktivován stresory jako je hypoxie či infekce. Z tohoto důvodu může nitroděložní stres vyvolat předčasný porod, způsobovat nízké porodní váhy novorozenců a i celoživotní zdravotní problémy (Thomson, 2012). Naději pro snížení počtu předčasných porodů přináší léčba pomocí CRH antagonistů.

### **3.1.4. Hypofýza**

Hypofýza neboli podvěsek mozkový je komplexní endokrinní žláza, která je do velké míry nadřazena ostatním žlázám s vnitřní sekrecí. Je tvořena jednak glandulárními buňkami, které produkují hormony a také konci axonů hypothalamických neuronů. Hypofýza se skládá ze tří víceméně oddělených endokrinních částí – předního, středního a zadního laloku. V mozku je uložena v tzv. tureckém sedle, které je součástí klínové kosti nacházející se na bázi lebky. Její činnost je ovládána hypothalamem, se kterým je spojena infundibulem. Střední lalok hypofýzy je u člověka do velké míry zakrnělý. Přesto produkuje hormony stimulující melanocyty (MSH), které aktivují produkci melaninu v kožních melanocytech a  $\gamma$ -lipotropin.

#### **3.1.4.1. Adenohypofýza**

Adenohypofýza je přední lalok hypofýzy. Má ektodermální původ. Zakládá se z tzv. Rathkeho váčku, který vzniká z epitelální vrstvy nacházející se kolem ústního otvoru (Cho et al., 2013). Během vývoje pak adenohypofýza spojení s ústním otvorem ztrácí a naopak se propojuje s hypothalamem. Správné propojení je velmi důležité pro další činnost adenohypofýzy. Díky portálním cévám jsou z hypothalamu do hypofýzy přinášeny tzv. statiny a liberiny, které stimulují nebo naopak inhibují aktivitu jednotlivých buněk.

Buňky předního laloku hypofýzy se dělí podle afinity k histologickým barvivům na základní dva druhy: chromofilní a chromofóbní. Chromofilní buňky se barví, obsahují granula a můžeme je dále rozdělit na pět podtypů: somatotropy, laktotropy, kortikotropy, thyrotropy a gonadotropy. Somatotropy secernují růstový faktor, laktotropy prolaktin, kortikotropy proopiomelanokortin, thyrotropy thyreotropin a gonadotropy folikulostimulující hormon a luteotropin (všechny hormony adenohypofýzy a jejich účinky jsou shrnuty v tabulce č. 2). Chromofóbní buňky se téměř vůbec nebarví a nemají cytosolická granula. Tyto buňky se označují jako folikulostelární a pravděpodobně slouží k produkci růstových faktorů a cytokinů, například IL-6 (Devnath & Inoue, 2008).

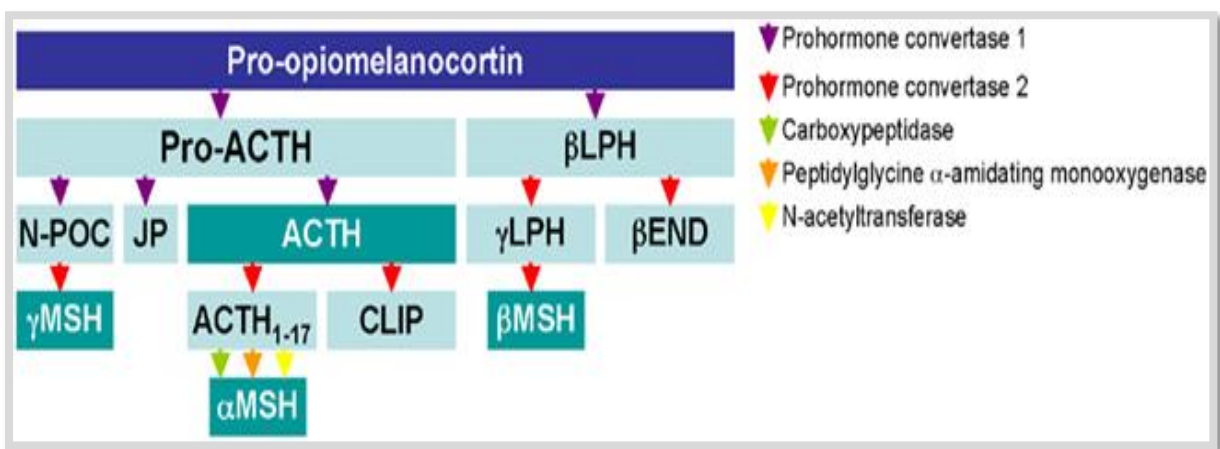
Tab. 2. Hlavní účinky adenohypofyzárních hormonů. Zdroj: Ganong, 2005

Název a zdroj	Hlavní účinky
<b>Přední lalok</b>	
Hormon stimulující thyroideu (TSH, thyreotropin)	Stimulace sekrece a růstu štítné žlázy.
Adrenokortikotropní hormon (ACTH, kortikotropin)	Stimulace sekrece a růstu zona glomerulosa a zona reticularis kůry nadledvin.
Růstový hormon (GH, somatotropin STH)	Zrychluje tělesný růst, stimuluje sekreci IGF-1.
Hormon stimulující folikuly (FSH)	Stimuluje růst ovariálních folikulů u samic a spermatogenezi u samců.
Luteinizační hormon (LH)	Stimuluje ovulaci a luteinizaci u samic a sekreci testosteronu u samců.
Prolaktin (PRL)	Stimuluje sekreci mléka a mateřské chování.
$\beta$ -lipotropin ( $\beta$ -LPH)	Stimuluje melanocyty k produkci melaninu.
Hormon stimulující melanocyty $\gamma$ ( $\gamma$ -MSH)	Stimuluje melanocyty k produkci melaninu.

### 3.1.4.2. Adrenokortikotropní hormon (ACTH)

ACTH je produktem kortikotropů předního laloku hypofýzy. Jedná se o 39 aminokyselin dlouhý peptid, u lidí o velikosti přibližně 4,5 kDa. Vzniká štěpením prekurzoru pre-proopiomelanokortinu (pre-POMC), který je složen z 285 aminokyselinových zbytků. Odstraněním signální peptidové sekvence o velikosti 44 aminokyselin během translace vzniká POMC. Velikost POMC činí 241 aminokyselin a slouží jako prekurzor pro řadu biologicky aktivních látek. Je tvořen nejen v adenohypofýze, ale i ve středním laloku hypofýzy. POMC

podstupuje rozsáhlé tkáňově-specifické posttranslační úpravy. V adenohipofýze najdeme v rámci kortikotropů štěpící enzymy, které fungují celkem ve čtyřech štěpících oblastech. Činností těchto hormonů (prohormonálních konvertáz) vznikají ACTH a  $\beta$ -lipotropin. Ovšem na POMC najdeme celkem osm možných štěpících oblastí, záleží pouze na tkáňové lokalizaci a přítomnosti specifických konvertáz (Patel et al., 2011). POMC tedy potenciálně slouží pro vznik všech těchto hormonů: ACTH,  $\beta$ -lipotropinu ( $\beta$ -LPH),  $\gamma$ -melanotropinu ( $\gamma$ -MSH),  $\alpha$ -melanotropinu ( $\alpha$ -MSH),  $\beta$ -melanotropinu ( $\beta$ -MSH),  $\beta$ -endorfinu, kortikotropinu-podobnému peptidu intermediálního laloku (CLIP),  $\gamma$ -lipotropinu ( $\gamma$ -LPH), metenkefalinu a N-terminálnímu peptidu POMC (NPP), viz Obr. 3.



Obr. 3. Biologicky aktivní produkty POMC, včetně štěpících enzymů. Zdroj: Patel et al., 2011

ACTH po vyplavení do krve účinkuje v nadledvinách, kde se váže na své receptory. Jedná se o povrchové buněčné receptory, které 7x procházejí membránou a jsou spojené s trimerními G-proteiny. Signální kaskáda po navázání ACTH na receptor vede přes G-protein k aktivaci adenylyl-cyklázy, která produkuje cAMP, které následně aktivuje PKA. ACTH ovlivňuje steroidogenezi krátkodobými mechanismy, které se uskuteční během několika minut, i pomalejšími a zároveň dlouhodobějšími reakcemi. Rychlé ovlivnění spočívá v aktivaci a přesunu cholesterolu do mitochondrií, kde je přítomen enzym P450<sub>ssc</sub>, který umožňuje štěpení postranního řetězce cholesterolu. ACTH umožňuje kortikálním buňkám nadledvin mimo jiné i zvýšené vychytávání lipoproteinů (Yaguchi et al., 1998). Pomalé ovlivnění steroidogeneze spočívá ve změně genové exprese. Zahajuje se zvýšená tvorba steroidů a také podjednotek mitochondriálních proteinových komplexů. Potřeba vyššího doplňování proteinů oxidační fosforylace jenom dokládá energetickou náročnost tvorby steroidních látek.

Hladiny ACTH se mohou měnit při řadě onemocnění. Při tzv. Addisonově chorobě, primární adrenální nedostatečnosti, dochází k chronickému snížení produkce kortizolu nadledvinami (Sarkar et al., 2012). Nemoc se začíná projevovat postupně, únavou, nechutenstvím, úbytkem hmotnosti. Snížení tvorby kortizolu se zaznamená většinou až při 90% poškození žlázy (Sarkar et al., 2012). Hypofýza na tuto skutečnost reaguje zvýšeným uvolňováním ACTH, jehož koncentrace v krvi se rapidně zvyšují. Hladiny ACTH jsou vysoké i při Cushingově chorobě spojené s tumorem hypofýzy (Bertagna & Guignat, 2013). Nízké koncentrace ACTH způsobují sekundární nedostatečnost nadledvin.

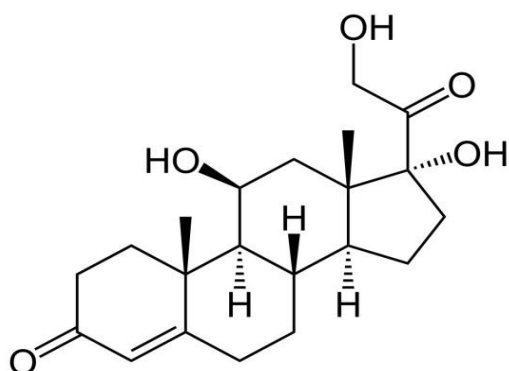
### **3.1.5. Nadledviny**

Nadledviny jsou párový orgán svrchu přiložený k ledvinám. Jedná se o kombinovanou endokrinní žlázu, kterou tvoří kůra nadledviny (mesodermálního původu) a dřeň nadledviny (neuroektodermálního původu) (Ganong, 2005). Dřeň obsahuje chromafilní granula s vysokým obsahem katecholaminů. A-buňky produkují adrenalin a N-buňky noradrenalin. Kromě adrenalinu a noradrenalinu tvoří dřeň nadledvin dopamin. Sekrece dřeně nadledvin je závislá na nervovém systému. Za běžného stavu je nízká. Zvyšuje se sympatickou aktivací vyvolanou stresovými situacemi. Tato aktivace připravuje organismus na „boj nebo útěk“. Kůra nadledviny představuje přes 70 % objemu celkového orgánu. Skládá se z epitelových buněk obklopených kapilárami. Buňky, vzhledem k produkci steroidů, jsou bohaté na endoplazmatické retikulum, mitochondrie a Golgiho aparát. V kůře se rozeznávají tři vrstvy - *zona glomerulosa*, produkující mineralokortikoidy, *zona fasciculata*, produkující glukokortikoidy a androgeny, a *zona reticularis*, taktéž produkující glukokortikoidy a androgeny.

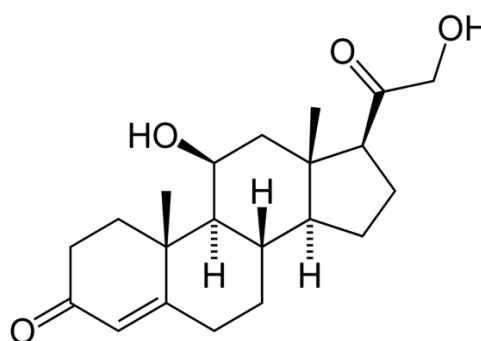
#### **3.1.5.1. Glukokortikoidy**

Glukokortikoidy patří mezi steroidní hormony, které se tvoří v nadledvinách převážně v *zona fasciculata*. Vzhledem k jejich lipofilnímu charakteru se tvoří až po aktivaci ACTH, nikdy ne do zásoby. Hlavním úkolem glukokortikoidů je reagovat na stresový podnět a eliminovat jeho účinky. Pro organismus je velmi důležité hladiny glukokortikoidů celoživotně

striktně regulovat. Pokud jsou narušeny například během embryonálního vývoje, dochází k poškození řady procesů, které se mohou během dospělosti projevit onemocněním (Wyrwoll, 2011). U obratlovců najdeme dva typy glukokortikoidů – kortizol a kortikosteron. Oba typy jsou exprimovány současně u všech živočichů, ale v odlišném poměru. Hlavním glukokortikoidem u člověka je kortizol (Obr. 4). U většiny hlodavců, ptáků a obojživelníků je to kortikosteron (Obr. 5). Hladiny těchto hormonů během dne kolísají. Vykazují cirkadiánní rytmus s nejvyššími hladinami v době před probuzením pro aktivaci organismu. U denních živočichů je to tedy v ranních hodinách, u nočních naopak.



Obr. 4. Struktura kortizonu.



Obr. 5. Struktura kortikosteronu.

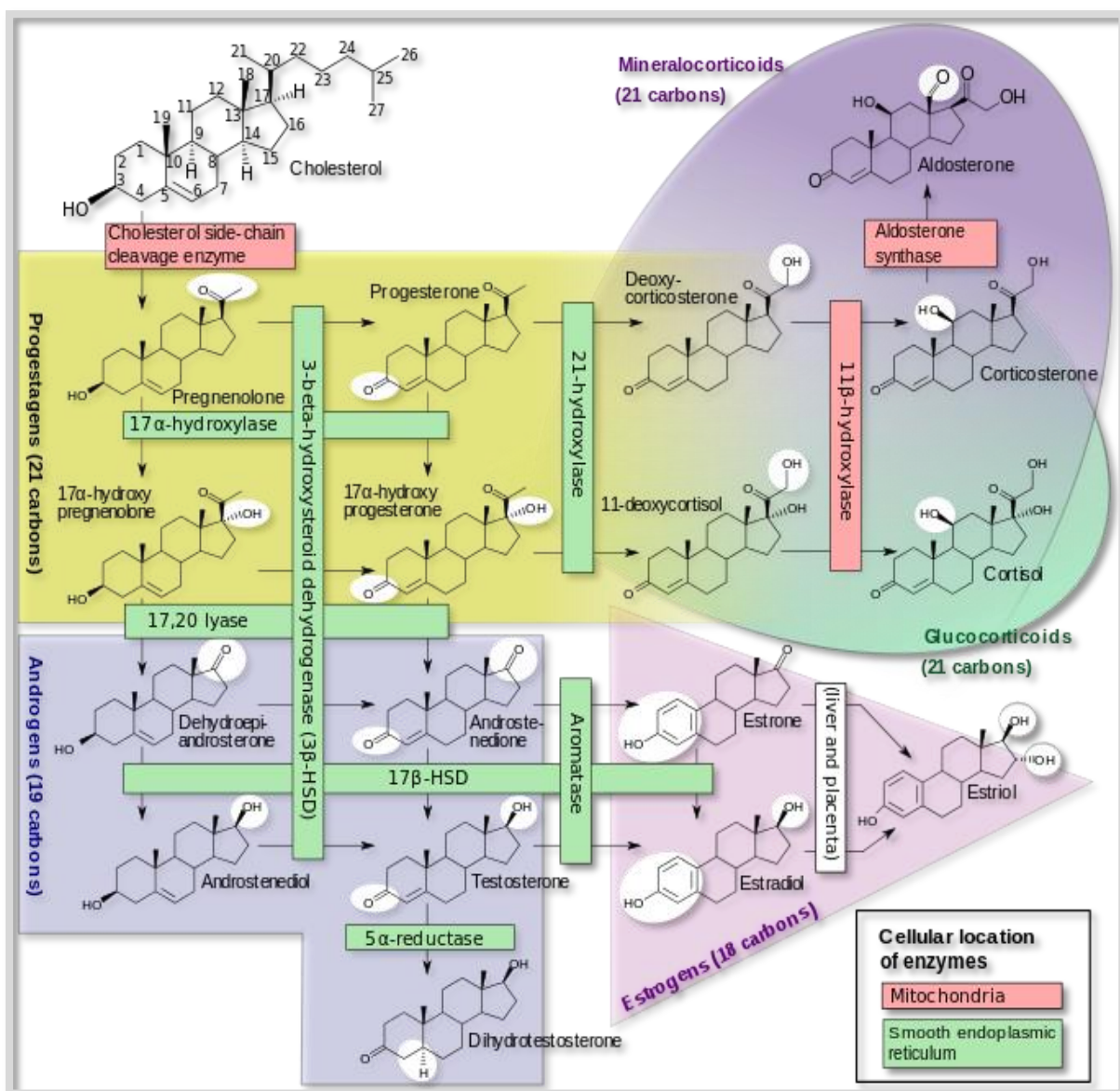
Glukokortikoidy jsou stejně jako všechny ostatní steroidní látky syntetizovány z cholesterolu. Cholesterol je v buňkách kůry nadledvin skladován v tukových kapénkách ve formě cholesteryl esterů. Jeho zásoby jsou neustále doplňovány prostřednictvím lipoproteinů. Na povrchu mají buňky velké množství LDL-receptorů, které díky internalizaci umožňují získat LDL částice včetně esterů cholesterolu. První krok syntézy začíná tedy přeměnou esteru na cholesterol. Reakci katalyzuje acyltransferáza, která přenáší acylovou skupinu cholesteryl esteru na CoA. Z cholesterolu je následně odštěpen jeho postranní řetězec. Odštěpení je katalyzováno enzymem P450<sub>ssc</sub>, tzv. „cholesterol-side-chain-cleavage“ enzymem. Jedná se o reakci určující rychlost a průběh celé syntézy glukokortikoidů. Produktem této první reakce je pregnenolon. Ten přechází z mitochondrií do endoplazmatického retikula, kde je hydroxylován na 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolon. Zde dochází k dalším několika reakcím, během kterých vzniká 11-deoxykortizol a deoxy-kortikosteron. Tyto dva meziprodukty se vrací zpět do mitochondrií a enzymem 11 $\beta$ -hydroxylázou z nich vznikají finální produkty – kortizol a kortikosteron (viz Obr. 6).



Po uvolnění glukokortikoidů z adrenokortikálních buněk do krve se navazují na krevní přenašeče. Je to zejména z důvodu jejich hydrofobního charakteru, který zamezuje jejich rozpuštění ve vodě, resp. v plazmě. Kortizol se nejpevněji a nejspecifičtěji navazuje na transkortin. Transkortin neboli globulin-vázající kortikosteroidy (CBG) vzniká v játrech a slouží k částečnému přenosu glukokortikoidů a progesteronu (Breuner & Orchinik, 2002). Kromě transkortinu se glukokortikoidy vážou na albumin, případně zůstávají volné. Všechny steroidní látky vázané na mobilní přenašeče jsou inaktivní (Breuner & Orchinik, 2002). V této podobě slouží jako zásobárna glukokortikoidů a zvyšují tak jejich biologický poločas. Protože se na CBG váže kortizol s vyšší afinitou než kortikosteron, má i delší poločas rozpadu, a to přibližně o 10 – 40 minut ( $T_{1/2}$  kortizolu je 60 – 90 minut,  $T_{1/2}$  kortikosteronu je 50 minut). Vytvářením steroidu z vazby s přenašečem v tkáních se stává glukokortikoid funkčním. Podle nových studií může CBG ovlivňovat místo, kde se glukokortikoid uvolní. Henley & Lightman (2011) informují o vysoké citlivosti CBG na fyziologické změny teploty v rámci krevního oběhu člověka. V mozkomíšním moku a hypothalamu může CBG zvyšovat uvolňování glukokortikoidů. CBG tedy nemusí působit pouze jako pasivní přenašeč, ale může aktivně regulovat uvolňování glukokortikoidů do oběhu. Podobně Chan et al. (2013) na tuto skutečnost upozorňují ve spojitosti s onemocněním, kdy horečka nebo zánět mohou uvolňování glukokortikoidu ovlivnit. Biologická odpověď glukokortikoidů závisí nejen na jejich plazmatické koncentraci, ale především na koncentraci intracelulární, která je určena aktivitou lokálního metabolismu glukokortikoidů. Aktivita glukokortikoidů závisí na přítomnosti hydroxylové skupiny na pozici C-11 steroidu. Kortizol a kortikosteron jsou aktivními steroidy, zatímco kortison a 11-dehydrokortikosteron mající na pozici C-11 keto skupinu jsou inaktivní (Harris et al., 2001). Existuje enzym, který má schopnost tyto dvě formy – aktivní a neaktivní vzájemně měnit, a tak ovládat lokální metabolismus glukokortikoidů. Jedná se o enzym 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázu (11HSD), které je věnovaná celá kapitola 3.2

Glukokortikoidy se váží na dva typy kortikosteroidních receptorů – receptory glukokortikoidní (GR) a mineralokortikoidní (MR), z nichž zejména GR jsou hojně exprimovány v mozku. GR a MR se vzájemně odlišují svou afinitou a velikostí vytvořené odpovědi na ligand (Oitzl et al., 2010). Obecně platí, že MR jsou hojně obsazovány již při nízkých hladinách kortikosteroidů v krvi. Například hippokampální MR vykazují až desetinásobně vyšší afinitu k ligandu než GR (de Kloet et al., 1998). Steroidy spolu s některými dalšími hydrofobními hormony (thyroidní hormony, vit. D) mají schopnost

procházet plazmatickými membránami. Proto se jejich receptory nacházejí v cytosolu a jádře, kde působí jako transkripční faktory závislé na vazbě ligandu. MR a GR obsahují téměř identické DNA-vázající domény, které rozpoznávají specifické DNA elementy v regulačních oblastech genů – tzv. GRE („glucocorticoid response element) oblasti (de Kloet et al., 2000). V neaktivním stavu jsou receptory v komplexu s „heat-shock“ proteiny (Hsp), vazba ligandu způsobí konformační změnu a přesun receptoru do jádra. V jádře dochází k dimerizaci receptoru do podoby homodimeru, popřípadě i heterodimeru (de Kloet et al., 2000). Řadou na sebe navazujících procesů se vytváří proteinový komplex, který zahajuje transkripci příslušného genu. Tento proces se označuje jako tzv. trans-aktivace. GR ovšem nemusí pouze aktivovat transkripci, ale naopak ji vazbou na DNA mohou potlačit. Takové oblasti pak označujeme jako negativní GRE (nGRE). nGRE působí způsobem tzv. trans/cis-represe. Transreprese je vyvolána aktivací jinými transkripčními faktory jako jsou např. AP-1 (aktivační protein 1), NF- $\kappa$ B (nukleární faktor  $\kappa$ B) nebo CREB („cAMP-responsive element binding protein“) (de Kloet et al., 2000). Cisreprese je děj, při kterém se GR vážou na určité geny, čímž zamezují vazbě některých dalších transkripčních faktorů. Dnes se předpokládá, že receptory pro steroidy nenajdeme pouze v cytosolu, ale že jsou běžně součástí plazmatických membrán a slouží pro non-genomovou odpověď buňky. Tato rychlá odpověď je pro buňku důležitá a podle změřených reakčních časů opravdu probíhá. Je ale otázkou, jakým způsobem jsou receptory k membráně kotveny a s jakými vnitřními signalizačními partnery jsou spojeny.



Obr. 6. Schéma metabolismu steroidních látek. Zdroj: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Steroidogenesis.svg>

### 3.1.6. Porovnání činnosti HPA osy u potkanů a myší

Při porovnávání aktivity HPA osy různých živočišných druhů nacházíme různé odlišnosti, což není příliš překvapující. Otázkou je, proč tyto rozdíly můžeme najít i v rámci jednoho druhu. Obecnou odpovědí může být vysvětlení, že každý jedinec je odlišně citlivý k neuropsychickým a metabolickým poškozením. Ovšem Carter et al. (2009), zkoumali inter-individuální rozdíly aktivity HPA osy u různých kmenů myší a došli k závěru, že tyto rozdíly jsou dány zejména genetickým pozadím. Porovnávali mezi sebou kmen 129/MF1 a C57Bl/6J,

kteře byly oba deficietní pro 11-HSD1 (129/MF1 HSD1<sup>-/-</sup> a C57BI/6J HSD1<sup>-/-</sup>). 129/MF1 HSD1<sup>-/-</sup> myši měly výrazně zvětšené nadledviny, pozměněnou aktivitu HPA osy a sníženou negativní zpětnou vazbu glukokortikoidů. Vzhledem k tomu měli i nestresovaní jedinci zvýšené hladiny kortikosteronu a ACTH v plazmě. U stresovaných jedinců následně docházelo k výrazně opožděnému návratu k původním hladinám těchto hormonů v krvi. Kdežto u C57BI/6J HSD1<sup>-/-</sup> myši se v plazmě nacházely normální hladiny kortikosteronu a ACTH. Zároveň u nich docházelo po stresové reakci k běžnému návratu obou hormonů do bazálních koncentrací. C57BI/6J HSD1<sup>-/-</sup> myši měly zvýšenou expresi glukokortikoidních receptorů (GR), a to v mozkových oblastech spojených s negativní zpětnou vazbou glukokortikoidů – v hipokampu a PVN. Tyto zvýšené koncentrace GR mají u C57BI/6J HSD1<sup>-/-</sup> myši pravděpodobně kompenzační úlohu a činnost HPA osy se tak výrazně nemění. Paterson et al. (2007) zjistili, že aktivita HPA osy lze u 11β-HSD1<sup>-/-</sup> myši normalizovat obnovením funkce 11β-HSD1 v játrech. Enzymová aktivita v klíčových oblastech mozku při tom obnovena není. Je ale otázkou, zda je tento efekt přímý či nepřímý, umožněný například nervovým propojením jater s hypothalamem, které bylo nedávno prokázáno (la Fleur et al., 2005). Podobné porovnání odlišné aktivity HPA osy můžeme provést i u dvou potkaních kmenů - potkanů kmene Fisher (F344) a Lewis (LEW). Potkani kmene Lewis mají činnost HPA osy sníženou (Wu & Wang, 2010), naopak potkani kmene Fisher mají HPA osu hyperaktivní (Wu & Wang, 2000). Hlavní příčinou snížené reaktivity HPA osy u kmene Lewis je pravděpodobně snížená biosyntéza CRH, která vede k poškození glukokortikoidní odpovědi (Chikada et al., 2000). Snížená aktivita glukokortikoidů je důvodem častých zánětlivých a autoimunitních onemocnění projevujících se u tohoto kmene. Dokládá to i skutečnost, že při podávání vyšších dávek glukokortikoidů onemocnění ustupují (Tonelli et al., 2001). LEW potkani mají navíc poškozený sympato-adrenální systém, při zvýšené glykémii u nich dochází k nadměrné produkci adrenalinu. Potkani kmene F344 jsou v tomto ohledu protikladem. Jsou velmi odolní vůči zánětlivým či autoimunitním onemocněním, avšak reagují přecitlivě na stres přicházející z vnějšího prostředí. F344 potkani jsou proto často využíváni jako model pro výzkum depresí. Zda je hyperaktivita HPA osy u tohoto kmene hlavním důvodem vzniku depresivních stavů ovšem není jisté (Wu & Wang, 2010).

### 3.2. 11 $\beta$ -HYDROXYSTEROIDDEHYDROGENÁZA

Roku 1953 Amelung a jeho kolegové ve Frankfurtu objevili neznámou enzymovou reakci, která ovlivňovala metabolismus glukokortikoidů. Ve svých pokusech používali látku poprvé izolovanou roku 1950 E. C. Kendallem, P. S. Henchem a T. Reichsteinem, tedy kortison (Draper et al., 2005). Zjistili, že po inkubaci kortisonu s homogenáty různých orgánů dochází k jeho přeměně na kortizol. Nejvyšší aktivitu přeměny našli v játrech a částečně v ledvinách a svalech (Wyrwoll et al., 2011). Enzym, který tuto reakci katalyzoval, označili jako 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázu (11 $\beta$ -HSD). Po řadě let, kdy nebyl tento enzym podrobněji zkoumán, se k němu navrátila pozornost díky MR. Postupně docházelo ke zjištění, že selektivita MR *in vivo* v ledvinách, není způsobena jeho selektivitou pro aldosteron, ale aktivitou 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázy. V ledvinách dochází díky přítomnosti tohoto enzymu k přeměně kortizolu na kortizon, který se k MR neváže (Draper et al., 2005). Díky tomu, je umožněn přístup aldosteronu, který není substrátem pro 11 $\beta$ -HSD. Tyto informace vedly k sérii dalších zkoumání kortikosteroidního systému a jeho pre-receptorového metabolismu. Zpočátku se předpokládalo, že 11 $\beta$ -HSD má dvojí aktivitu. Funguje jednak jako 11 $\beta$ -dehydrogenáza inaktivující glukokortikoidy, ale také jako 11-reduktáza, která naopak glukokortikoidy regeneruje. Ovšem roku 1993 došlo k izolaci nového enzymu, a to dvěma laboratořemi najednou. Tento enzym byl získán z lidské placenty a potkaních ledvin a podřýval „jedno-enzymovou“ hypotézu (Brown et al., 1993; Rusvai & Náray-Fejes-Tóth, 1993). Následnými experimenty byl objev nového enzymu potvrzen. Byl pojmenován jako 11 $\beta$ -HSD typu 2 (11 $\beta$ -HSD2). Po zjištění funkce a výskytu enzymu 11 $\beta$ -HSD2 bylo otázkou, jakou roli hraje 11 $\beta$ -HSD typu 1 exprimovaná v játrech a ledvinách potkanů. Odpověď přinesli Seckl a jeho kolegové, kteří aktivitu 11 $\beta$ -HSD1 zkoumali v intaktních buňkách a *in vivo*, nikoliv v homogenátech (Jamieson et al., 1995). 11 $\beta$ -HSD1 totiž *in vivo* přednostně funguje jako 11-reduktáza regenerující glukokortikoidy (Jamieson et al., 1995). Výsledkem těchto několika let bádání bylo objevení dvou forem 11 $\beta$ -HSD a zjištění, že tyto dva enzymy v organismu reagují většinou protichůdně, v závislosti na tkáňovém umístění a redoxním potenciálu (Holmes & Seckl, 2006). Oba dva enzymy jsou společně členy tzv. SDR („short-chain“ dehydrogenáza/reduktáza) enzymatické superrodiny. Přesto sdílejí pouze 21% sekvenční homologie, která se typicky nachází v místech konzervovaných oblastí (Draper & Stewart, 2005). Jedná se zejména o kofaktor-vázající region a katalytické místo. K vazbě kofaktoru slouží tzv. Rossmannův záhyb (( $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ )<sub>2</sub> motiv) nacházející se na

N-terminálním konci molekuly (Persson & Kallberg, 2013). V centru molekuly je konzervovaná sekvence Tyr-X-X-X-Lys. Tyrosin je u 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenáz esenciální pro enzymatickou aktivitu. Poměrně nízké procento sekvenční shody těchto dvou enzymů je dáno variabilitou v rámci rodiny a zejména faktem, že oba dva enzymy jsou odlišnými genovými produkty. Rozdíly mezi oběma enzymy jsou zaznamenány níže v tabulce (Tab. 3).

Tab. 3. Hlavní rozdíly mezi 11 $\beta$ -HSD1 a 11 $\beta$ -HSD2. Zdroj: Draper & Stewart, 2005

	11 $\beta$ -HSD1	11 $\beta$ -HSD2
<b>Chromozomální lokalizace</b>	1q32,2	16q22
<b>Velikost</b>	Gen: 30 kb, 6 exonů	Gen: 6,2 kb, 5 exonů
	Protein: 292 aa, 34 kDa	Protein: 405 aa, 44 kDa
<b>Enzymatická rodina</b>	SDR superrodina	SDR superrodina
<b>Tkáňová exprese</b>	Játra, plíce, gonády, hypofýza, mozek, tuková tkáň.	Ledviny, střevo, slinné žlázy, placenta.
<b>Enzymatická kinetika</b>	<i>In vitro</i> obousměrná, <i>in vivo</i> především reduktázová. Kofaktor NADPH.	Pouze dehydrogenázová. Kofaktor: NAD.
<b>Funkce</b>	Poskytuje kortisol pro GR.	Chrání MR před kortisolem.

Jak o enzymu získat co nejobsáhlejší množství informací? Největším přínosem je jeho vyřazení z funkce pomocí inhibitorů či genetických modifikací. Sledováním dopadu nefunkčnosti 11 $\beta$ -HSD na fyziologii organismu pak můžeme lépe pochopit jeho komplexní činnost. K těmto účelům se využívají nejčastěji inhibitory na bázi lékořice, obsahující přírodní zdroj kyseliny glycyrrhetinové, která je sama o sobě silným inhibitorem enzymu. Jedná se o nespecifický inhibitor inaktivující jak 11 $\beta$ -HSD1, tak 11 $\beta$ -HSD2 (Isbrucker & Burdock, 2006). Dnes je nejčastěji používaným inhibitorem karbenoxolon (CBX), také neselektivní inhibitor obou dvou enzymů (Seckl et al., 1993). Poměrně vysoké inhibiční účinky má 11-hydroxyprogesteron (Souness et al., 1995), lze použít i některé androgeny (Latif et al., 2005) a žlučové kyseliny (Morris et al., 2004). V nedávné době byla objevena látka přírodního původu, která inhibuje specificky pouze 11 $\beta$ -HSD1. Jedná se o 1,3,8-trihydroxy-6-metylanthrachinon neboli emodin izolovatelný z rebarbory (*Rheum cultorum*) (Feng et al.,

2010). Zároveň se vyvíjí řada syntetických inhibitorů, pro příklad monokarboxylové analogy kurkumy mezi kterými najdeme velmi specifické inhibitory 11 $\beta$ -HSD1 (Lin et al., 2013).

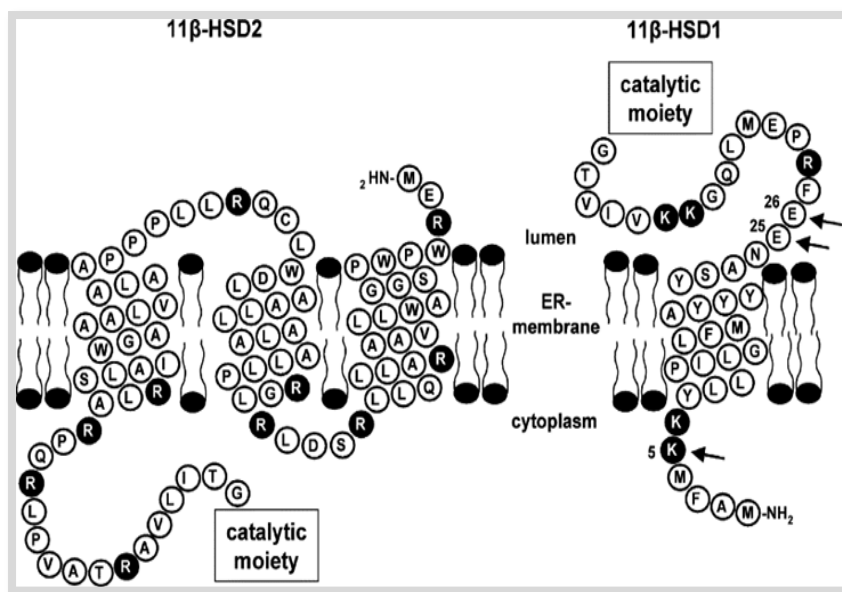
Další metodou, jak poodhalit činnost enzymu, je vytvoření geneticky upravených zvířecích modelů. Určit úlohu 11 $\beta$ -HSD1 *in vivo* se proto podařilo i díky transgenním myším, které měly pro tento enzym poškozený gen. U „wild-type“ (nepoškozených) a 11 $\beta$ -HSD1 deficientních myší (11 $\beta$ -HSD1<sup>-/-</sup>) Tomlinson et al. (2004) provedli adenektomii a implantovali myším pelety s 11-dehydrokortikosteronem. „Wild-type“ myši ochotně přeměňovaly 11-dehydrokortikosteron na kortikosteron, zatímco hladiny kortikosteronu u 11 $\beta$ -HSD1<sup>-/-</sup> myší zůstaly nedetekovatelné. To dokazuje, že 11 $\beta$ -HSD1 a její 11-reduktázová aktivita je jako jediná schopná tvorby aktivních forem glukokortikoidů. Ztráta enzymu má zejména významný vliv na funkci HPA osy.

### 3.2.1. 11 $\beta$ -HSD2

11 $\beta$ -HSD2 je enzym katalyzující pouze jednosměrnou reakci, ke které vyžaduje jako kofaktor NAD<sup>+</sup>. Úlohou tohoto enzymu je oxidace aktivních forem glukokortikoidů na jejich neaktivní 11-keto deriváty. Při činnosti tohoto enzymu tedy dochází k přeměně kortizolu na kortizon či kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron (Tomlinson et al., 2004). Tkáňová distribuce 11 $\beta$ -HSD2 koreluje s cílovými tkáněmi mineralokortikoidů, jako jsou ledviny a tlusté střevo. V dospělém mozku je 11 $\beta$ -HSD2 exprimovaná v několika málo jádrech, jejichž úloha je většinou spojena s kontrolou bilance solí a vody v těle a s krevním tlakem. Hlavní úloha této formy enzymu v mozku se projevuje během prenatálního vývoje, kdy je silně exprimován ve většině zárodečných tkání, včetně CNS a placenty (Wyrwoll et al., 2011). Aktivní místo enzymu, stejně jako kofaktor vázající doména, jsou umístěny cytosolicky (viz obrázek č. 8). To nepochybně dodává enzymu až 100x vyšší afinitu k substrátu oproti 11 $\beta$ -HSD1. Enzym je exprimován zejména v ledvině, ve střevě, slinných a potních žlázách a placentě (Wyrwoll, 2011). Ve srovnání s expresí 11 $\beta$ -HSD1 je dehydrogenáza typu 2 tvořena konstitutivně. Hlavní role 11 $\beta$ -HSD2 na periférii je ochrana neselektivních MR v ledvinách před aktivací kortikosteronem namísto aldosteronu (Edwards et al., 1988). Pokud je enzym poškozen, vzniká poměrně vzácné onemocnění zvané syndrom „zdánlivého mineralokortikoidního nadbytku“ (apparent mineralocorticoid excess, AME). Porucha je spojena se vznikem hypertenze, organismus zadržuje sodné kationty, draselné naopak

vylučuje v nadměrné míře (Al-Harbi & Al-Shaikh, 2012). Tato porucha ale není spojena s poškozením tvorby mineralokortikoidů, jak by se na první pohled zdálo, ale s kortizolem. Kortizol nese částečnou mineralokortikoidní aktivitu, pokud není přeměněn 11 $\beta$ -HSD2 na neaktivní kortizon, váže se na MR a aktivuje příslušné buněčné procesy.

Vysokou míru exprese 11 $\beta$ -HSD2 najdeme ve fetoplacentální jednotce, kde slouží jako bariéra chránící plod před vysokými dávkami glukokortikoidů od matky. Přítomnost enzymu je zde zásadní pro zdravý vývoj plodu. Deficit 11 $\beta$ -HSD2 v zárodku a zárodečných tkáních způsobuje celoživotní projev úzkosti a vývojové vady (Wyrwoll, 2011). Před vyššími koncentracemi glukokortikoidů je plod chráněn také krevními bílkoviny. Jelikož se většina aktivních glukokortikoidů po vyplavení do krve váže na kortikosteroid-vázající globuliny či albumin nemůžou pronikat fetoplacentální bariérou. Ovšem pokud je i přesto endokrinní okolí plodu poškozeno, dochází k celoživotním změnám v aktivitě HPA osy. Během posledního vývojového stádia plodu je základní sada klíčových dějů pro expresi genů regulujících HPA osu naprogramovaná dle genotypu. Pokud je plod vystaven zvýšeným hladinám glukokortikoidů, je genetický program pozměněn, a to směrem k hyperaktivitě HPA osy. To je následně spojeno s nízkými porodními váhami, se stresem souvisejícími kardiovaskulárními, metabolickými a neuroendokrinními poruchami v dospělosti (Shoener et al., 2005).



Obr. 7.

Porovnání lokalizace 11 $\beta$ -HSD2 a 11 $\beta$ -HSD1 v membráně ER. Znázorněno i aminokyselinové složení enzymů (pozitivně nabitě zbytky jsou zvýrazněny černě) a umístění katalytických podjednotek.

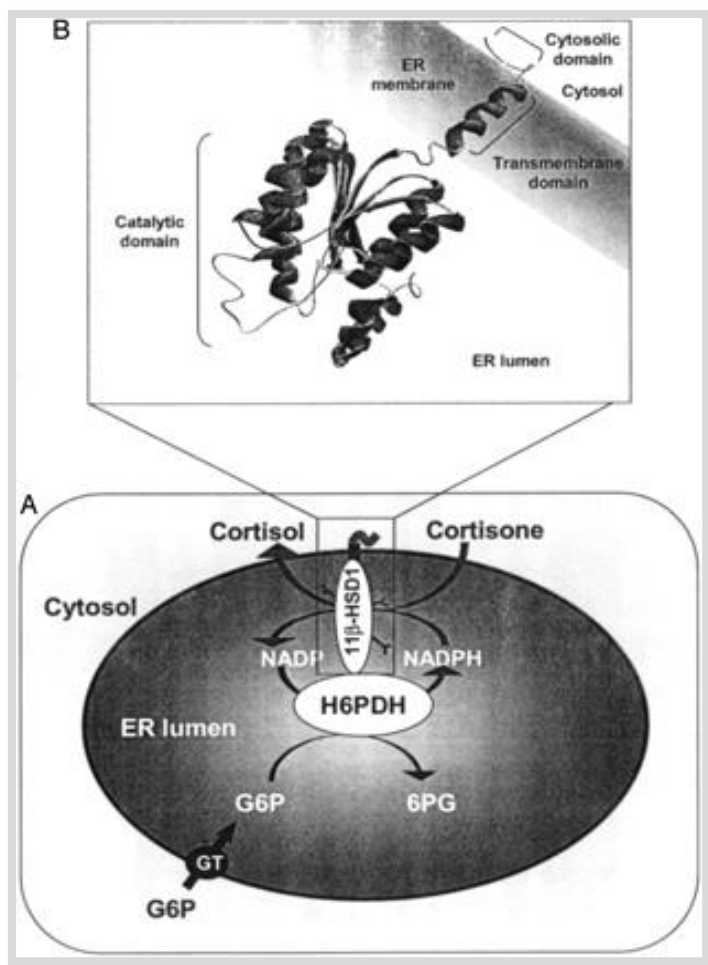
Zdroj: Odermatt et al., 2006.



### 3.2.2. 11 $\beta$ -HSD1

11 $\beta$ -HSD1 je během posledního desetiletí pod drobnohledem řady výzkumných laboratoří. Především proto, že úloha tohoto enzymu hraje roli při vzniku mnoha onemocnění (obezity, inzulínové rezistence, osteoporózy či glaukomu). 11 $\beta$ -HSD1 je klíčovým enzymem ovlivňujícím činnost HPA osy. Je exprimovaná zejména v játrech, tukové tkáni a napříč celou centrální nervovou soustavou dospělých savců. Její aktivita je zde řízena glukokortikoidy, cytokiny, stresovými faktory či estrogeny (Seckl & Walker, 2001).

Směr, kterým bude 11 $\beta$ -HSD1 katalyzovat své reakce, závisí podle některých studií na fyziologickém a vývojovém stavu daného buněčného typu. Například v Leydigových buňkách byla nalezena jak 11-reduktázová, tak 11 $\beta$ -dehydrogenázová aktivita (Wang et al., 2002). V každém případě, pokud jsou buňky desintegrovány, reduktázová aktivita je ztracena. Tato nápadná změna směru katalýzy mezi intaktními buňkami a homogenáty je pravděpodobně způsobena specifickou intracelulární lokalizací 11 $\beta$ -HSD1 v lumen endoplazmatického retikula (ER). V intaktních buňkách totiž hraje významnou roli další z enzymů ER, hexóza-6-fosfát dehydrogenáza (H6PDH), která poskytuje potřebná množství NADPH pro reduktázovou aktivitu enzymu (Tomlinson et al., 2004). 11 $\beta$ -HSD1 je v membráně ER umístěna následovně: na cytosolické straně membrány se nachází pouhých pět aminokyselinových zbytků, následuje transmembránová oblast a většina proteinu je umístěna v lumen (viz obr. 9). Správnou orientaci proteinu zajišťují tři aminokyseliny: lysin-5 v cytosolu, glutamin-25 a glutamin-26 v lumen ER. Pokud by došlo k výměně těchto aminokyselin za aminokyseliny s opačným nábojem, protein by byl umístěn přesně naopak (Frick et al., 2004). Díky správnému uspořádání má enzym k dispozici dostatek molekul NADPH, které jsou lokalizovány intraluminálně. Pokud dojde k poškození kompartmentalizace buňky, protein nemá dostatek NADPH a mění směr katalýzy. Kromě toho, lumen ER podporuje tvorbu disulfidických můstků, které jsou velmi důležité pro strukturu 11 $\beta$ -HSD1 (Tomlinson et al., 2004). Zároveň zde probíhá další typ posttranslačních úprav – glykosylace. Ne z důvodu správného poskládání proteinu, ale pravděpodobně jako prevence proteinové agregace a pro stabilizaci (Tomlinson et al., 2004).



Obr. 8.

A. Schématické znázornění propojení 11 $\beta$ -HSD1 a H6PDH, které je důležité pro produkci NADPH a k udržení reduktázové aktivity 11 $\beta$ -HSD1. GT – glukóza-6-fosfát translokáza; G6P - glukóza-6-fosfát; 6PG – 6-fosfoglukonolaktonát.

B. 3D struktura a umístění 11 $\beta$ -HSD1 v rámci lumen ER.

Zdroj: Tomlinson et al., 2004.

### 3.2.2.1. 11 $\beta$ -HSD1 v CNS

Jak již bylo zmíněno, 11 $\beta$ -HSD1 je v centrální nervové soustavě dospělých savců exprimovaná velmi výrazně, zejména v mozku v oblastech souvisejících s negativní zpětnou kontrolou glukokortikoidů. Její přítomnost byla prokázána v mozku myší, potkanů, psů a primátů (Wyrwoll et al., 2011). *In situ* hybridizační studie v „*post-mortem*“ lidských mozcích potvrdily expresi 11 $\beta$ -HSD1 v hippocampu, prefrontálním kortexu a mozečku (Sandeep et al., 2004). Nachází se jak v nervových, tak gliálních buňkách (Moisan et al., 1990).

Funkce enzymu je významná zejména u dospělců. V prenatálním vývoji je činnost 11 $\beta$ -HSD1 udržována na velmi nízké úrovni. Vysoké dávky glukokortikoidů během pozdního prenatálního a časného postnatálního vývoje vedou k potlačení růstu a formace mozku, snižují neurogenezi a gliální proliferaci, oslabují formování dendritických propojení a způsobují behaviorální a neuroendokrinní postižení (de Kloet et al., 2005). Přesto byla u potkaního

plodu nalezena poměrně vysoká hladina tohoto enzymu během pozdní fáze gestace. Během tohoto období je HPA osa velmi málo citlivá ke stresu, což dokládají snížené hladiny ACTH a kortikosteronu. Důležitým prostředkem k vytvoření hyposenzitivity HPA osy ke stresovým reakcím je posílení aktivity 11 $\beta$ -HSD1 a následné zvýšení efektivity glukokortikoidní zpětné vazby. Zvýšená exprese enzymu v hypothalamu snižuje zpětnovazebně činnost HPA osy a tím i hladinu glukokortikoidů v krvi plodu (Johnstone et al., 2000). Přesný mechanismus, jakým je toho dosaženo, není dosud znám.

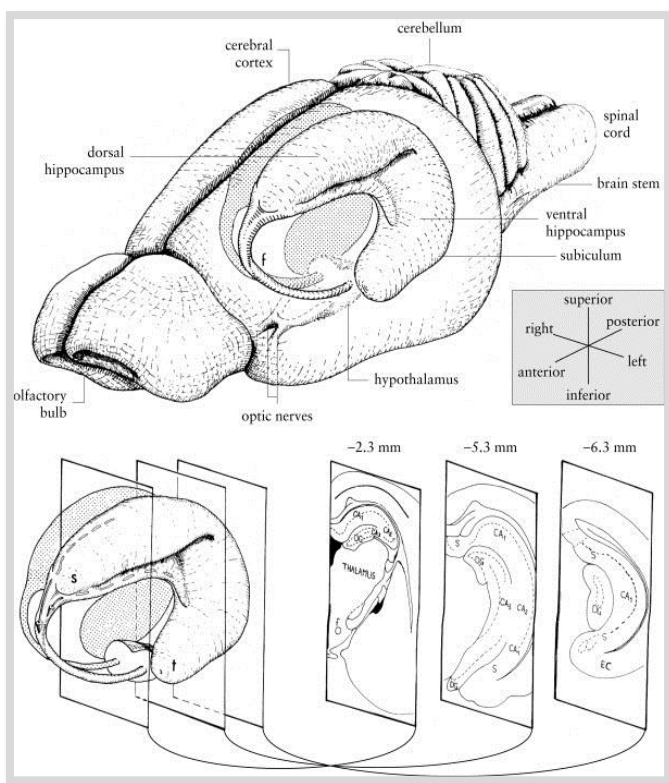
V dospělém mozku má 11 $\beta$ -HSD1 nezastupitelnou úlohu jako enzym ovlivňující činnost HPA osy. 11 $\beta$ -HSD1 je exprimována jak v hypothalamu, zejména v PVN, tak v přední hypofýze. Její činností zde vznikají aktivní formy glukokortikoidů, které zpětně inhibují svojí vlastní sekreci potlačením aktivace HPA osy, resp. ukončením sekrece ACTH. Negativní zpětná vazba je uskutečňována celou řadou mechanismů, které můžeme rozdělit na základní dva typy – rychlá non-genomová odpověď a odpověď opožděná, genomová. Rychlá odpověď je citlivá vůči sekreci glukokortikoidů z nadledvin a uskutečňuje se na úrovni paraventriculárního jádra (Herman et al., 2012). Genomová odpověď vychází z destabilizace mRNA molekul pro neuropeptidy ovlivňující aktivitu HPA osy. HPA osa je ovlivněna hladinou glukokortikoidů v krvi, o které je ascendentními excitačními vstupy informován zejména limbický systém (Herman et al., 2012).

Úloha 11 $\beta$ -HSD1 je v mozku spojena pravděpodobně i s regulací cirkadiánních rytmů. U 11 $\beta$ -HSD1<sup>-/-</sup> deficientních myší byl nalezen abnormální cirkadiánní profil hladiny kortikosteronu (Harris et al., 2001). Absence enzymu má tedy dopad na cirkadiánní činnost HPA osy. Ovlivňuje i příjem potravy. Nadměrná exprese 11 $\beta$ -HSD1 v tukové tkáni vede k přejídání se (Kershaw et al., 2005). Navíc 11 $\beta$ -HSD1 je exprimována v hypothalamu v oblasti *nc. arcuatus*, což je klíčová oblast pro kontrolu příjmu potravy (Moisan et al., 1990). 11 $\beta$ -HSD1 i ovlivňuje behaviorální chování. Zvýšená exprese 11 $\beta$ -HSD1 může souviset se vznikem anxiety a depresí. Hyperaktivita HPA osy hraje jistou roli při manifestaci depresivních příznaků, zda může být hlavním důsledkem vzniku depresí, není prozatím jisté (Wu & Wang, 2010). Například u neléčených pacientů s velkými depresemi či u sebevražedných obětí byly zaznamenány velmi vysoké hladiny CRH. Spencer et al. (1996) zaznamenal jeho zvýšenou koncentraci u chronicky stresovaných potkanů. Lahmame et al. (1997) mezi depresemi a zvýšenými hladinami CRH přímou korelaci nevidí. Je jisté, že do regulace příbuzných jevů, jako je strach a úzkost, CRH zapojen je, ale při depresích je s největší pravděpodobností jen vedlejším faktorem.

Vzhledem k tomu, že je 11 $\beta$ -HSD1 vysoce exprimovaná v hippocampu a neokortexu, může její činnost souviset i s procesy učení a paměti. Například myši, které byly po celý život deficientní pro 11 $\beta$ -HSD1 byly ochráněny před ztrátou paměti, která běžně doprovází proces stárnutí (Yau et al., 2001). Mechanismus, umožňující uchování paměti, vidí Yau et al., (2011) ve snížených hladinách glukokortikoidů v mozku, především v hippocampu. Nižší hladiny glukokortikoidů aktivují zejména MR, zatímco kontrolní jedinci s neporušenou aktivitou 11 $\beta$ -HSD1 mají MR plně saturovány a aktivují ve velké míře GR, což proces uchování paměti narušuje (Yau et al., 2011). To dokládá i fakt, že ztráta paměti spojená se stárnutím může být snížena při podávání GR antagonistů (Yau et al., 2011).

### **3.3. HIPPOKAMPUS**

Hippokampus je párová mozková oblast, která se nachází uprostřed spánkového laloku. Má výrazný zaoblený tvar, který se u většiny živočichů podobá mořskému koníku. Odtud pramení i jeho název. Hippokampus je tvořen pěti základními oblastmi: CA1, CA2, CA3, CA4 a gyrus dentatus (DG). Dále k hippocampu řadíme tzv. retro-hippokampální struktury: subiculum, presubiculum, parasubiculum a entorhinální kůru (EC) (Cenquizca & Swanson, 2007). Subiculum je struktura umístěna mezi vlastním hippocampem (CA1-4 oblasti) a EC. Hraje klíčovou roli při zprostředkování interakcí mezi hippocampem a kortexem. Díky umístění, elektrofyziologickým a funkčním vlastnostem má subiculum schopnost ovlivňovat činnost různorodých oblastí mozku (O'Mara et al., 2001). EC tvoří předěl mezi hippocampem a kortexem. Z EC vycházejí neurální dráhy zajišťující přesun nových informací z krátkodobé paměti do dlouhodobé. Nová informace je nejprve zpracována v EC a odtud přechází do DG, z DG do CA3 pyramidálních buněk a odtud do CA1 oblasti, z CA1 pyramidálních buněk přechází informace do kortexu, kde je nakonec uložena (Amaral & Witter, 1989). DG je místem, kde se ukládají do paměti všechny zkušenosti podobného charakteru a kontext událostí (Vivar & van Praag, 2013). DG patří asi mezi nejvíce dynamickou oblast hippocampu. Pokud se zaměříme na neurodegeneraci a neurogenezi v mozku dospělého jedince má DG největší míru remodelační schopnosti (Perederiy & Westbrook, 2013).



Obr. 9.

Nahoře: 3D zobrazení hippocampu v mozku laboratorního potkana.

Dole: tři koronální řezy levého hippocampu s přibližnou předozadní souřadnicí vtaženou k bregmě s označením hippocampálních struktur: CA1, CA2, CA3, DG: gyrus dentatus, EC: entorhinální kůra, f: fornix, s: temporální pól hippocampu.

Zdroj: Cheung & Cardinal, 2005.

CA1 oblast hippocampu je rozdělena do 3 částí, které mají odlišnou strukturu a specifitu v genové expresi (Dong et al., 2009). Jedná se o dorzální (CA1d), intermediální (CA1i) a ventrální (CA1v) část. CA1d je pyramidální vrstva tvořena dvěma podvrstvy – superficiální a spodní (Fanselow & Dong, 2010). Mezi sebou se navzájem liší v propojení s různými typy tzv. *basket cells*, což jsou inhibiční hippocampální neurony s GABAergními synapsami (Fanselow & Dong, 2010). Toto morfologické rozlišení se ale ztrácí směrem ventrálně. CA1v oblast pak tvoří uniformní vrstva buněk. Rozdíl mezi CA1d a CA1v je i v množství tzv. *place cells*. Tyto buňky zodpovídají za prostorovou lokalizaci a nacházejí se zejména v CA1d oblasti (Jung et al., 1994). Díky tomu můžeme CA1d spojit s prostorovou orientací, navigací a učením se pohybu v prostoru. CA1v oblast má na rozdíl od dorzální přímý neurální vstup do čichového laloku (Cenquizca & Swanson, 2007). Z CA1v vedou přímé vstupy do laterálního septa (LS) a do stria terminalis (ST) (Dong et al., 2001). Z LS jdou masivní projekce do hypothalamu a proto je tato dráha velmi důležitá pro kontrolu neuroendokrinní aktivity. Propojení se ST hraje roli při vzniku psychických onemocnění

(deprese, úzkost, PTSD) a to z důvodu přímého propojení ST s PVN, resp. s CRH neurony (Dong & Swanson, 2006).

Hippokampus fylogeneticky vznikl z tzv. archikortexu. Archikortex a paleokortex jsou první dva typy kůry telencefala, které společně dávají podklad pro vývoj limbického systému. Limbický systém je tvořen několika oblastmi, spojenými nervovými drahami ve funkční celek. Jeho součástí je nejen hippokampus, ale i amygdala, která vzniká také z archikortexu a dále jádra septa (Ganong, 2005). Všechny tyto oblasti mají četné spoje s mozkovým kmenem a neokortexem. Limbický systém je velmi důležitý pro komplexní instinktivní a emocionální chování. Z tohoto důvodu byl i samotný hippokampus spojovaný původně pouze s úlohami týkajícími se kontroly emocí. Posléze se zjistilo, že poruchy hippokampu vedou ke ztrátám paměti. Tento fakt je znám přibližně od 60. let 20. století, kdy docházelo k prvním pokusům s lézemi hippokampu (Scoville & Milner, 1957; Victor et al., 1961). Otázkou ovšem zůstávalo, do jaké míry musí být hippokampus poškozen, aby se paměť narušila, a zároveň jaký typ paměti je ovlivněn. Squire (1992) jako jeden z prvních spojuje hippokampus s deklarativní pamětí. Jedná se o spojení paměti sémantické (fakta) a epizodické (události). Do té doby byl hippokampus považován pouze za oblast zodpovídající za paměť prostorovou (Cave & Squire, 1991). Dnes tedy víme, že hippokampus není sídlem paměti jako takové, ale pouze některých jejích typů. Pokud porušíme hippokampální struktury, dojde k poškození epizodické paměti, prostorového učení a učení se úlekovým reakcím v kontextu určité události (Fanselow & Dong, 2010). Tato poslední schopnost - mít strach z určitých situací, je často velmi důležitá pro zachování života.

Ještě donedávna se proto debatovalo o základní funkci hippokampu. Některé studie spojovaly hippokampus s kognitivními funkcemi a deklarativní pamětí, jiné měly hippokampus spojený s emocemi a regulací stresových reakcí (Fanselow & Dong, 2010). Díky genové expresi, anatomickým propojením hippokampu a behaviorálním studiím Fanselow & Dong (2010) zjistili, že je hippokampus rostro-kaudálně segmentovaný a můžeme ho rozdělit na dorzální, intermediální a ventrální část. Každá oblast je přitom spojena s odlišnými funkcemi. Dnes se tedy pozornost zaměřuje zejména na detailní rozlišení hippokampu a vzájemné propojení jeho jednotlivých oblastí a propojení s ostatními regiony mozku. Klur et al. (2009) ukázali, že dělení hippokampu na ventrální a dorzální oblast je nedostačující. Je potřeba obě dvě části oddělit navíc na levou a pravou. Ve svých pokusech s myšmi v Morrisově vodním bludišti totiž zjistili, že v pravé polovině dorzálního hippokampu byla v porovnání s levou značně zvýšena genová exprese genů důležitých při prostorovém

učení. Podobné závěry měli i Greicius et al. (2003) ve svých pokusech s primáty. U primátů sice nemluvíme o dorzálním a ventrálním hippocampu, nýbrž o posteriorní a anteriorní oblasti, nicméně výsledky jsou stejné. Pomocí funkční magnetické rezonance zjistili, že je při učení řeči zapojována více levá strana posteriorní oblasti hippocampu.

Hippokampus je jediná oblast mozku, kde jsou hojně exprimovány oba dva typy kortikosteroidních receptorů. GR se sice nacházejí po celém mozku, ovšem MR najdeme pouze v hippocampu a částečně i v laterálním septu, amygdale, PVN a oblasti locus coeruleus (Joëls et al., 2008). Většina MR v mozku je zapojena do regulace objemu vody, homeostáze soli a kontroly kardiovaskulárních funkcí (de Kloet et al., 2000). Pokud se zaměříme na MR v hippocampu (především v CA1, CA2 a DG), zjistíme, že jejich úloha zde je spojena se stresovou dráhou. Aktivované MR udržují či zvyšují elektrický přenos a zároveň potlačují jakékoliv modulační vstupy, účinek GR má opačný dopad (Joëls, 1997). Díky tomu, že MR v hippocampu stabilizují neurální aktivitu a pracují v tzv. proaktivním režimu, určují citlivost organismu ke stresu (de Kloet et al., 2000). Zdá se, že MR udržují excitabilitu hippocampálních neuronů a tím i bazální aktivitu HPA osy (Joëls & de Kloet, 1994). Například u potkaního kmene Lewis najdeme v hippocampu vysoké hladiny MR, které mohou souviset s jejich hypoaktivní HPA osou (Oitzl et al., 1995).

V souvislosti s hippocampem a identifikací molekulární kaskády, která ovlivňuje odpověď buňky na kortikosteroidy, se přesunula pozornost výzkumu glukokortikoidů na jejich vliv na neurální aktivitu. Původní představa vlivu stresu na paměť byla negativní, resp. že vysoké hladiny glukokortikoidů narušují kognitivní funkce. Ovšem nejnovější studie ukazují, že tomu může být přesně naopak. Když se vrátíme k rozdílu mezi dorzálním hippocampem (DH) a ventrálním hippocampem (VH), je důležité zmínit jejich rozdíl ve schopnosti navozovat tzv. „long-term potenciaci“ (LTP) (Dorey et al., 2012; Maggio & Segal, 2011; Maggio & Segal, 2010; Maggio & Segal, 2009). LTP je dlouhodobé zvýšení amplitudy EPSP neboli dlouhodobé zvýšení odpovědi postsynaptického neuronu po předchozí stimulaci. Neuroplastické změny na synapsi jsou umožněny zejména aktivací glutamátnergních NMDA receptorů, kterými do buňky vstupují vápenaté ionty aktivující kaskádu reakcí. Mechanismy LTP jsou na buněčné úrovni podkladem pro učení a paměť (Bliss & Collingridge, 1993). Prvotní studie ukazují, že VH není schopen v porovnání s DH vytvářet natolik velké a přetrvávající LTP (Maggio & Segal, 2007a). Tato nižší LTP VH není ale způsobena specifickými synaptickými vlastnostmi, protože bazální synaptický přenos je velmi podobný ve všech oblastech hippocampu (Maggio & Segal, 2007b). Je zajímavé, že proces „long-term

deprese“ (LTD; je přesným opakem LTP, tedy oslabení kontaktu dvou neuronů) je v obou oblastech hippocampu za normálních podmínek stejný (Izaki et al., 2000). Ovšem pokud organismus vystavíme stresové zátěži, zvýšené hladiny glukokortikoidů mění funkci synaptických receptorů a iontových kanálů a dochází tak ke změnám ve schopnosti tvorby LTP, resp. LTD (Maggio & Segal, 2010). Akutní stresová reakce zvyšuje hladinu LTD v DH, zatímco ve VH je LTD utlumena a naopak se zde zvyšuje hladina LTP (Maggio & Segal, 2009). Maggio a Segal (2011) zjistili, že tato situace nastává pouze první den po aplikaci stresové situace a s časem (1-3 týdnů) se pomalu vytrácí. Proto aplikovali kombinaci dvou stresových zátěží. Jednu během juvenilního věku potkana a druhou následně v dospělosti. Změna v LTP a LTD v obou oblastech hippocampu pak byla trvalá. V DH došlo k výrazné redukci LTP, ve VH naopak k aktivaci. Vliv stresu v DH lze blokovat prostřednictvím GR-antagonistů, zatímco ve VH díky MR-antagonistům (Maggio & Segal, 2009). Z těchto údajů tedy plyne, že zvýšená LTP ve VH je umožněna díky MR, zatímco potlačení LTP v DH je spojeno s aktivací GR (Maggio & Segal, 2007b). MR-zvýšená aktivace LTP ve VH není zprostředkována aktivací NMDA receptorů, ale zvýšenou činností napětově-závislých vápenatých kanálů (VGCC; „voltage-gated calcium channels“) (Maggio & Segal, 2007b). Zdá se, že stejné hladiny glukokortikoidů odlišně ovlivňují LTP navozenou NMDA receptory a LTP závislou na VGCC (Krugers et al., 2005). LTP se ve VH objevuje do jedné hodiny po aktivaci MR, což je příliš rychle na to, aby se jednalo o mechanismus měnící genovou expresi (Joëls & Krugers, 2007), takže se jedná o non-genomový mechanismus zajišťovaný MR na membráně (mMR). Vliv kortikosteroidů na synaptickou plasticitu v hippocampu je tedy daleko komplexnější, než se původně předpokládalo. Je potřeba dalších experimentů, které objasní roli membránově vázaných i intracelulárních receptorů regulujících LTP/LTD.

Kromě GR a MR receptorů je potřeba v souvislosti s hippocampem zmínit přítomnost i dalších receptorů spojených se stresovou dráhou. Samozřejmě zde nalezneme receptory pro urokortiny a CRH, pro stresovou reakci významné hlavně CRH-R1 (Chalmers et al., 1995), ale také tzv. PACAP receptory typu 1 (PAC1-R) (Vaudry et al., 2009). PAC1-R slouží pro vazbu proteinu PACAP („pituitary adenylase cyclase-activating polypeptide“), který byl poprvé izolován z hypothalamu jako protein stimulující činnost adenylát cyklázy v hypofýze (Miyata et al., 1989). Jeho exprese byla ale posléze objevena ve většině tkání těla, v CNS i na periférii (Vaudry et al., 2009). Jeho úloha je spojována s uvolňováním neurotransmiterů, vasodilatací, bronchodilatací, aktivací intestinální motility, zvyšováním sekrece insulinu a histaminu, modulací imunitního systému či proliferací a diferenciací (Vaudry et al., 2009).



Jakou úlohu v buňce vykonává, závisí především na typu receptoru a na signální kaskádě, která je vazbou proteinu PACAP aktivovaná. PACAP se může vázat celkem ke třem různým typům receptorů, z nichž PAC1-R váže PACAP s nejvyšší afinitou (Kageyama et al., 2007). Druhé dva receptory jsou aktivovány zejména vasoaktivním intestinálním peptidem (VIP), tzv. VIP-preferující receptory typu 1 a typu 2 (VPAC1 a VPAC2) (Kageyama et al., 2007). V hipokampu nalezneme všechny tři typy receptorů, ovšem nejvíce zastoupený je PAC1-R (Hashimoto et al., 1993). Jeho úlohou po navázání ligandu je zvýšená genová exprese některých hormonů (Vaudry et al., 2009). PACAP pozitivně reguluje expresi CRH, a to především v parvocelulárních neuronech PVN (Ghatei et al., 1993). Zvýšená sekrece CRH pak stimuluje uvolňování ACTH z hypofýzy a posiluje aktivitu HPA osy (Vaudry et al., 2009). PAC1-R může procházet odlišným mechanismem sestřihu, takže může vznikat široká škála podtypů receptoru (Vaudry et al., 2009). Signální kaskáda je u všech podtypů zahajována aktivací trimerních G-proteinů, které v buňce často zvyšují hladiny  $Ca^{2+}$  iontů (Blechman & Levkowitz, 2013). Jaký sestřih bude receptor podstupovat, může ovlivnit stres. Stres podporuje A2BP1/Rbfox1 variantu receptoru, která sekreci CRH naopak utlumí (Amir-Zilberstein et al., 2012).

Stres narušuje každodenní život milionů lidí na celé Zemi a významně ohrožuje jejich zdraví. Pochopení mechanismů vlivu glukokortikoidů na expresi specifických regulačních molekul, které ovlivňují samotnou činnost HPA osy pak představuje možnost vytváření nových postupů při léčbě psychických, fyziologických či behaviorálních onemocnění. Vzhledem k tomu, že je hippokampus jednou z mála oblastí mozku, která společně exprimuje oba dva typy kortikosteroidních receptorů, byla vybrána pro zodpovězení těchto otázek:

1. Projeví se aplikace stresové zátěže na lokálním metabolismu glukokortikoidů v CA1 hippokampální struktuře?
2. Bude mít aplikace stresové zátěže vliv na expresi kortikosteroidních receptorů v CA1 hippokampální oblasti?
3. Ovlivní stresová zátěž v CA1 oblasti hippokampu expresi receptorů spojených s kortikotropin-uvolňujícím hormonem?
4. Nalezneme v reakci na stresový stimul mezikmenové rozdíly, resp. vliv genetického pozadí?

### 5.1. Použitá zvířata

K pokusům byly použity celkem tři kmeny potkanů. Dospělí samci kmene Wistar o hmotnosti 300 – 350 g z chovu Fyziologického ústavu AV ČR. Dospělí samci kmene Fisher (F344) a Lewis (LEW) o hmotnosti 300 – 350 g byli objednaní od firmy Charles River. Po celou dobu experimentů byla zvířata ustájena ve zvěřinci oddělení Fyziologie epitelu Fyziologického ústavu AV ČR. Byla chována za standardních podmínek při teplotě 22 °C na světelném režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Všechna zvířata měla neomezený přístup k potravě a vodě. Byla krmena standardní laboratorní dietou. Všechna zvířata byla vystavena stejnému stresovému protokolu. Poté byla usmrcena dekapitací a odebrané tkáně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy pro další účely.

Potkani kmene Wistar jsou outbrední kmen potkanů, který patří k druhu *Rattus norvegicus*. Jedná se o běžně používaný kmen potkanů v laboratořích, a to jak v biologickém, tak medicínském výzkumu. Tento kmen byl vyvinut Wistar institutem v roce 1906, později z nich byly vyšlechtěny dva další kmeny potkanů: Sprague Dawley a Long-Evans. Na rozdíl od potkanů kmene F344 a LEW má tento kmen normální činnost HPA osy. Jejich reakce na stres je tedy běžná v porovnání s ostatními živočichy včetně člověka. Potkani kmene F344 a LEW patří k inbredním kmenům. Vznikly křížením velmi blízkce příbuzných jedinců kmene Sprague Dawley. Tyto dva kmeny jsou vůči sobě v mnoha parametrech antagonistickými. Hlavní rozdíl je v činnosti jejich HPA osy. F344 potkani mají HPA osu hyperaktivní, LEW naopak hypoaktivní. Proto jsou F344 potkani velmi vhodným modelem pro studium stresu, stresový zásah je u nich snadněji a rychleji detekovatelný. LEW potkani se nejčastěji využívají při výzkumu zánětu či autoimunitních onemocnění. U jedinců s různým genetickým pozadím má stres odlišný účinek. Tyto tři kmeny lze postavit na pomyslnou přímku s hodnotami od vysoké aktivity HPA osy, přes průměrnou, až k nízké činnosti. Ke studiu byly vybrány z důvodu lepšího srovnání vlivu stresu na funkci enzymu 11 $\beta$ -HSD1 a celé stresové dráhy.

## 5.2. Použité chemikálie

V pokusech byly použity následující chemikálie dodávány těmito firmami:

- *Abbott (Green Oaks, IL, USA):* Forane (isofluranum)
- *Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA):* TaqMan Universal PCR Master Mix with AmpErase UNG, TaqMan Gene Expression Assays, TaqMan Endogenous Control Rat GAPDH, RNase Inhibitor
- *Baria (Praha, Česká republika):* Hot FirePol Probe qPCR Mix
- *Bio-Consult Laboratories (Praha, Česká republika):* RNeasy Micro Kit, kit Qiagen RNeasy Micro kit
- *Invitrogen (Lofer, Rakousko):* RNaseOUT, random primers
- *Life Technologies:* dNTP, TaqMan Gene expression Master Mix, Pre-DevelopedTaqMan Rat GAPD
- *Medesa (Polička, Česká republika):* OCT Compound, TissueTek
- *MP Biomedicals (Orangeburh, NY, USA):* corticosterone <sup>125</sup>I RIA Kit
- *Penta Chemicals (Praha, Česká republika):* etanol p.a. kvalita
- *Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA):* K<sub>2</sub>EDTA solution, Gene Elute Mammalian Total RNA Kit, Enhanced Avian Reverse Transcriptase with Rnase inhibitor, KresolViolet', merkaptoethanol, Enhanced Avian Reverse Transcription Kit

## 5.3. Použité přístroje

K pokusům byly používány následující přístroje dodávané firmami:

- *Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA):* AbiPrism 7000 Sequence Detection System Instrument; ViiA 7 Real-Time PCR Systém
- *Eppendorf (Hamburg, Německo):* MasterCycler
- *IKA – Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Německo):* Vortex MS2 minishaker
- *GmCLab Gilson (Middleton, WI, USA):* stolní centrifuga
- *Leica Microsystems (Wetzlar, Německo):* mikrotom Leica CM1850 Cryocut, laserový mikrodisektor Leica LMD 6000

- *Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)*: gamma-counter
- *Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)*: laboratorní centrifuga 3K18
- *Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)*: spektrofotometr Nanodrop ND-1000

#### 5.4. Stresový protokol

Všechny postupy byly schváleny Odborovou komisí při Fyziologickém ústavu AVČR a probíhaly v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání.

Pro získání informací o vlivu stresové reakce na hippokampální oblast mozku byl využíván stresový protokol dle Ilin & Richter-Levin (2009), s úpravou pro dospělé potkany. Tento protokol byl navrhnout jako krátce působící stresová zátěž pro potkany v juvenilním období, tedy v období mezi 27. a 29. dnem po jejich narození. Tento protokol byl vybrán z důvodu paralelního výzkumu v laboratoři a v rámci mého grantového projektu, který se věnuje porovnání role lokálního metabolismu glukokortikoidů u dospělých a juvenilních potkanů. Experimenty byly prováděny v ranních hodinách kolem 9:00, aby výsledky odpovídaly pouze stresové zátěži a nebyly ovlivněny zvýšenou cirkadiánní hladinou glukokortikoidů. Stresová zátěž spočívala v třídním aplikování různých typů stresujících situací:

**Den 1.** *Test vynuceného plavání (angl. forced swim)*: Potkan je ponořen do chladné vody s teplotou kolem 22 °C ( $\pm 2$  °C). Po dobu 15 minut je ponechán v kruhovém tanku o průměru 0,5 m. Hloubka vody činí 0,4 m a potkan tedy nemá možnost si v plavání odpočinout.

**Den 2.** *Vyvýšená platforma (angl. elevated platform)*: Potkan je umístěn na plochu o rozměrech 14 x 14 cm, která se nachází ve výšce 70 cm nad povrchem. Platforma je umístěna uprostřed menší místnosti. Testování probíhá 30 minut a opakuje se celkem 3x. Mezi testováními je vždy hodinová přestávka.

**Den 3.** *Hypokinetický stres (angl. restraint stress)*: Potkan je umístěn do velmi malého prostoru o rozměrech 18x9x6 cm. Je mu zamezeno v jakémkoliv pohybu. Testování trvá po dobu 2 hodin. Teplota je udržována v hodnotách kolem 25 °C a v místnosti je slabé osvětlení.

Po aplikaci stresové zátěže v prvním a druhém dnu byli potkani vráceni do své klece. V žádném případě však nepřišli do kontaktu s kontrolními skupinami. Poslední den testování byla zvířata po ukončení stresové zátěže usmrcena. Nejdříve byli potkani uspáni ve Foranu a pomocí kardiální punkce jim byla odebrána krev do zkumavky obsahující K<sub>2</sub>EDTA, aby se zabránilo procesu srážení krve. Následně byli usmrceni dekapitací. Z lebky se jemnou preparací odebral mozek a uložil se na suchý led, poté byl skladován v tekutém dusíku pro pozdější zpracování.

## **5.5. RIA**

RIA (z angl. radioimmunoassay) je metoda využívaná pro zjištění koncentrace antigenu (nejčastěji hormonu) prostřednictvím radioaktivní značky, která určí množství antigenu podle rozsahu vazby s protilátkou. Postup stanovení této koncentrace je následující: nejprve jsme v poměru 1:200 zředili 10 µl potkaního séra 2 ml tzv. steroidního diluentu (phosphosaline gelatin buffer obsahující gama globuliny). Připravili jsme si celkem 17 zkumavek. Do prvních dvou jsme napipetovali 0,3 ml steroidního diluentu, do dalších dvou taktéž, ale v množství 0,1 ml a do zbývajících dvanácti zkumavek jsme přidali 0,1 ml kalibrace kortikosteronu (v koncentraci 25, 50, 100, 250, 500 a 1000 ng/ml ředěné ve steroidním diluentu) v dupletu. Do poslední zkumavky se napipetovalo 0,1 ml zředěné kontroly a zředěného (1:200) potkaního séra. Do všech zkumavek se přidalo 0,2 ml radioaktivně značeného kortikosteronu (corticosterone-I<sup>125</sup>). Nakonec se do všech zkumavek s výjimkou prvních dvou přidalo 0,2 ml protilátky proti kortikosteronu. Všechny zkumavky se zvertexovaly a nechaly po dobu 2 hodin temperovat při pokojové teplotě. Po inkubaci se do všech zkumavek přidalo 0,5 ml srážecího roztoku (směs PEG a Goat anti-rabbit gama globulinů v TRIS puftru). Poté se vše pečlivě promíchalo. Všechny zkumavky se nechaly 15 minut centrifugovat při 2300-2500 rpm (1000 g), supernatant se slil. Poté se vše změřilo v tzv. gamma-counteru.

## **5.6. Laserová mikrodisekce (LMD)**

Zmrazené mozky potkanů v tekutém dusíku byly nejdříve temperovány po dobu 30 minut v mikrotomu Leica CM1850 Cryocut při teplotě -19 až -20 °C. Poté se mozek

prostřednictvím Tissue-Tek média opatrně upevnil na podložku tak, aby jeho poloha byla co nejvíce vodorovná. Podložka se umístila do aparatury mikrotomu a žiletkovým nožem se tvořily 12  $\mu\text{m}$  řezy, které se následně umísťovaly na podložní sklíčka pokrytá PEN membránou. Pro lepší orientaci v jednotlivých mozkových strukturách se řezy obarvily. Nejdříve se fixovaly 2 minuty v 100 % ethanolu a poté se barvily 45 sekund v 5 % roztoku kresolové violeti v ethanolu. Sklíčko se nakonec několikrát ponořilo do čistého ethanolu pro částečné odbarvení. Než se vzorky umístily do LMD, nechaly se volně oschnout.

LMD umožnila vyřezání specifických mozkových struktur (Obr. 10). Obarvené řezy se vložily do LMD platformy tkání směrem dolů. Pod sklíčkem byla připravená mikroskopická zkumavka s 25  $\mu\text{l}$  RLT lyzačního roztoku, do které gravitací odpadávaly laserem vyřezané oblasti. Po odebrání dostatečného množství materiálu (kolem 75000  $\mu\text{m}^2$ ) se zkumavka vyjmula a doplnila 50  $\mu\text{l}$  RLT lyzačního roztoku, krátce se zvortexovala a stočila na stolní centrifuze. Před dalším zpracováním byly vzorky uloženy při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v hlubokomrazícím boxu.



Obr. 10. Vlevo obarvený řez mozkiem v kresolové violeti se zvýrazněnými hipokampálními strukturami. Vpravo tentýž řez po LMD s odebranou tkání.

## 5.7. Izolace totální RNA

K izolaci totální RNA ze vzorků zpracovaných laserovou mikrodisekcí byl použit komerčně dostupný kit Qiagen RNeasy Micro Kit. K 75  $\mu\text{l}$  LMD vzorku v RLT lyzačním roztoku se přidal stejný objem 70% ethanolu. Po důkladném zvortexování a stočení se celý objem aplikoval na fixační kolonku a vložil do centrifugy vytemperované na  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 1 minutu při rychlosti 12 000 x g. Objem kolonky, který prošel filtračním sítím, se odstranil. Na

kolonku se následně aplikovalo 350  $\mu$ l RW1 wash buffer a opět se stočilo při stejných podmínkách. Filtrát se odstranil a přidalo se 500  $\mu$ l RPE buffer. Po další centrifugaci se přidalo po odstranění filtrátu 500  $\mu$ l 80% ethanolu. Následovala opakovaná centrifugace, kdy se odstraňovala většina objemu ethanolu. Celkem 2x se po dobu 3 minut nechala kolonka stáčet na sucho. Ve finále došlo k aplikaci 13  $\mu$ l PCR vody ohřáté na 37 °C. Kolonka se nechala stáčet po dobu 5 minut. Získaná RNA byla následně kvantifikována na přístroji NanoDrop 1000 a okamžitě reverzně transkribována.

## 5.8. Příprava cDNA

Po izolaci totální mRNA z hipokampálních struktur CA1d a CA1v z mozku potkana došlo k přepisu mRNA do cDNA prostřednictvím komerčně dostupného kitu Enhanced Avian Reverse Transcription Kit. Podle návodu od výrobce byl objem reakční směsi 20  $\mu$ l. Nejdříve došlo k namíchání: 1  $\mu$ l dNTP mixu, 1  $\mu$ l Random Primers a 8  $\mu$ l roztoku totální RNA. Tato směs se inkubovala při teplotě 70 °C po dobu 5 minut. Poté se směs zchladila a přidal se MasterMix o následujícím složení: 2  $\mu$ l 10x Reaction Buffer, 1  $\mu$ l Enhanced Avian Reverse Transcriptase, 1  $\mu$ l RNase OUT a 6  $\mu$ l PCR vody. Reakční směs pak byla 15 minut inkubována při 25 °C a 50 minut při 42 °C. Nakonec probíhala denaturace při 85 °C po dobu 5 minut. Získaná cDNA se uskladnila při teplotě -20 °C.

## 5.9. Kvantifikace cDNA

Pro kvantifikaci genů 11 $\beta$ -HSD1, MR a GR byl použit přístroj AbiPrism 7000 Sequence Detection System Instrument. Celkové množství reakční směsi činilo 20  $\mu$ l a obsahovalo: 1  $\mu$ l 10x naředěné cDNA, 4  $\mu$ l 5x reakčního pufru TaqMan Gene Expression MasterMix, 0,3  $\mu$ l TaqMan Gene Expression Assay pro konkrétní geny, 0,9  $\mu$ l Pre-Developed TaqMan Rat GAPDH a 13,8  $\mu$ l PCR vody. Vlastní analýza pak probíhala za následujících podmínek:

1. **Aktivace uracil-N-glykosylázy.** Při teplotě 50 °C po dobu 2 minut.
2. **Aktivace „hotstart“ polymerázy.** Při teplotě 95 °C po dobu 10 minut.



3. **PCR cyklus: 55x.** Denaturace při 95 °C trvající 15 sekund. Nasedání primerů a extenze při 60 °C po dobu 1 minuty.

Pro kvantifikaci genů CRH-R1, CRH-R2, PAC-1, PACAP a Ucn2 byl použit přístroj ViiA 7 Real-Time PCR System. Celkové množství reakční směsi činilo 20 µl a bylo stejného složení jako při kvantifikaci genů přístrojem AbiPrism 7000. U genu CRH-R2 byla z důvodu velmi nízkých koncentrací před měřením provedena tzv. pre-amplifikace. Vlastní analýza probíhala za následujících podmínek:

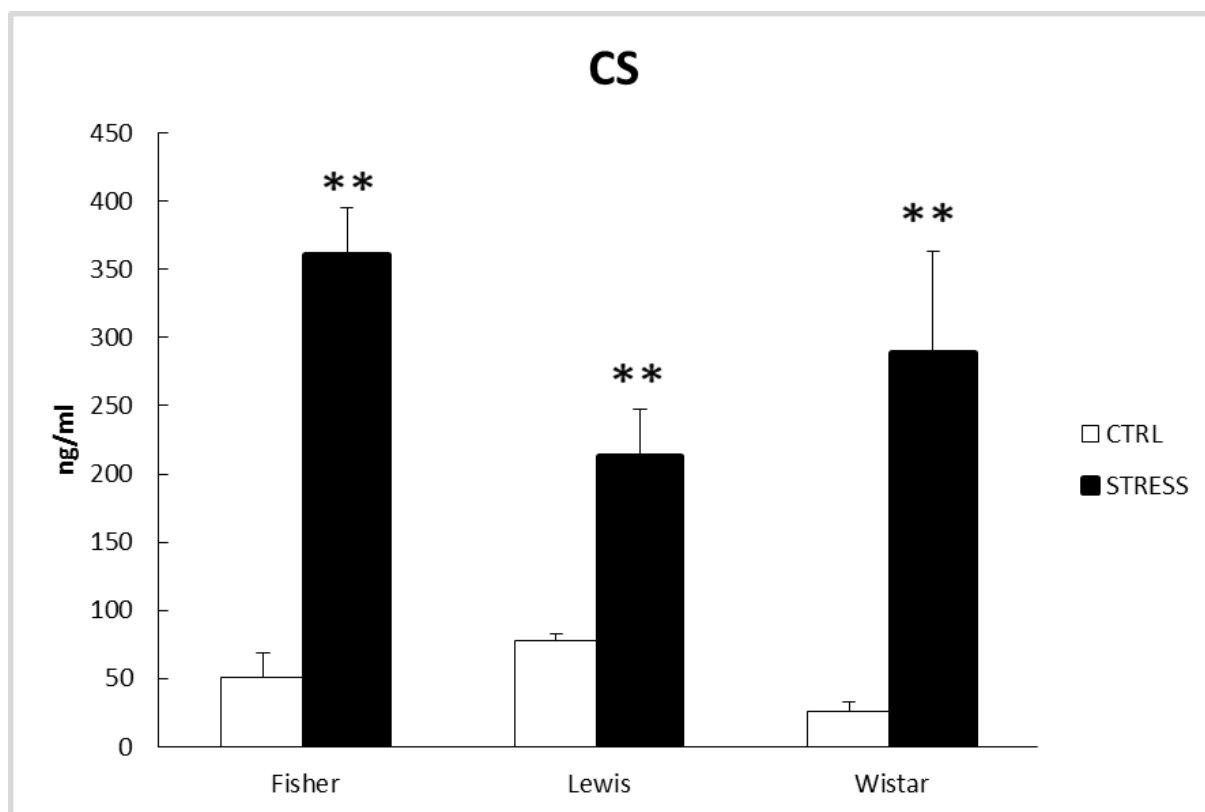
1. **Aktivace uracil-N-glykosylázy.** Při teplotě 50 °C po dobu 2 minut.
2. **Aktivace „hotstart“ polymerázy.** Při teplotě 95 °C po dobu 15 minut.
3. **PCR cyklus: 60x.** Denaturace při 95 °C trvající 15 sekund. Nasedání primerů a extenze při 60 °C po dobu 1 minuty.

## 5.10. Statistika

Všechny naměřené hodnoty byly vztaženy k provoznímu „housekeeping“ genu GAPDH a vyjádřeny jako aritmetický průměr ± střední chyba průměru. Pro zjištění statisticky významných rozdílů mezi jednotlivými hodnotami byla nejprve použita dvourozměrná analýza rozptylu (ANOVA) a poté post hoc analýza pomocí Fisherova LSD testu s využitím programu STATISTICA. Signifikantní rozdíly mezi kontrolními a stresovanými jedinci jsou ve výsledkové části v grafech označeny pomocí hvězdiček nad sloupečkem: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001. Významně odlišné mezikmenové hodnoty jsou označeny křížkem #, hladina významnosti je uváděna v popisku obrázku.

### 6.1. Hladiny kortikosteronu

Dvourozměrná analýza rozptylu prokázala signifikantní efekt stresu (ANOVA:  $p < 0,001$ ), avšak žádný efekt genotypu (ANOVA:  $p > 0,05$ ), zároveň nebyla mezi oběma faktory žádná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Post hoc analýza prokázala, že stres výrazně stimuluje plazmatickou hladinu kortikosteronu (Obr. 11).



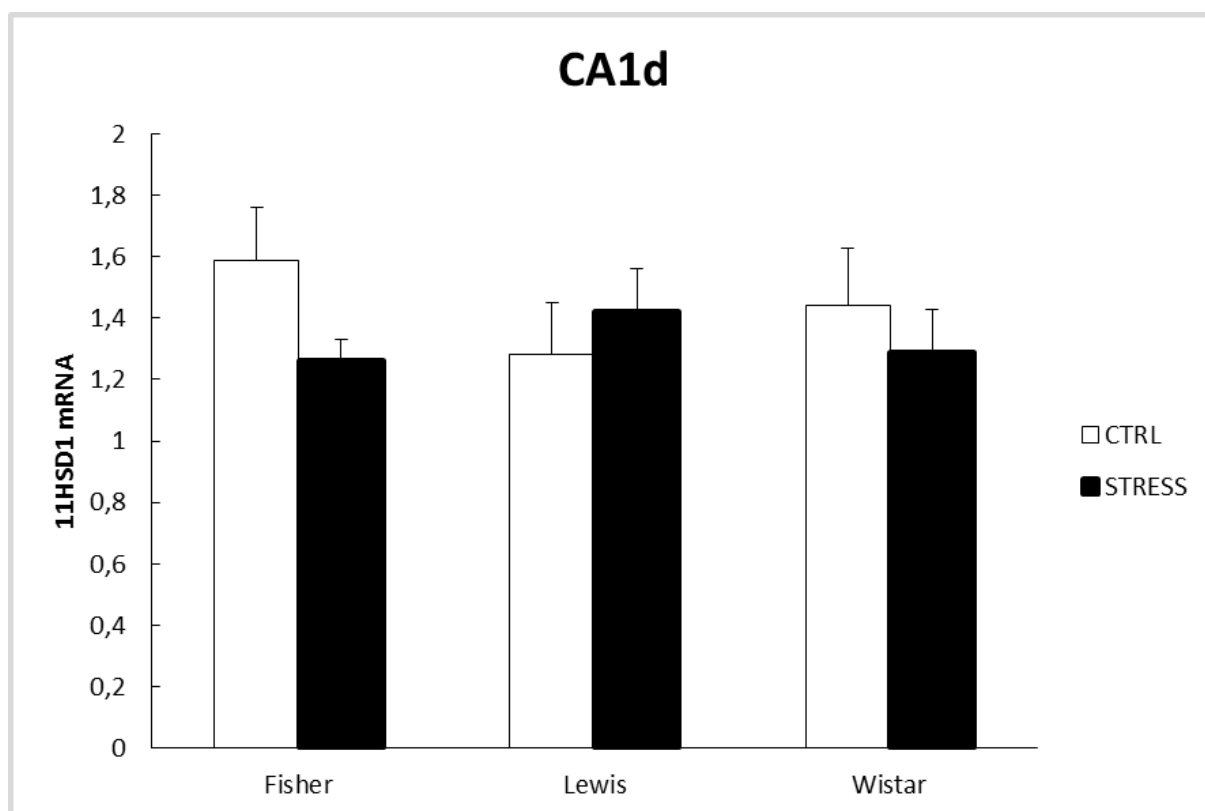
Obr. 11. Hladiny kortikosteronu v plazmě stanovované RIA analýzou u kontrolních potkanů (CTRL) a potkanů po stresové zátěži (STRESS). U všech kmenů potkanů zvýšila stresová zátěž hladiny kortikosteronu se statistickou významností  $*p < 0,01$ . Nebyl nalezen žádný mezikmenový rozdíl.

### 6.2. Změny v genové expresi

Pro posouzení potenciálních změn vyvolaných třídní stresovou zátěží v CA1 dorzální (CA1d) a CA1 ventrální (CA1v) hippocampální struktuře byla použita rozdílná exprese mRNA molekul pro následující transkripty:  $11\beta$ -HSD1, MR, GR, CRH-R1, CRH-R2, UCN-2, PAC1-R a PACAP. Hladiny mRNA jsou relativní jednotky.

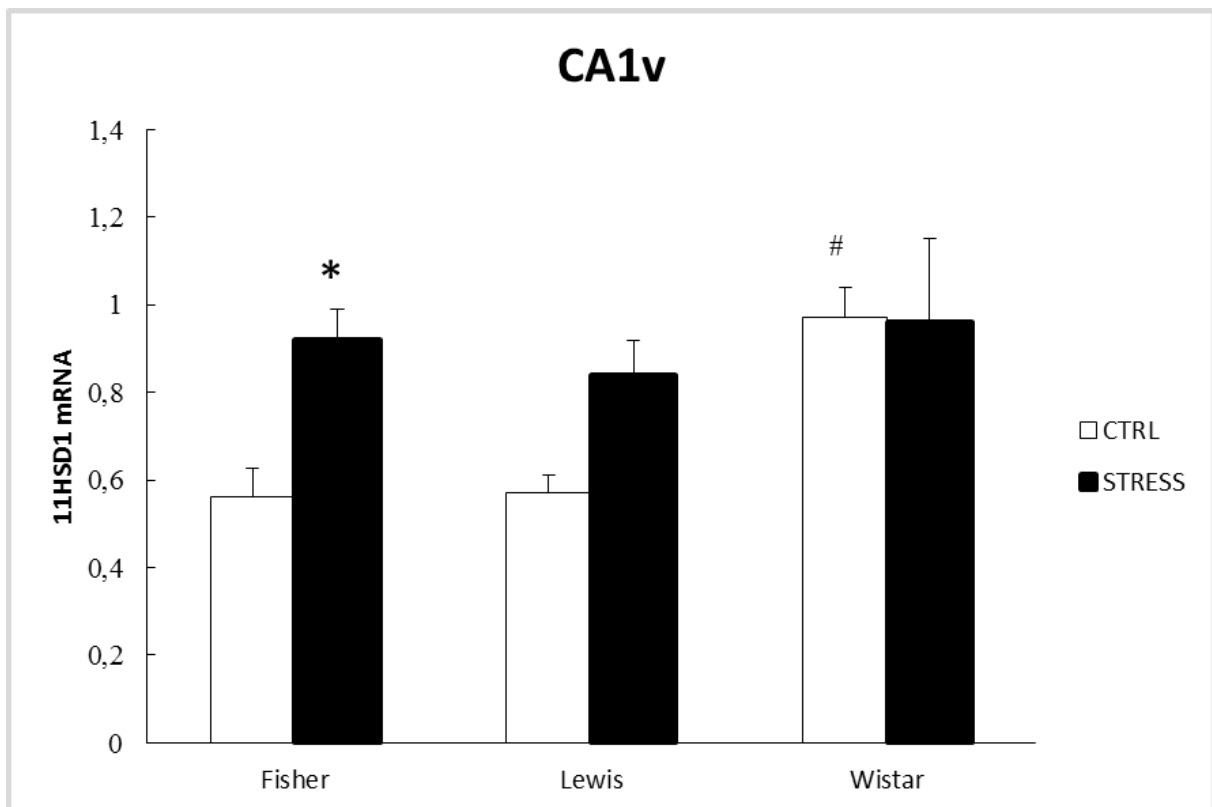
### 6.2.1. 11 $\beta$ -HSD1 mRNA

Dvourozměrná analýza rozptylu neprokázala v CA1 dorzální oblasti hippocampu žádný signifikantní vliv stresu (ANOVA:  $p > 0,05$ ), ani žádný efekt genotypu (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Mezi oběma faktory pak nebyla prokázána ani žádná vzájemná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Viz Obr. 12.



Obr. 12. Relativní hladiny exprese 11 $\beta$ -HSD1 mRNA v CA1 dorzální oblasti hippocampu. Nebyl nalezen žádný vliv stresové zátěže, ani mezikmenový rozdíl.

V CA1 ventrální oblasti hippocampu dvourozměrná analýza rozptylu prokázala signifikantní vliv stresu (ANOVA:  $p < 0,05$ ) a zároveň i efekt genotypu (ANOVA:  $p < 0,05$ ). Mezi oběma faktory ovšem nebyla zjištěna žádná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Post hoc analýza u F344 potkanů prokázala pozitivní vliv stresu na změnu exprese 11 $\beta$ -HSD1 v CA1v oblasti hippocampu (Obr. 13). Zároveň prokázala u kontrolních WIS potkanů významně vyšší hladiny exprese 11 $\beta$ -HSD1 mRNA v porovnání s oběma dalšími kmeny (LEW a F344) na úrovni  $p < 0,05$ .

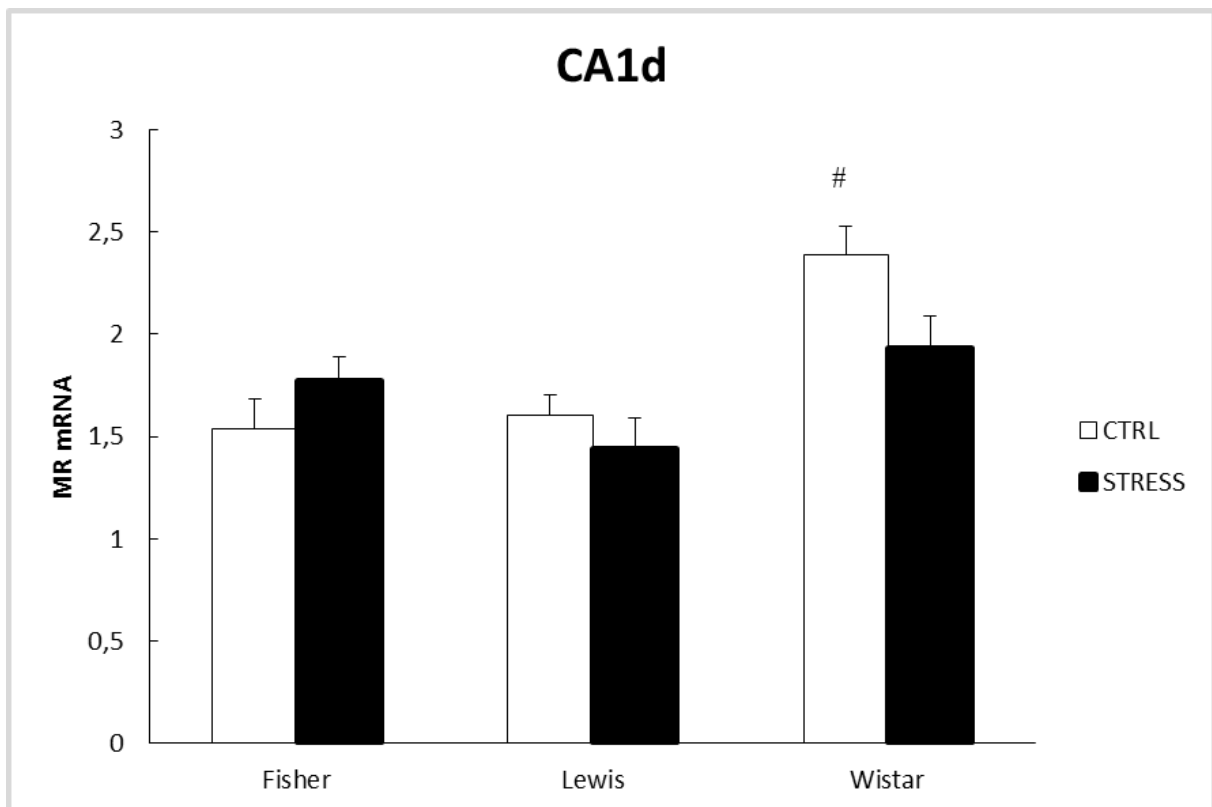


Obr. 13. Relativní hladiny exprese 11 $\beta$ -HSD1 mRNA v CA1 ventrální oblasti hippocampu. U Fisher potkanů došlo vlivem stresové zátěže ke zvýšené expresi 11 $\beta$ -HSD1 mRNA se statistickou významností \* $p < 0,05$ . U kontrolních jedinců kmene Wistar je v porovnání s kontrolními Fisher i Lewis potkany v CA1 ventrální oblasti hippocampu signifikantně vyšší hladina exprese 11 $\beta$ -HSD1 mRNA (# $p < 0,05$ ).

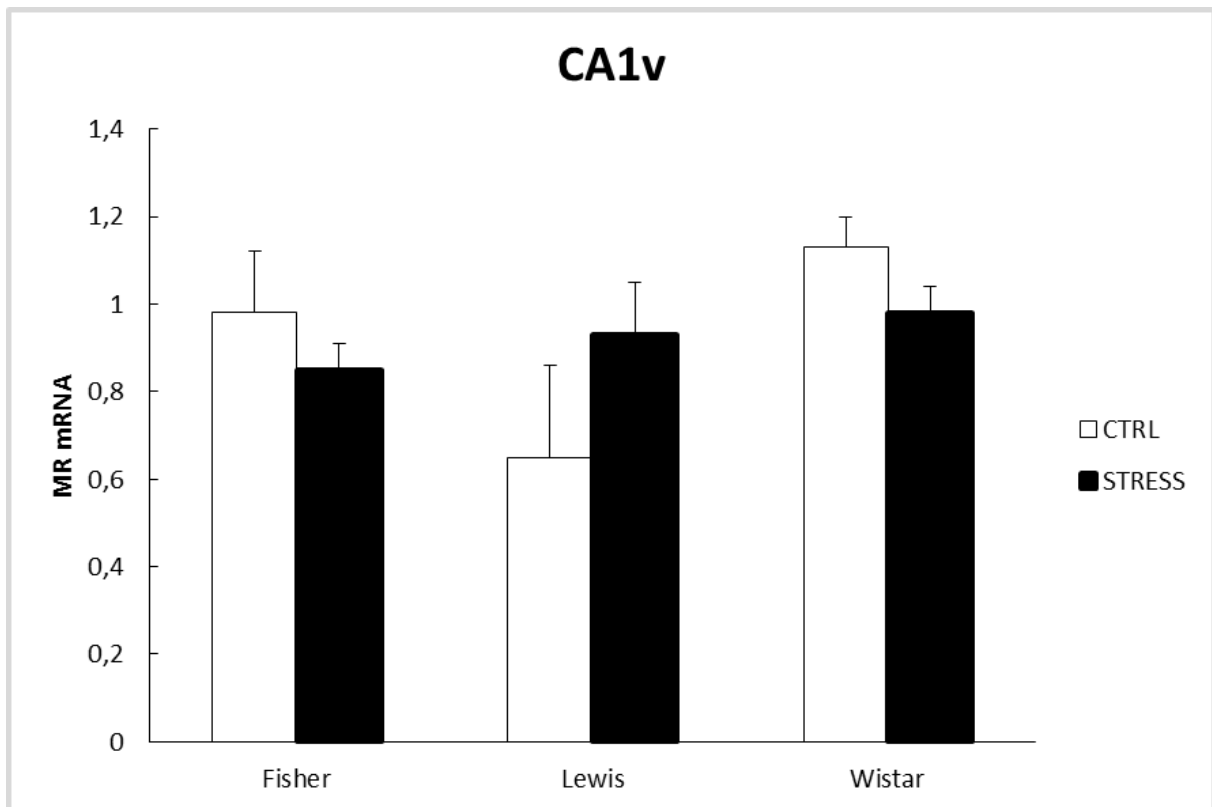
### 6.2.2. MR mRNA

Dvourozměrná analýza rozptylu sice neprokázala v CA1 dorzální oblasti hippocampu žádný významný efekt stresu (ANOVA:  $p > 0,05$ ), ale zaznamenala signifikantní vliv genotypu (ANOVA:  $p < 0,001$ ). Mezi oběma faktory nebyla prokázána žádná vzájemná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). U kontrolních potkanů kmene WIS prokázala post hoc analýza vyšší hladinu exprese MR mRNA v porovnání s kontrolními F344 i LEW potkany na hladině významnosti  $p < 0,05$  (Obr. 14).

V CA1 ventrální oblasti hippocampu analýza rozptylu neprokázala žádný významný efekt stresu (ANOVA:  $p > 0,05$ ), ani genotypu (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Mezi oběma faktory nebyla prokázána žádná vzájemná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Viz Obr. 15.



Obr. 14. Relativní hladiny exprese MR mRNA v CA1 dorzální oblasti hippocampu. U kontrolních Wistar potkanů je v porovnání s kontrolními Fisher i Lewis potkany signifikantně vyšší hladina exprese MR mRNA ( $\#p < 0,05$ ).

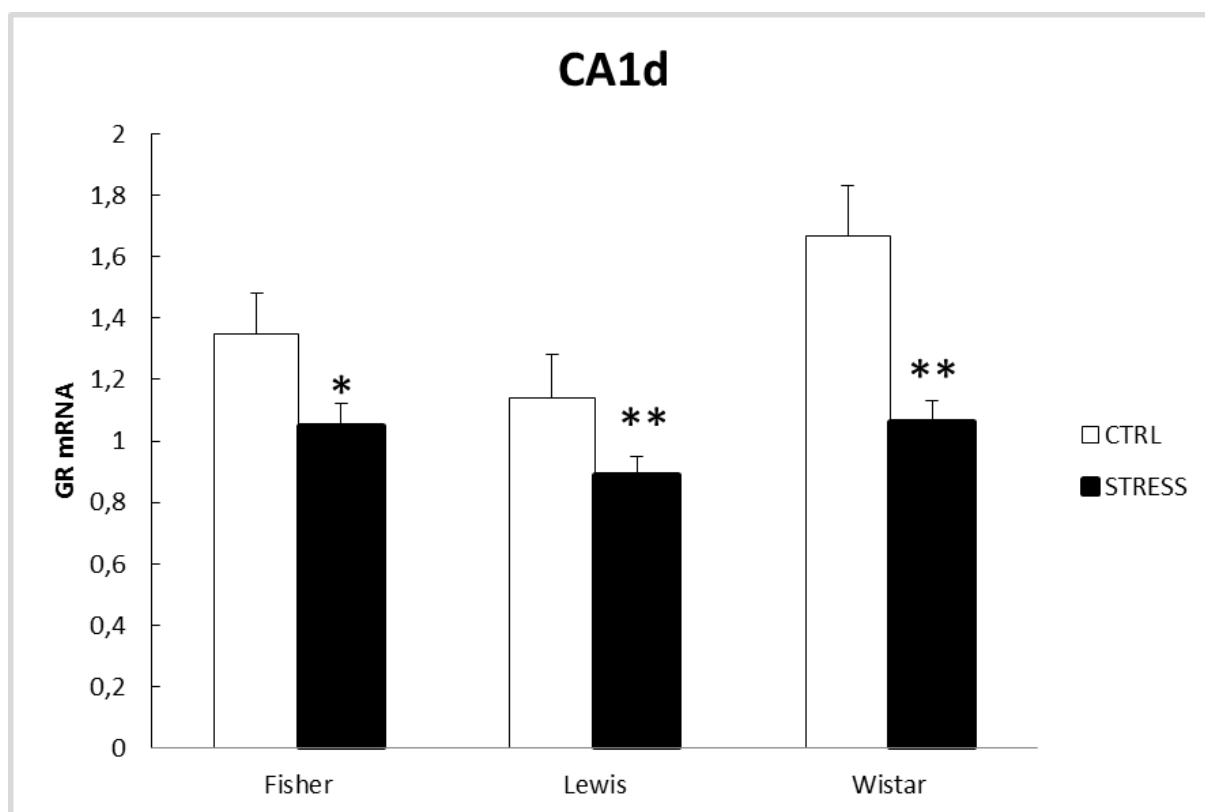


Obr. 15. Relativní hladiny exprese MR mRNA v CA1 ventrální oblasti hippocampu. Nebyl nalezen žádný vliv stresové zátěže, ani mezikmenový rozdíl.

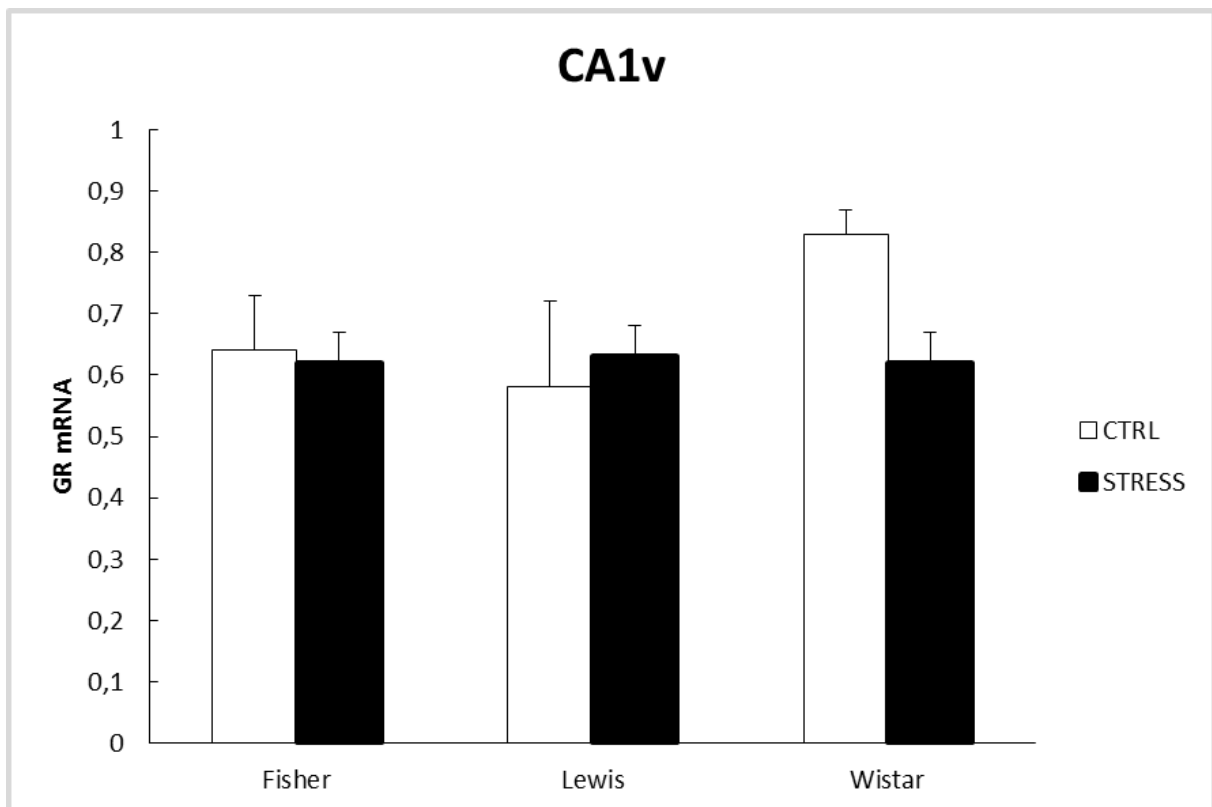
### 6.2.3. GR mRNA

Dvourozměrná analýza rozptylu prokázala v CA1 dorzální oblasti hippocampu signifikantní efekt stresu (ANOVA:  $p < 0,05$ ), avšak žádný efekt genotypu (ANOVA:  $p > 0,05$ ), zároveň nebyla mezi oběma faktory žádná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Post hoc analýza prokázala, že stres výrazně snižuje expresi GR mRNA v CA1d oblasti hippocampu u všech tří kmenů (Obr. 16).

V CA1 ventrální oblasti hippocampu neprokázala ANOVA žádný statisticky významný vliv kmene, ani stresu (Obr. 17). Mezi oběma faktory nebyla žádná interakce.



Obr. 16. Relativní hladiny GR mRNA v CA1 dorzální oblasti hippocampu. U všech kmenů potkanů vyvolala stresová zátěž signifikantní snížení exprese GR mRNA (u Lewis a Wistar potkanů na hladině významnosti  $**p < 0,01$ , u Fisher potkanů  $*p < 0,05$ ).

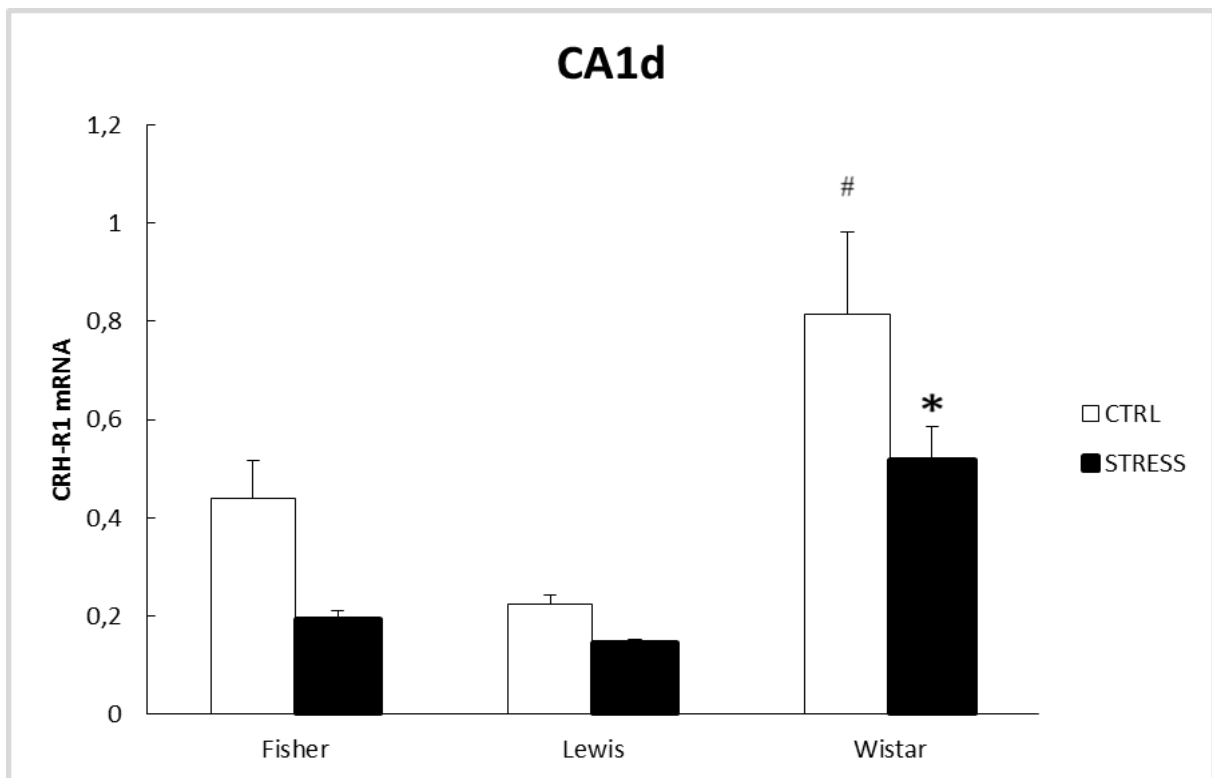


Obr. 17. Relativní hladiny GR mRNA v CA1 ventrální oblasti hippocampu. Nebyl nalezen žádný vliv stresové zátěže, ani mezikmenový rozdíl.

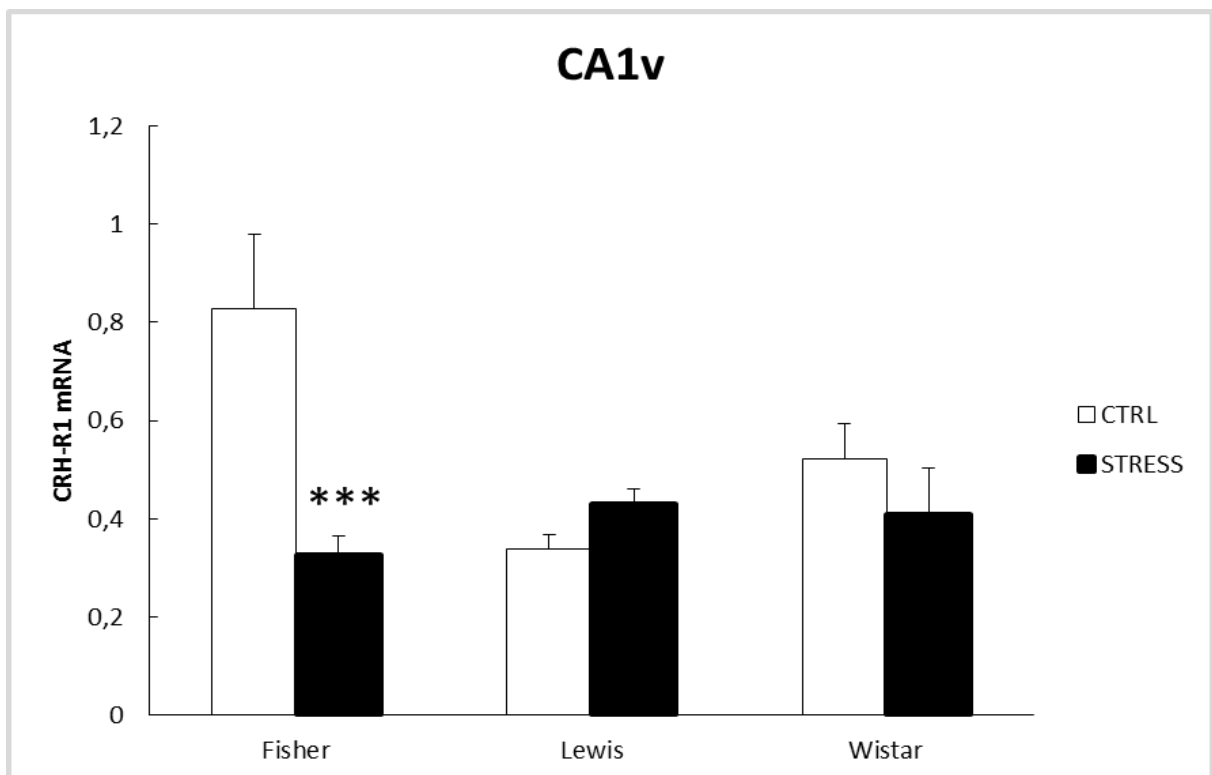
#### 6.2.4. CRH-R1 mRNA

Dvourozměrná analýza rozptylu prokázala v CA1 dorzální oblasti hippocampu signifikantní efekt stresu (ANOVA:  $p < 0,05$ ) a také efekt genotypu (ANOVA:  $p < 0,001$ ), mezi oběma faktory nebyla žádná společná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Post hoc analýza prokázala negativní vliv stresové zátěže na expresi CRH-R1 mRNA u WIS potkanů (Obr. 18). Zároveň u kontrolních WIS potkanů prokázala výrazně vyšší hladiny exprese CRH-R1 mRNA. V porovnání s kontrolními LEW potkany na úrovni  $p < 0,001$ . V porovnání s kontrolními F344 potkany na úrovni  $p < 0,01$ .

V CA1 ventrální oblasti hippocampu prokázala ANOVA významný vliv stresové zátěže na expresi CRH-R1 ( $p < 0,05$ ), ale žádný efekt kmene. Mezi oběma faktory byla prokázána vzájemná interakce se signifikancí  $p < 0,05$ . Post hoc analýza prokázala výrazně negativní vliv stresu na expresi CRH-R1 mRNA u F344 potkanů (Obr. 19).



Obr. 18. Relativní hladiny CRH-R1 mRNA v CA1 dorzální oblasti hippocampu. U Wistar potkanů došlo vlivem stresové zátěže k snížení exprese CRH-R1 mRNA se statistickou významností  $*p < 0,05$ . Zároveň jsou u kontrolních Wistar potkanů v porovnání s kontrolními Fisher ( $\#p < 0,01$ ) i Lewis ( $\#p < 0,001$ ) potkany signifikantně vyšší hladiny CRH-R1 mRNA.

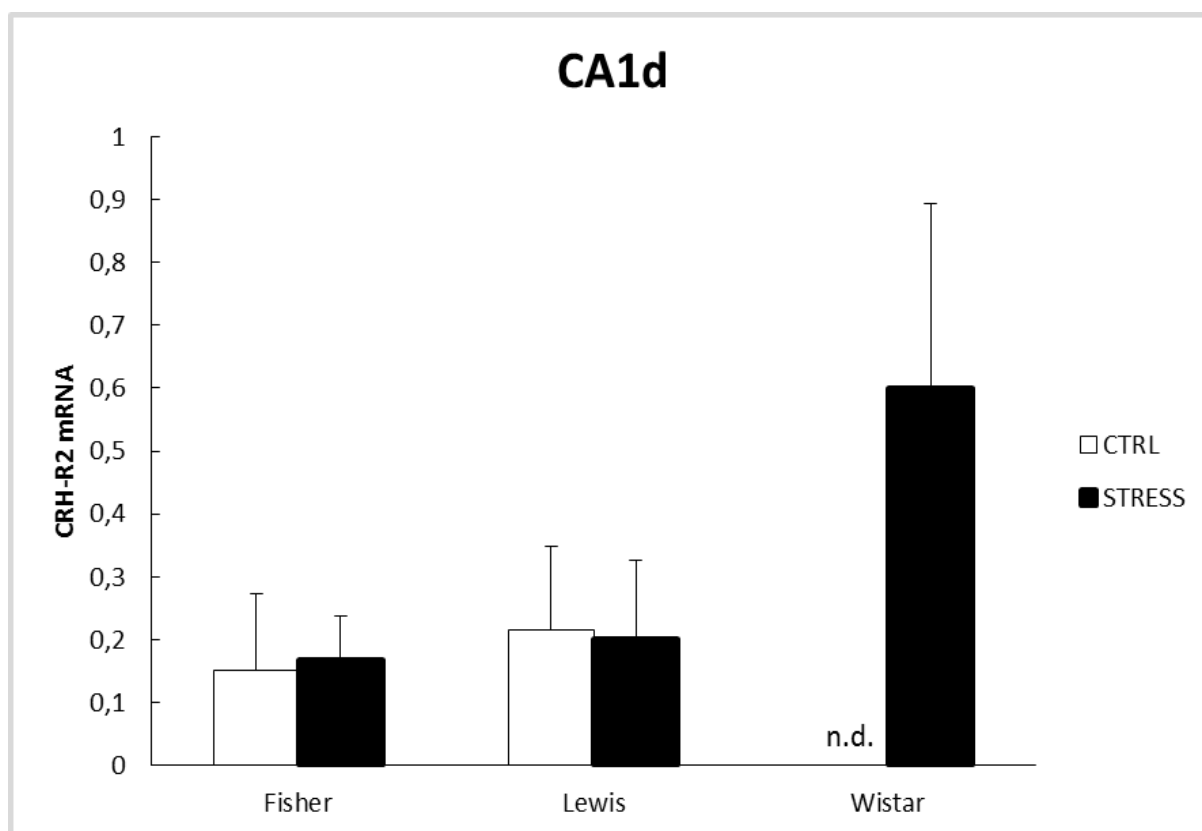


Obr. 19. Relativní hladiny CRH-R1 mRNA v CA1 ventrální oblasti hippocampu. U Fisher potkanů došlo po stresové zátěži k velmi výraznému snížení hladiny exprese CRH-R1 mRNA ( $***p < 0,001$ ). Analýza rozptylu neprokázala žádné mezikmenové rozdíly.



### 6.2.5. CRH-R2 mRNA

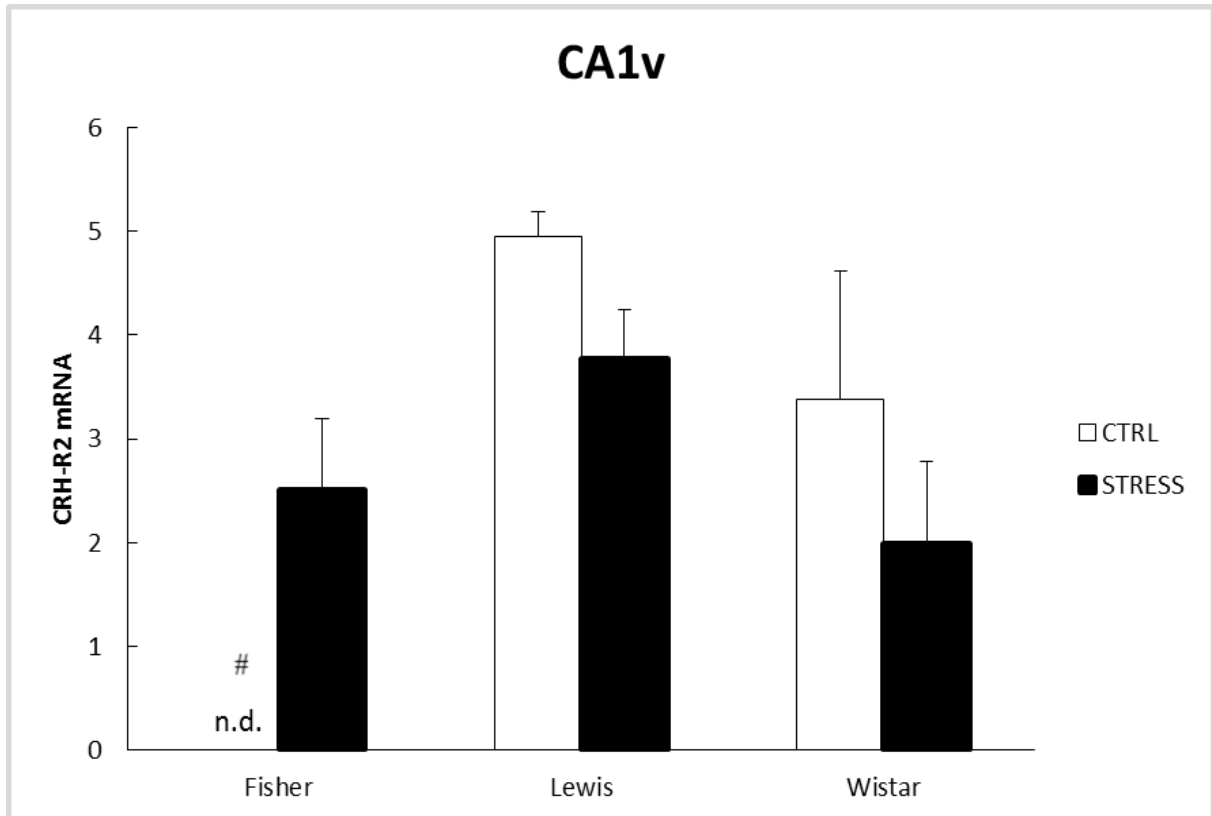
V CA1 dorzální oblasti hippocampu neprokázala dvourozměrná analýza rozptylu žádný významný efekt stresu (ANOVA:  $p > 0,05$ ), ani genotypu (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Mezi oběma faktory nebyla prokázána žádná vzájemná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Přestože efekt stresu v rámci analýzy všech tří kmenů prokázán nebyl, byl u kmene Wistar patrný nárůst hladiny transkriptu pro CRH-R2 po stresu. U nestresovaných zvířat byl tento transkript nedetekovatelný a měřitelný byl teprve u stresovaných jedinců (Obr. 20).



Obr. 20. Relativní hladiny CRH-R2 mRNA v CA1 dorzální oblasti hippocampu. U kontrolních Wistar potkanů byla schopnost změření hladiny transkriptu pod limitem detekce kvantitativní RT-PCR analýzy (n.d. – „not detected“). Při porovnání hladin exprese CRH-R2 kontrolních a stresovaných jedinců kmene Wistar vidíme sice patrný nárůst této hladiny po stresu, ovšem dle analýzy rozptylu nebyl prokázán signifikantní vliv.

Dvourozměrná analýza rozptylu prokázala v CA1 ventrální oblasti hippocampu signifikantní efekt genotypu (ANOVA:  $p < 0,01$ ), ale žádné změny způsobené stresovou zátěží (ANOVA:  $p > 0,05$ ), mezi oběma faktory nebyla žádná společná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Post hoc analýza prokázala u kontrolních F344 potkanů nejnižší hladiny CRH-R2 mRNA ze všech testovaných kmenů. V porovnání s kontrolními LEW potkany na úrovni  $p <$

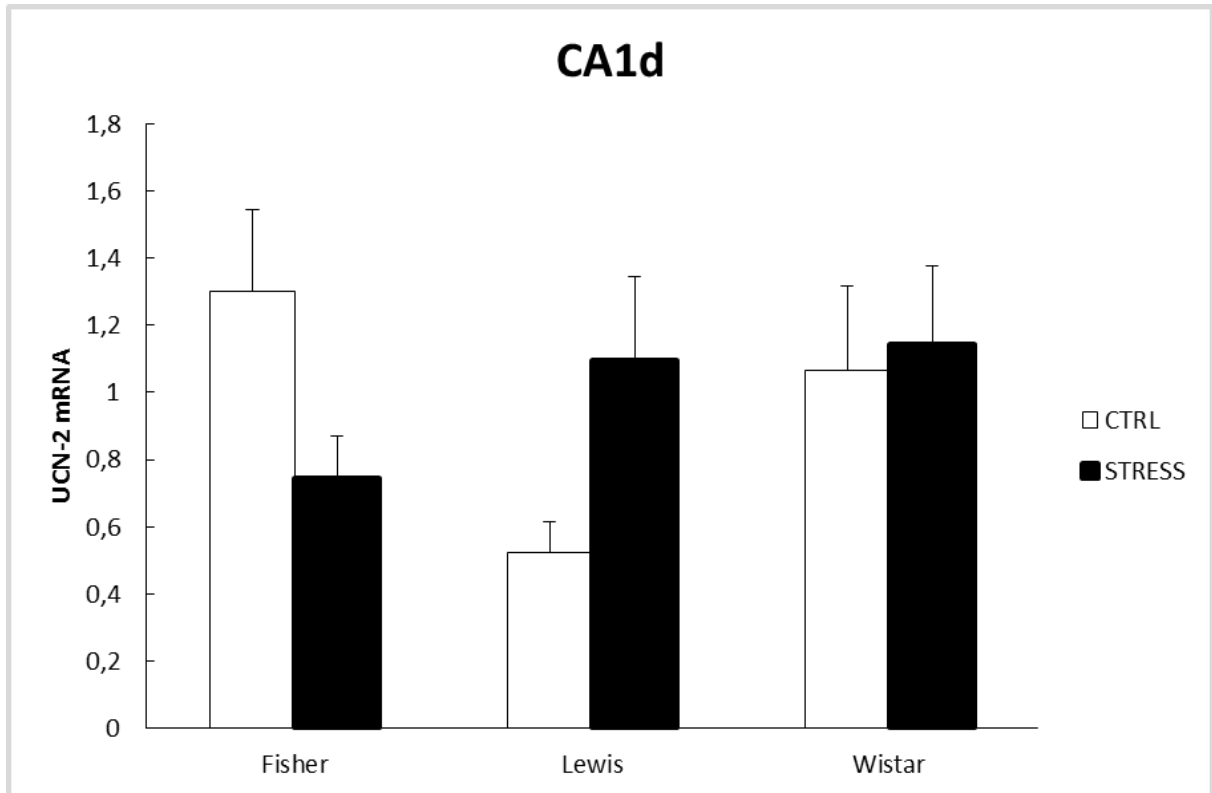
0,01. S kontrolními WIS potkany na úrovni  $p < 0,05$  (Obr. 21). Vliv stresu v rámci analýzy všech tří kmenů sice prokázán nebyl, ale u kmene Fisher byl patrný nárůst hladiny transkriptu pro CRH-R2 po stresové zátěži. U nestresovaných zvířat byly hladiny CRH-R2 mRNA nedetekovatelné a měřitelné byly teprve u stresovaných jedinců.



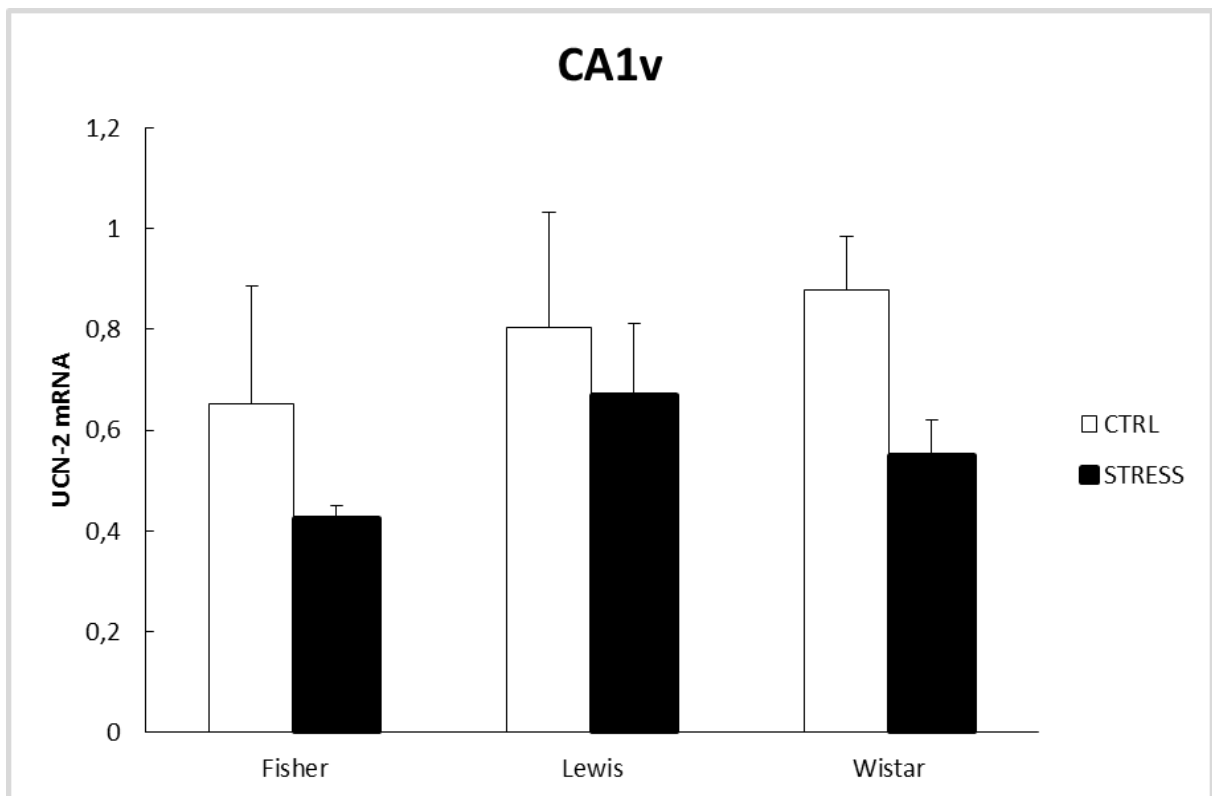
Obr. 21. Relativní hladiny CRH-R2 mRNA v CA1 ventrální oblasti hippocampu. U kontrolních Fisher potkanů byla schopnost změření hladiny transkriptu pod limitem detekce kvantitativní RT-PCR analýzy (n.d. – „not detected“). Proto při porovnání hladiny kontrolních Fisher potkanů s kontrolními Lewis potkany ( $\#p < 0,01$ ) a kontrolními Wistar potkany ( $\#p < 0,05$ ) najdeme významné rozdíly. U Fisher potkanů je navíc patrný nárůst hladiny transkriptu po stresu, ovšem nebyl prokázán analýzou rozptylu.

#### 6.2.6. Hladiny UCN-2

Dvourozměrná analýza rozptylu neprokázala v CA1 dorzální oblasti hippocampu žádný signifikantní vliv stresu (ANOVA:  $p > 0,05$ ), ani žádný efekt genotypu (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Mezi oběma faktory pak nebyla prokázána ani žádná vzájemná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Viz Obr. 22. V CA1 ventrální oblasti analýza rozptylu neprokázala žádný vliv stresu (ANOVA:  $p > 0,05$ ), ani genotypu (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Mezi oběma faktory neprokázala ani žádnou interakci (Obr. 23).



Obr. 22. Relativní hladiny UCN-2 mRNA v CA1 dorzální oblasti hippocampu. Nebyl pozorován žádný vliv stresové reakce, ani mezikmenový rozdíl.

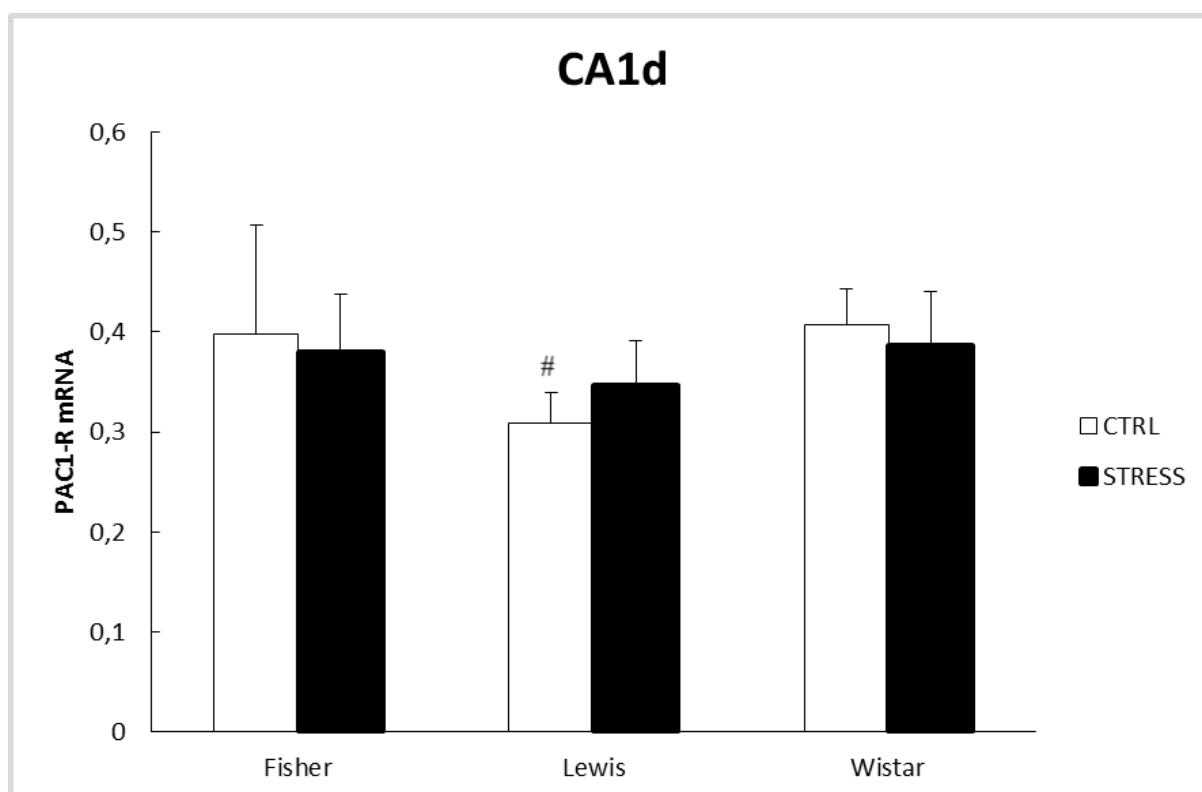


Obr. 23. Relativní hladiny UCN-2 mRNA v CA1 ventrální oblasti hippocampu. Nebyl nalezen žádný vliv stresové zátěže, ani mezikmenový rozdíl.

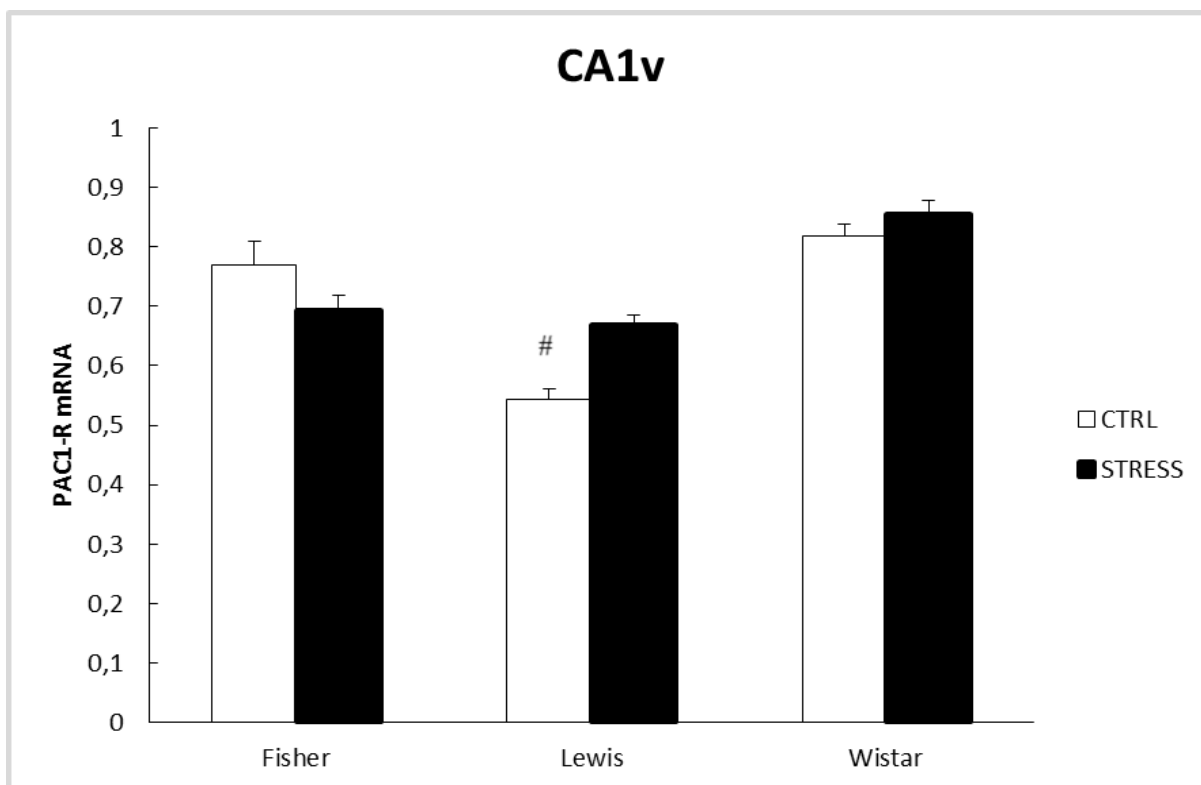
### 6.2.7. Hladiny PAC1-R

Dvourozměrná analýza rozptylu neprokázala v CA1 dorzální oblasti hippocampu žádný významný efekt stresu (ANOVA:  $p > 0,05$ ), byl ale prokázán signifikantní efekt genotypu (ANOVA:  $p < 0,05$ ). Mezi oběma faktory nebyla prokázána žádná vzájemná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Post hoc analýza zjistila, že u kontrolních LEW potkanů dochází v CA1d oblasti v porovnání s kontrolními F344 i WIS potkany k signifikantně ( $p < 0,05$ ) nižší expresi PAC1-R mRNA (Obr. 24).

Téměř identické výsledky najdeme ve ventrální CA1 oblasti. Dvourozměrná analýza rozptylu v této oblasti neprokázala žádný významný efekt stresu (ANOVA:  $p > 0,05$ ), byl ale prokázán signifikantní vliv genotypu (ANOVA:  $p < 0,01$ ). Mezi oběma faktory nebyla prokázána žádná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Post hoc analýza zjistila, že u kontrolních LEW potkanů dochází v CA1 ventrální oblasti v porovnání s kontrolními F344 i WIS potkany k signifikantně ( $p < 0,05$ ) nižší expresi PAC1-R mRNA (Obr. 25).



Obr. 24. Relativní hladiny PAC1-R mRNA v CA1 dorzální oblasti hippocampu. Kontrolní jedinci Lewis potkanů mají nejnižší hladinu exprese PAC1-R mRNA v porovnání s kontrolními Fisher i Wistar potkany na hladině významnosti  $\#p < 0,05$ . U žádného kmene nebyl prokázán vliv stresové zátěže.

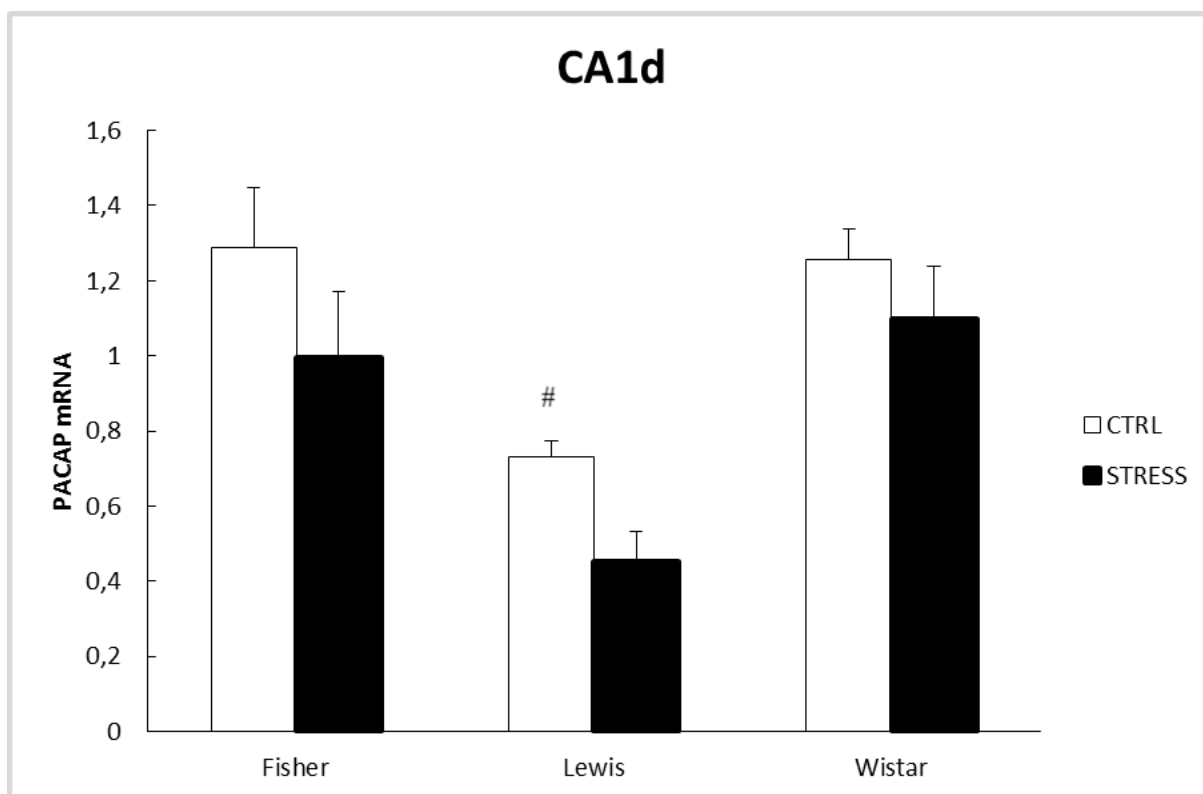


Obr. 25. Relativní hladiny PAC1-R mRNA v CA1 ventrální oblasti hippocampu. Kontrolní Lewis potkani mají nejnižší hladinu exprese PAC1-R mRNA v porovnání s kontrolními Fisher i Wistar potkany na hladině významnosti  $\#p < 0,05$ . U žádného kmene nebyl pozorován vliv stresové zátěže.

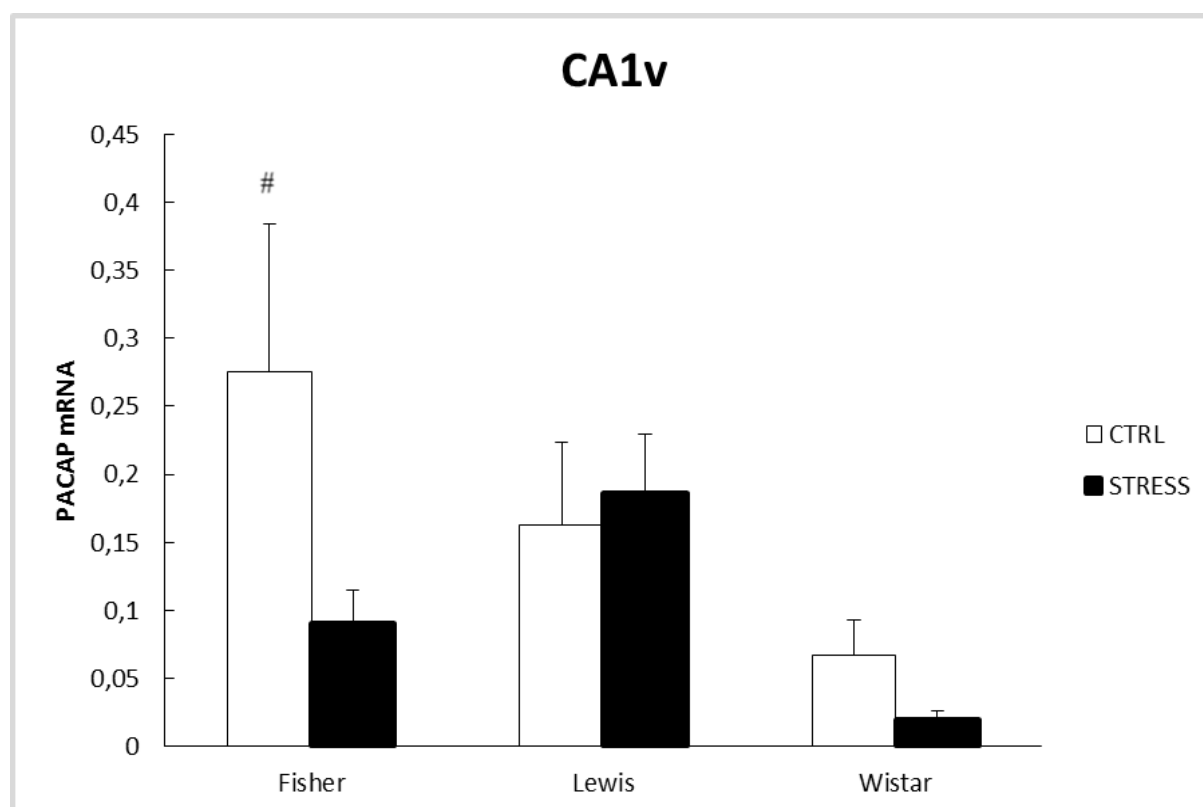
### 6.2.8. Hladiny PACAP

Dvourozměrná analýza rozptylu prokázala v CA1 dorzální oblasti hippocampu významný efekt stresu (ANOVA:  $p < 0,05$ ) a zároveň signifikantní vliv genotypu (ANOVA:  $p < 0,001$ ). Mezi oběma faktory nebyla prokázána žádná vzájemná interakce (ANOVA:  $p > 0,05$ ). Post hoc analýza zjistila, že u kontrolních LEW potkanů dochází v CA1d oblasti v porovnání s kontrolními F344 i WIS potkany k signifikantně ( $p < 0,05$ ) nižší expresi PACAP mRNA (Obr. 25).

V CA1 ventrální oblasti ANOVA prokázala pouze vliv genotypu ( $p < 0,05$ ), vliv stresové zátěže či interakce mezi oběma faktory zaznamenána nebyla ( $p > 0,05$ ). Post hoc analýza prokázala u kontrolních F344 potkanů signifikantně vyšší hladiny PACAP mRNA v porovnání s kontrolními potkany kmene WIS ( $p < 0,05$ ).



Obr. 26. Relativní hladiny PACAP mRNA v CA1 dorzální oblasti hippocampu. Kontrolní jedinci Lewis potkanů mají nejnižší hladinu exprese PACAP mRNA v porovnání s kontrolními Fisher i Wistar potkany na hladině významnosti # $p < 0,05$ .



Obr. 27. Relativní hladiny PACAP mRNA v CA1 ventrální oblasti hippocampu. U kontrolních Fisher potkanů jsou v porovnání s kontrolními Wistar potkany signifikantně vyšší hladiny PACAP mRNA (# $p < 0,05$ ).

Situace, které vyvíjejí nátlak na náš organismus, mohou ovlivnit řadu procesů probíhajících v těle. Na změnu pak reaguje HPA osa aktivací tvorby a sekrece glukokortikoidů kůrou nadledvin. Stejně reakce jsme docílili u potkanů po aplikaci stresové zátěže. Z výsledků je patrné, že se uvolňování kortikosteronu v porovnání s kontrolními nestresovanými jedinci rapidně zvýšilo u všech tří testovaných kmenů. Nutno dodat, že na tyto hladiny nemá vliv fyziologické zvýšení produkce glukokortikoidů cirkadiálním rytmem. Koncentrace kortikosteronu v krvi byly stanovované v 11:00 hodin dopoledne. Vzhledem k tomu, že jsou potkani nokturní živočichové, uvolňování glukokortikoidů dosahuje svého maxima v pozdních odpoledních hodinách. Poločas rozpadu ( $T_{1/2}$ ) kortikosteronu je přibližně 50 minut, takže naměřená koncentrace není výsledkem celého tří denního procesu stresování, ale jedná se víceméně o aktuální hladinu kortikosteronu v krvi. Cirkulací je kortikosteron po uvolnění nadledvinami roznášen po celém organismu. Většina kortikosteronu je v krvi navázána na krevní přenašeče, CBG či albumin. Ty mají vyšší afinitu pro aktivní formy glukokortikoidů, v krvi proto najdeme větší množství volného 11-dehydrokortikosteronu než aktivního kortikosteronu. K tomu, aby mohl i 11-dehydrokortikosteron u příslušných buněk vyvolat odpověď, je nutné, aby byl převeden do funkční formy. Tato konverze je katalyzovaná enzymem 11 $\beta$ -HSD1. Jedná se o NADPH-dependentní reduktázu, která mění neaktivní formy glukokortikoidů v podobě 11-oxo derivátů (kortizon, 11-dehydrokortikosteron) na aktivní 11-hydroxy deriváty (kortizol, kortikosteron) (Tomlinson et al., 2004). U dospělých jedinců ho najdeme exprimovaný v celém mozku včetně hippokampu. Je jedním z velmi důležitých článků ovlivňujícím průběh a dopad celé stresové reakce. Zajímalo nás, jak se změní hladina tohoto enzymu po stresové reakci, kdy významně stoupají hladiny glukokortikoidů v těle. Prostřednictvím kvantitativní RT-PCR jsme změřili jeho hladiny mRNA u kontrolních a stresovaných jedinců v CA1d a CA1v oblasti hippokampu. Naše výsledky ukazují, že stresová zátěž nemá žádný vliv na expresi 11 $\beta$ -HSD1 v CA1d oblasti. Naopak v CA1v oblasti došlo u F344 potkanů vlivem stresové reakce ke zvýšení produkce 11 $\beta$ -HSD1 mRNA. Dorey et al. (2012) v hippokampu měřili v jednotlivých časových úsecích hladiny kortikosteronu po stresové zátěži. Zjistil, že nejdříve dochází ke zvýšení koncentrace kortikosteronu v dorzálním hippokampu, kde maxima dosahují v čase 60 minut po zátěži. Naopak ve ventrálním hippokampu dochází k maximálnímu zvýšení hladiny kortikosteronu až během 105 minuty po aplikaci stresové

zátěže. Proto je i návrat k normálním hladinám kortikosteronu vidět nejdříve v dorzálním hipokampu, a to přibližně po 105 minutě. Ve ventrálním hipokampu se hladiny kortikosteronu vrací ke svým normálním hladinám až po 120 minutě. My jsme hladiny 11 $\beta$ -HSD1 mRNA stanovovali až po 2 hodinách stresové zátěže. Za předpokladu, že je součástí promotoru genu 11 $\beta$ -HSD1 GRE element, díky kterému by byla exprese enzymu přímo regulována glukokortikoidy je možné, že v CA1d oblasti již v tuto dobu nebyly dostačující hladiny kortikosteronu, které by nadále stimulovaly zvýšenou expresi 11 $\beta$ -HSD1 mRNA a proto zde nevidíme žádný vliv. Naopak v CA1v jsou v danou dobu ještě poměrně vysoké hladiny kortikosteronu, které zvyšují expresi 11 $\beta$ -HSD1 mRNA. Tuto úvahu podporuje například práce Rajan et al. (1996), kde uvádějí, že v primární hipokampální buněčné kultuře zaznamenali přímý vliv dexametasonu (syntetický glukokortikoid) na expresi 11 $\beta$ -HSD1. Ostatní důkazy ovšem spíše nasvědčují, že regulace exprese enzymu 11 $\beta$ -HSD1 je nepřímá, závislá na transkripčních faktorech C/EBP $\alpha$  a C/EBP $\beta$  (Williams et al., 2000; Sai et al., 2008). Je tedy pravděpodobnější, že rozdíl v expresi tohoto enzymu mezi dorzální a ventrální CA1 oblastí hipokampu je dán jejich odlišnými úlohami. CA1d oblast je spojena především s kognitivními funkcemi a zodpovídá u potkanů například za prostorovou paměť (Jung et al., 1994). CA1v oblast má četné spoje s limbickým systémem, amygdalou a hypothalamem (Dong & Swanson, 2006), ovlivňuje činnost HPA osy a souvisí s emočním chováním (Fanselow & Dong, 2010). Fakt, že ke zvýšení hladin 11 $\beta$ -HSD1 mRNA v CA1v oblasti došlo pouze u F344 potkanů bude dán jejich hyperaktivní HPA osou (Wu & Wang, 2010). Protože jejich hypofýza produkuje zvýšená množství ACTH, nadledviny pod vlivem tohoto hormonu uvolňují více glukokortikoidů. F344 potkani jsou proto velmi vhodným modelem pro studium stresu, i menší zátěž u nich vyvolá silnou odpověď, na rozdíl od WIS a LEW potkanů. Zvýšená exprese 11 $\beta$ -HSD1 mRNA u F344 potkanů může být v CA1v oblasti velmi žádoucí reakcí, protože umožní ukončit stresovou odpověď organismu. Zvýšená aktivita 11 $\beta$ -HSD1 zvýší aktivaci kortikosteroidních receptorů, které svojí činností ve finále sníží uvolňování CRH z PVN, se kterým je ventrální oblast hipokampu propojena, a tak dojde k inhibici HPA osy. Prozatím nejsou dostupné žádné studie, které by informovaly o stresem vyvolané rozdílné expresi 11 $\beta$ -HSD1 mRNA mezi dorzálním a ventrálním hipokampem. Všechny práce, které se tomuto tématu věnují, hipokampus na dorzální a ventrální část nerozdělují. Pokud tedy budeme chtít porovnat naše výsledky s výsledky jiných laboratoří, musíme se zaměřit pouze na vliv stresu na změnu exprese 11 $\beta$ -HSD1 v hipokampu jako celku. Například Shoener et al. (2005) ve své práci uvádí, že po aplikaci stresové zátěže, kterou byl dvouhodinový hypokinetický stres, došlo v hipokampu dospělých



Sprague-Dawley potkanů ke snížení hladin 11 $\beta$ -HSD1 mRNA se statistickou významností  $p < 0,01$ . To se neslučuje s našimi výsledky. Rozdílem mezi naší prací a prací Shoenera je jednak odlišný výběr kmene potkana a především čas odběru tkáně, který prováděli v odpoledních hodinách po 16:00, kdy u nočních živočichů začínají postupně narůstat cirkadiální fyziologické hladiny glukokortikoidů (Carter et al., 2009). Je možné, že vyšší hladiny glukokortikoidů by i v našem případě vedly v CA1d ke snížení exprese 11 $\beta$ -HSD1 mRNA. U F344 potkanů v CA1d oblasti totiž můžeme i z našich výsledků vidět malé snížení hladin 11 $\beta$ -HSD1 mRNA po stresu. Je to ovšem jenom spekulace. Pokud by se množství 11 $\beta$ -HSD1 ve tkáni po stresu opravdu snížilo, nedocházelo by k zvýšené aktivaci kortikosteroidních receptorů a stresová reakce by byla utlumena. Tento mechanismus by pak mohl bránit vlivu stresové reakce na CA1d oblast, čímž by ochránil činnost přítomných neuronů a neurálních spojů, které jsou velmi důležité pro kognitivní funkce.

Dalším naším záměrem bylo zjistit, jak se v CA1d a CA1v oblasti hippocampu mění po stresové zátěži hladiny kortikosteroidních receptorů. Z našich výsledků je patrné, že se koncentrace MR mRNA vlivem stresu nemění ani v CA1d, ani v CA1v oblasti. Ke stejným výsledkům došli i Gómez et al. (1996) či Shoener et al. (2005). Gómez et al. (1996) ovšem s tím rozdílem, že jejich stresová zátěž byla chronická. Přesto se hladiny MR mRNA i po dlouhodobém stresování v celé CA1 hippocampální oblasti pěti testovaných kmenů potkanů snížily pouze o 11 – 13%. Důvodem téměř nulového vlivu stresu na expresi MR v celém hippocampu je úloha těchto receptorů. Ta spočívá v nastavení citlivosti organismu ke stresu (de Kloet et al., 2000). Pokud by se jeho hladiny měnily s každým atakem, organismus by neměl žádné měřítko, jak poznat velikost stresové zátěže. Protože MR mají vyšší afinitu ke glukokortikoidům (oproti GR asi 10x vyšší), reagují na zvýšené hladiny kortikosteronu jako první. Jestliže se koncentrace glukokortikoidů i nadále zvyšují, dochází k postupnému zapojení i GR, které jsou daleko silnějšími aktivátory, popřípadě inhibitory genové exprese. Buňka tak reaguje daleko silnější a dlouhodobější odpovědí.

Dále naše výsledky ukazují signifikantní vliv stresu na expresi GR mRNA v CA1d oblasti. U všech tří kmenů stresová reakce v této oblasti způsobila snížení hladiny exprese GR mRNA. Stejně tak uvádějí Shoener et al. (2005), že po stresové zátěži došlo v hippocampu Sprague-Dawley potkanů ke snížení exprese GR mRNA, a to s významností  $p < 0,001$ . Gómez et al. (1996) chronickou stresovou zátěží dosáhli snížení hladiny exprese GR mRNA v hippocampu o 50 - 60 %. Důvod tohoto poklesu může být spojený s procesem LTP. Podle nejnovějších studií aktivace GR v dorzálním hippocampu vede ke snížení vodivosti

vápenatých iontů, což má za následek snížení LTP a naopak zvýšení LTD, která snižuje schopnost zapamatování si nových informací (Maggio & Segal, 2007b; Maggio & Segal, 2010). Je možné, že se organismus tomuto nechtěnému procesu snaží zabránit. V podstatě se tímto způsobem ochrání dorzální hippocampus před poruchami kognitivních funkcí a naopak se nasměruje vliv stresové reakce do ventrálního hippocampu, kde ke změnám v expresi GR mRNA podle našich výsledků nedochází. Tam je aktivita těchto receptorů naopak velmi důležitá pro ovlivnění činnosti HPA osy. Porovnáním výsledků exprese GR mRNA v CA1d a CA1v oblasti u kontrolních nestresovaných jedinců všech tří kmenů je vidět, že dorzální CA1 oblast exprimuje přibližně 2x vyšší koncentrace mRNA tohoto receptoru. Stejně tak informuje Maggio & Segal (2011) ve své práci, kde navíc uvádí, že naopak CA1v oblast obsahuje vyšší hladiny MR. S tím, ovšem, naše výsledky příliš nekorespondují. Při porovnávání hladin mRNA kortikosteroidních receptorů jsme zjistili, že nejvyšší hladiny GR i MR mají za normálních podmínek potkani kmene Wistar, a to v CA1d oblasti. Tyto vysoké hladiny nebudou pravděpodobně ovlivněny vrozenou aktivitou jejich HPA osy, ale jejich koncentrace bude záviset na jiných genetických vlastnostech.

Kromě hladiny kortikosteroidních receptorů jsme zjišťovali i hladiny CRH receptorů – CRH-R1 a CRH-R2. Zajímalo nás, jaký vliv budou mít stresem zvýšené hladiny CRH na oblast mozku, která sice není přímou součástí HPA osy, ale výrazněji ji spolu s prefrontálním kortexem ovlivňuje. Navíc ligandem pro tyto receptory nemusí být pouze CRH, ale i proteiny označované jako urokortiny. Takže jsme stanovovali i hladiny urokortinu, speciálně urokortinu-2 (UCN-2), který se váže na CRH-R2 receptor (Reyes et al., 2001). Oba dva hormony – CRH i UCN-2 jsou exprimovány v hypothalamu a ovlivňují činnost hypofýzy (Laryea et al., 2012; Chen et al., 2003). U LEW potkanů jsme po stresové reakci nenašli žádné změny v celé CA1 hippocampální oblasti. To také tvrdí většina dalších studií, podle kterých nemá stres na hladinu exprese CRH-R1 žádný vliv. Například Kjaer et al. (2011) aplikací stresové zátěže u Sprague-Dawley potkanů nezjistili žádnou změnu exprese CRH-R1 mRNA v celém hippocampu. Podobně Pournajali-Nazarloo et al. (2009), kteří studovali vliv stresu na hippocampální expresi řady genů včetně CRH-R1 u samic prérinjního hraboše. Ani vlivem akutní stresové zátěže, ani po 4 týdnech chronického stresování neobjevili v hippocampu žádné změny v hladinách CRH-R1 mRNA. Ovšem existují i studie, které uvádějí, že se v hippocampu exprese CRH-R1 po stresové aplikaci snížila. Tyto práce na rozdíl od předcházejících aplikovali stresový stimul v krátké době po narození. Například Amath et al. (2012) podávali v raném postnatálním období myši dávky lipopolysacharidů,

ktelé v hippocampu způsobily snížení exprese CRH-R1. Nejedná se sice o typickou stresovou zátěž, spíše zásah do imunitního systému, ale i pro HPA osu je to jistá výzva. O snížení exprese CRH-R1 mRNA v hippocampu informují i Diamantopoulou et al. (2013), kteří sledovali vliv stresové zátěže (zamezení přístupu k matce) u potkaních mláďat. Z těchto údajů se tedy zdá, že se hladiny CRH-R1 v hippocampu dospělého jedince nemění žádným stresovým podnětem a změny lze navodit pouze aplikací stresové zátěže u mláďat v časném vývojovém období. Ovšem naše výsledky ukázaly změnu exprese CRH-R1 mRNA i u dospělých potkanů. A to u potkanů kmene WIS v CA1d oblasti a u potkanů kmene F344 v CA1v oblasti. U obou dvou kmenů se hladiny CRH-R1 mRNA po stresu významně snížily. Vysvětlení této změny by mohlo souviset s ochrannou reakcí přítomných hippocapálních neuronů. Zvýšená aktivace CRH receptorů totiž ovlivňuje aktivitu přítomných neurotransmiterů a mění tak přenos informace mezi hippocampem a ostatními částmi mozku. Mimo jiné jsme zjistili, že u F344 potkanů najdeme ve ventrální oblasti hippocampu přibližně dvojnásobně vyšší hladiny CRH-R1 mRNA než v CA1d oblasti. To může souviset s jejich hyperaktivní HPA osou, kdy nadprodukcí CRH odpovídají i vyšší koncentrace receptoru právě v oblasti, která je spojena se stresovou dráhou (na rozdíl od CA1d oblasti). Tyto údaje mohou navíc dokládat, proč jsou F344 potkani více náchylní k psychickým poruchám. Ventrální oblast hippocampu je spojena s dalšími částmi limbického systému, které ovlivňují naše pocity a emoce, takže zvýšená aktivace CRH-R1 může zodpovídat za změny v chování, projevy úzkosti a deprese. Naše výsledky dále ukazují, že u většiny jedinců nemá stres významný vliv na expresi CRH-R2 mRNA v CA1d i v CA1v oblasti. Výjimkou je pouze CA1d oblast u WIS potkanů, kde stres hladiny CRH-R2 mRNA navýšil. Podle Kjaer et al. (2011) nemá stresová zátěž u Sprague-Dawley potkanů na expresi hippocapálních hladin CRH-R2 žádný vliv. Pournajali-Nazarloo et al. (2009) akutním stresovým zásahem změny v hladinách CRH-R2 mRNA také nezaznamenali, ale po 4 týdnech stresování dosáhli u prérijních hrabošů zvýšené exprese tohoto receptoru. Když porovnáme hladiny CRH-R1 a CRH-R2 v CA1v oblasti všech tří kmenů potkanů, zjistíme, že je zde daleko vyšší zastoupení CRH-R2 mRNA. To je poměrně zajímavé, protože se v literatuře uvádí, že v hippocampu potkanů a myši sice najdeme oba dva typy receptorů, ovšem s převahou CRH-R1 (Laryea et al., 2012; Sheng et al., 2008). Vyšší hladiny CRH-R2 v hippocampu mají mít pouze opice (Sánchez et al., 1999) a lidi (Hiroi et al., 2001). Hladiny UCN-2 mRNA se po stresové zátěži nezměnily ani v CA1d ani v CA1v oblasti všech testovaných kmenů. Je ale zajímavé pozorovat odlišnou tendenci exprese UCN-2 mRNA po stresové zátěži mezi F344 a LEW potkany. U stresovaných F344 potkanů dochází v CA1d oblasti ke snižování UCN-2 mRNA ( $p \approx 0,1$ ),

zatímco u LEW potkanů se zvyšují ( $p \approx 0,08$ ). Důvodem bude nejpravděpodobněji jejich odlišná aktivita HPA osy. U WIS potkanů totiž není žádná změna v expresi UCN-2 mRNA téměř patrná. Naše výsledky, ale nesouhlasí s výsledky Chen et al. (2003). Podle této práce se v hippocampu myši a člověka nacházejí tzv. UCN-2/GR-pozitivní buněčné linie, které po vystavení zvýšeným hladinám glukokortikoidů zvyšují expresi UCN-2 mRNA.

Vliv CRH v hippocampu nemusí být ovlivněn pouze počtem jeho receptorů, popřípadě množstvím urokortinu, ale zároveň se jeho hladiny mohou měnit činností PAC1-R receptoru (Ghatei et al., 1993). PAC1-R je aktivován ligandem PACAP a v buňce může vyvolat zvýšenou expresi některých genů, včetně genů kódujících CRH a tak zvyšovat jeho hladiny v buňce. Z našich výsledků vyplývá, že se hladiny receptoru i hladiny ligandu PACAP vlivem stresové zátěže nemění ani v CA1d ani v CA1v oblasti hippocampu všech tří kmenů. U LEW potkanů jsme zaznamenali nízkou expresi PAC1-R mRNA, a to v obou oblastech hippocampu. Tyto nízké hladiny receptoru by mohly podporovat sníženou aktivitu jejich HPA osy. PVN hypothalamu LEW potkanů produkuje nízké hladiny CRH (Chikada et al., 2000), pokud mají i nízkou hladinu PAC1-R, který produkci CRH zvyšuje, pak jsou hladiny CRH u LEW potkanů udržovány na nízké hladině i tímto způsobem. HPA osa nemá být jak aktivována a udržuje si tak svou hypoaktivní činnost. Pro takovéto závěry by ale bylo nutné změřit hladiny PAC1-R zejména v hypothalamu. Naše výsledky také ukazují, že celkové množství ligandu PACAP je velmi nízké v CA1v oblasti, v porovnání s hladinami PACAP mRNA v CA1d minimálně 4x nižší, a to u všech tří kmenů. Je zajímavé, že v této oblasti najdeme mnohem vyšší hladiny receptoru PAC1-R než samotného ligandu PACAP (za normálních podmínek i po stresu), kdežto v CA1d je to přesně naopak.

Podle získaných výsledků je možné odpovědět na otázky kladené ve 4. kapitole následujícím způsobem:

**Otázka č. 1: Projeví se aplikace stresové zátěže na lokálním metabolismu glukokortikoidů v CA1 hippokampální struktuře?**

Pokud se zaměříme pouze na kmeny Lewis a Wistar, tak jsme aplikací třídenní stresové zátěže nedocílili žádné významné změny v expresi 11 $\beta$ -HSD1, a to v obou CA1 hippokampálních strukturách. Podobně v CA1 dorzální oblasti hippokampu u Fisher potkanů neměla stresová zátěž žádný významný vliv na expresi 11 $\beta$ -HSD1. Jedinou odlišnost jsme zaznamenali u Fisher potkanů v CA1 ventrální oblasti hippokampu, kde stresová reakce významně zvýšila hladinu exprese 11 $\beta$ -HSD1 mRNA, a s tím tedy i s největší pravděpodobností metabolismus kortikosteronu.

**Otázka č. 2: Bude mít aplikace stresové zátěže vliv na expresi kortikosteroidních receptorů v CA1 hippokampální oblasti?**

Aplikace třídenní stresové zátěže vyvolala u všech tří kmenů potkanů velmi významné snížení exprese glukokortikoidních receptorů v CA1 dorzální oblasti hippokampu. Ve ventrální oblasti neměl stres na hladinu glukokortikoidních receptorů žádný vliv. Při pohledu na hladiny mineralokortikoidních receptorů v obou CA1 hippokampálních strukturách není efekt stresu žádný.

**Otázka č. 3: Ovlivní stresová zátěž v CA1 oblasti hippokampu expresi receptorů spojených s kortikotropin-uvolňujícím hormonem?**

Podle našich výsledků nelze na danou otázku odpovědět jednoznačně. U Lewis potkanů neměla stresová zátěž žádný vliv na změnu exprese obou typů CRH receptorů (CRH-R1 a CRH-R2). Změny jsme nezaznamenali u tohoto kmene ani v CA1 dorzální, ani v CA1 ventrální oblasti hippokampu. Ovšem U Wistar potkanů došlo v dorzální CA1 oblasti hippokampu po účinku stresu ke snížení exprese CRH-R1 mRNA molekul. U Fisher potkanů vyvolal stres snížení exprese CRH-R1 mRNA naopak ve ventrální CA1 oblasti hippokampu. Žádné další změny u obou kmenů stresová zátěž nevyvolala.

**Otázka č. 4: Nalezneme v reakci na stresový stimul mezikmenové rozdíly, resp. vliv genetického pozadí?**

Mezi kmeny jsme našli řadu rozdílů v hladinách jednotlivých transkriptů u kontrolních jedinců. V reakci na stresový stimul jsme mezikmenové rozdíly zaznamenali pouze v některých případech. Například jsme zjistili odlišný efekt stresové zátěže na expresi  $11\beta$ -HSD1 ve ventrální CA1 oblasti hippocampu, kdy u Fisher potkanů vyvolal stres na rozdíl od Lewis a Wistar potkanů zvýšení hladin mRNA molekul tohoto enzymu. Mezikmenové rozdíly na stresový podnět najdeme i v rámci hladin CRH-R1 mRNA. V CA1 dorzální oblasti hippocampu snížil stres u Wistar potkanů, jako u jediného kmene, expresi CRH-R1 mRNA. Naopak ve ventrální CA1 oblasti došlo ke snížení exprese CRH-R1 v reakci na stresový stimul pouze u potkanů kmene Fisher. Žádné jiné mezikmenové rozdíly naše výsledky neprokázaly.

## 9. Seznam použité literatury

---

- Abelson JL, Khan S, Liberzon I, Young EA.** HPA axis activity in patients with panic disorder: review and synthesis of four studies. *Depress Anxiety* 24(1):66-76, 2007.
- Aguilera G.** Corticotropin-releasing hormone, receptor regulation, and the stress response. *Trends Endocrinol Metab* 9(8):329-36, 1998.
- Al-Harbi T, Al-Shaikh A.** Apparent mineralocorticoid excess syndrome: report of one family with three affected children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 25(11-12):1083-8, 2012.
- Amaral DG, Witter MP.** The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31(3):571-91, 1989.
- Amath A, Foster JA, Sidor MM.** Developmental alterations in CNS stress-related gene expression following postnatal immune activation. *Neuroscience* 220:90-9, 2012.
- Amelung D, Hubener HJ, Roka L, Meyerheim G.** Conversion of cortisone to compound F. *J Clin Endocrinol Metab* 13(9):1125-6, 1953.
- Amir-Zilberstein L, Blechman J, Sztainberg Y, Norton WH, Reuveny A, Borodovsky N, Tahor M, Bonkowsky JL, Bally-Cuif L, Chen A, Levkowitz G.** Homeodomain protein otp and activity-dependent splicing modulate neuronal adaptation to stress. *Neuron* 73(2):279-91, 2012.
- Austin MC, Janosky JE, Murphy HA.** Increased corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in monoamine-containing pontine nuclei of depressed suicide men. *Mol Psychiatry* 8(3):324-32, 2003.
- Baker C, Richards LJ, Dayan CM, Jessop DS.** Corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in human T and B cells and macrophages: colocalization with arginine vasopressin. *J Neuroendocrinol* 15(11):1070-4, 2003.
- Beishuizen A, Thijs LG.** Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J Endotoxin Res* 9(1):3-24, 2003.
- Bertagna X, Guignat L.** Approach to the Cushing's disease patient with persistent/recurrent hypercortisolism after pituitary surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 98(4):1307-18, 2013.
- Besedovsky HO, del Rey A.** Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem Res* 36(1):1-6, 2011.
- Blechman J, Lovkowitz G.** Alternative splicing of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor PAC1: Mechanism of fine tuning of brain activity. *Front Endocrinol* 4:55, 2013.
- Bliss TV, Collingridge GL.** A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407):31-9, 1993.

- Breuner CW, Orchinik M.** Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid activation in vertebrates. *J Endocrinol* 175(1):99-112, 2002.
- Brown RW, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR.** Human placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology* 132(6):2614-21, 1993.
- Carter RN, Paterson JM, Tworowska U, Stenvers DJ, Mullins JJ, Seckl JR, Holmes MC.** Hypothalamic-pituitary-adrenal axis abnormalities in response to deletion of 11 $\beta$ -HSD1 is strain-dependent. *J Neuroendocrinol* 21(11):879-87, 2009.
- Cave CB, Squire LR.** Equivalent impairment of spatial and nonspatial memory following damage to the human hippocampus. *Hippocampus* 1(3):329-40, 1991.
- Čenquízca LA, Swanson LW.** Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev* 56(1):1-26, 2007.
- Contoreggi C, Lee MR, Chrousos G.** Addiction and corticotropin-releasing hormone type 1 receptor antagonist medications. *Ann N Y Acad Sci* 1282:107-18, 2013.
- Čihák R, Druga R, Grim M.** Anatomie III. Avicenum, 2004.
- De Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Jöels M.** Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19: 269-301, 1998.
- de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F.** Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6(6):463-75, 2005.
- De Kloet ER, van Acker SA, Sibug RM, Oitzl MS, Meijer OC, Rahmouni K, de Jong W.** Brain mineralocorticoid receptors and centrally regulated functions. *Kidney Int* 57(4):1329-36, 2000.
- Devnath S, Inoue K.** An insight to pituitary folliculo-stellate cells. *J Neuroendocrinol* 20(6):687-91, 2008.
- Diamantopoulou A, Raftogianni A, Stamatakis A, Oitzl MS, Stylianopoulou F.** Effects of denial of reward through maternal contact in the neonatal period on adult hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 38(6):830-41, 2013.
- Dong HW, Petrovich GD, Swanson LW.** Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res Brain Res Rev* 38(1-2):192-246, 2001.
- Dong HW, Swanson LW.** Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. *J Comp Neurol* 494(1):142-78, 2006.
- Dong HW, Swanson LW, Chen L, Fanselow MS, Toga AW.** Genomic-anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(28):11794-9, 2009.



**Dorey R, Piérard C, Chauveau F, David V, Béracochéa D.** Stress-induced memory retrieval impairments: different time-course involvement of corticosterone and glucocorticoid receptors in dorsal and ventral hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 37(13):2870-80, 2012.

**Draper N, Stewart PM.** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J Endocrinol* 186: 251-71, 2005.

**Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, de Kloet ER, Monder C.** Localisation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet* 2(8618):986-9, 1988.

**Elenkov IJ, Webster EL, Torpy DJ, Chrousos GP.** Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. *Ann N Y Acad Sci* 876: 1-11, 1999.

**Fahlbusch FB, Ruebner M, Volkert G, Offergeld R, Hartner A, Menendez-Castro C, Strick R, Rauh M, Rascher W, Dötsch J.** Corticotropin-releasing hormone stimulates expression of leptin, 11 $\beta$ -HSD2 and syncytin-1 in primary human trophoblasts. *Reprod Biol Endocrinol* 10:80, 2012.

**Fanselow MS, Dong HW.** Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65(1):7-19, 2010.

**Feng Y, Huang SL, Dou W, Zhang S, Chen JH, Shen Y, Shen JH, Leng Y.** Emodin, a natural product, selectively inhibits 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and ameliorates metabolic disorder in diet-induced obese mice. *Br J Pharmacol* 161(1):113-26, 2010.

**Frick C, Atanasov AG, Arnold P, Ozols J, Odermatt A.** Appropriate function of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the endoplasmic reticulum lumen is dependent on its N-terminal region sharing similar topological determinants with 50-kDa esterase. *J Biol Chem* 279(30):31131-8, 2004.

**Ganong WF.** Přehled lékařské fyziologie. Galen, 2005.

**Ghatei MA, Takahashi K, Suzuki Y, Gardiner J, Jones PM, Bloom SR.** Distribution, molecular characterization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its precursor encoding messenger RNA in human and rat tissues. *J Endocrinol* 136(1):159-66, 1993.

**Gómez F, Lahmame A, de Kloet ER, Armario A.** Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology* 63(4):327-37, 1996.

**Greicius MD, Krasnow B, Boyett-Anderson JM, Eliez S, Schatzberg AF, Reiss AL, Menon V.** Regional analysis of hippocampal activation during memory encoding and retrieval: fMRI study. *Hippocampus* 13(1):164-74, 2003.

**Hashimoto H, Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Nagata S.** Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuron* 11(2):333-42, 1993.

- Harris HJ, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR, Holmes MC.** Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD)-1 plays a key role in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: analysis of 11 $\beta$ -HSD-1-deficient mice. *Endocrinology* 142: 114-20, 2001.
- Henley DE, Lightman SL.** New insights into corticosteroid-binding globulin and glucocorticoid delivery. *Neuroscience* 180:1-8, 2011.
- Herman JP, McKlveen JM, Solomon MB, Carvalho-Netto E, Myers B.** Neural regulation of the stress response: glucocorticoid feedback mechanisms. *Braz J Med Biol Res* 45(4):292-8, 2012.
- Hiroi N, Wong ML, Licinio J, Park C, Young M, Gold PW, Chrousos GP, Bornstein SR.** Expression of corticotropin releasing hormone receptors type I and type II mRNA in suicide victims and controls. *Mol Psychiatry* 6(5):540-6, 2001.
- Holmes MC, Seckl JR.** The role of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in the brain. *Mol Cell Endocrinology* 248: 9-14, 2006.
- Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB.** Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* 15(10):6340-50, 1995.
- Chan WL, Carrell RW, Zhou A, Read RJ.** How changes in affinity of corticosteroid-binding globulin modulate free cortisol concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 98(8):3315-22, 2013.
- Chen A, Vaughan J, Vale WW.** Glucocorticoids regulate the expression of the mouse urocortin II gene: a putative connection between the corticotropin-releasing factor receptor pathways. *Mol Endocrinol* 17(8):1622-39, 2003.
- Chesnokova V, Melmed S.** Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology* 143(5):1571-4, 2002.
- Cheung TH, Cardinal RN.** Hippocampal lesions facilitate instrumental learning with delayed reinforcement but induce impulsive choice in rats. *BMC Neurosci* 6:36, 2005.
- Chikada N, Imaki T, Harada S, Nakajima K, Naruse M, Yoshimoto T, Seki T, Tanabe A, Takano K.** A defect of lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase gene expression in the paraventricular nucleus of Lewis rats. *Endocr J* 47: 221-9, 2000.
- Cho KH, Chang H, Yamamoto M, Abe H, Rodríguez-Vázquez JF, Murakami G, Katori Y.** Rathke's pouch remnant and its regression process in the prenatal period. *Childs Nerv Syst* 29(5):761-9, 2013.
- Ilin Y, Richter-Levin G.** Enriched environment experience overcomes learning deficits and depressive-like behavior induced by juvenile stress. *PLoS One* 4(1):e4329, 2009.

- Isbrucker RA, Burdock GA.** Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (*Glycyrrhiza* sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. *Regul Toxicol Pharmacol* 46(3):167-92, 2006.
- Izaki Y, Takita M, Nomura M.** Comparative induction of long-term depression between dorsal and ventral hippocampal CA1 in the anesthetized rat. *Neurosci Lett* 294(3):171-4, 2000.
- Jamieson PM, Chapman KE, Edwards CR, Seckl JR.**  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase is an exclusive  $11\beta$ -reductase in primary cultures of rat hepatocytes: effect of physicochemical and hormonal manipulations. *Endocrinology* 136(11):4754-61, 1995.
- Joëls M, de Kloet ER.** Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol* 43(1):1-36, 1994.
- Joëls M.** Steroid hormones and excitability in the mammalian brain. *Front Neuroendocrinol* 18(1):2-48, 1997.
- Joëls M, Krugers HJ.** LTP after stress: up or down? *Neural Plast* 2007:93202, 2007.
- Joëls M, Karst H, DeRijk R, de Kloet ER.** The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* 31(1):1-7, 2008.
- Johnstone HA, Wigger A, Douglas AJ, Neumann ID, Landgraf R, Seckl JR, Russell JA.** Attenuation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: changes in feedforward and feedback mechanisms. *J Neuroendocrinol* 12(8):811-22, 2000.
- Jung MW, Wiener SI, McNaughton BL.** Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. *J Neurosci* 14(12):7347-56, 1994.
- Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos GP.** Reproductive functions of corticotropin-releasing hormone. Research and potential clinical utility of antalarmins (CRH receptor type 1 antagonists). *Am J Reprod Immunol* 51(4):269-74, 2004.
- Kageyama K, Hanada K, Iwasaki Y, Sakihara S, Nigawara T, Kasckow J, Suda T.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates corticotropin-releasing factor, vasopressin and interleukin-6 gene transcription in hypothalamic 4B cells. *J Endocrinol* 195(2):199-211, 2007.
- Kershaw EE, Morton NM, Dhillon H, Ramage L, Seckl JR, Flier JS.** Adipocyte-specific glucocorticoid inactivation protects against diet-induced obesity. *Diabetes* 54(4):1023-31, 2005.
- Kjaer SL, Hougaard KS, Tasker RA, MacDonald DS, Rosenberg R, Elfving B, Wegener G.** Influence of diurnal phase on startle response in adult rats exposed to dexamethasone in utero. *Physiol Behav* 102(5):444-52, 2011.
- Klur S, Muller C, Pereira de Vasconcelos A, Ballard T, Lopez J, Galani R, Certa U, Cassel JC.** Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation. *Hippocampus* 19(9):800-16, 2009.

**Krugers HJ, Alvarez DN, Karst H, Parashkouhi K, van Gemert N, Joëls M.** Corticosterone shifts different forms of synaptic potentiation in opposite directions. *Hippocampus* 15(6):697-703, 2005.

**La Fleur SE, Manalo SL, Roy M, Houshyar H, Dallman MF.** Hepatic vagotomy alters limbic and hypothalamic neuropeptide responses to insulin-dependent diabetes and voluntary lard ingestion. *Eur J Neurosci* 21(10):2733-42, 2005.

**Lahmame A, Grigoriadis DE, De Souza EB, Armario A.** Brain corticotropin-releasing factor immunoreactivity and receptors in five inbred rat strains: relationship to forced swimming behavior. *Brain Res* 750: 285-92, 1997.

**Laryea G, Arnett MG, Muglia LJ.** Behavioral studies and genetic alternations in corticotropin-releasing hormone (CRH) neurocircuitry: Insights into human psychiatric disorders. *Behav Sci* 2(2):135-171, 2012.

**Latif SA, Pardo HA, Hardy MP, Morris DJ.** Endogenous selective inhibitors of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms 1 and 2 of adrenal origin. *Mol Cell Endocrinol* 243(1-2):43-50, 2005.

**Lin H, Hu GX, Guo J, Ge Y, Liang G, Lian QQ, Chu Y, Yuan X, Huang P, Ge RS.** Mono-carbonyl curcumin analogues as 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 23(15):4362-6, 2013.

**Liston C, Cichon JM, Jeanneteau F, Jia Z, Chao MV, Gan WB.** Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance. *Nat Neurosci* 16(6):698-705, 2013.

**Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clewenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T.** Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(3):836-40, 1995.

**Lozano YR, Serafín N, Prado-Alcalá RA, Roozendaal B, Quirarte GL.** Glucocorticoids in the dorsomedial striatum modulate the consolidation of spatial but not procedural memory. *Neurobiol Learn Mem* 101:55-64, 2013.

**Maggio N, Segal M.** Unique regulation of long term potentiation in the rat ventral hippocampus. *Hippocampus* 17(1):10-25, 2007a.

**Maggio N, Segal M.** Striking variations in corticosteroid modulation of long-term potentiation along septotemporal axis of the hippocampus. *J Neurosci* 27(21):5757-65, 2007b.

**Maggio N, Segal M.** Differential modulation of long-term depression by acute stress in the rat dorsal and ventral hippocampus. *J Neurosci* 29(27):8633-8, 2009.

**Maggio N, Segal M.** Corticosteroid regulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *ScientificWorldJournal* 10:462-9, 2010.

**Maggio N, Segal M.** Persistent changes in ability to express long-term potentiation/depression in the rat hippocampus after juvenile/adult stress. *Biol Psychiatry* 69(8):748-53, 2011.

- Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Chrousos G.** Endometrial and placental CRH as regulators of human embryo implantation. *J Reprod Immunol* 62(1-2):53-9, 2004.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH.** Isolation of novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164(1):567-74, 1989.
- Moisan MP, Seckl JR, Edwards CR.** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase bioactivity and messenger RNA expression in rat forebrain: localization in hypothalamus, hippocampus and cortex. *Endocrinology* 127(3):1450-5, 1990.
- Morris DJ, Souness GW, Latif SA, Hardy MP, Brem AS.** Effect of chenodeoxycholic acid on 11beta hydroxysteroid dehydrogenase in various target tissues. *Metabolism* 53(6):811-6, 2004.
- Odermatt A, Atanasov AG, Balazs Z, Schweizer RA, Nashev LG, Schuster D, Langer T.** Why is 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 facing the endoplasmic reticulum lumen? Physiological relevance of the membrane topology of 11 $\beta$ -HSD1. *Mol Cell Endocrinol* 248(1-2):15-23, 2006.
- Oitzl MS, van Haarst AD, Sutanto W, de Kloet ER.** Corticosterone, brain mineralocorticoid receptors (MRs) and the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: the Lewis rat as an example of increased central MR capacity and a hyporesponsive HPA axis. *Psychoneuroendocrinology* 20(6):655-75, 1995.
- Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen, de Kloet ER.** Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev* 34(6):853-66, 2010.
- O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J.** The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol* 64(2):129-55, 2001.
- O'Regan D, Welberg LL, Holmes MC, Seckl JR.** Glucocorticoid programming of pituitary-adrenal function: mechanisms and physiological consequences. *Semin Neonatol* 6(4):319-29, 2001.
- Patel HB, Montero-Melendez T, Greco KV, Perretti M.** Melanocortin receptors as novel effectors of macrophage response in inflammation. *Front Immunol* 2:41, 2011.
- Paterson JM, Holmes MC, Kenyon CJ, Carter R, Mullins JJ, Seckl JR.** Liver-selective transgene rescue of hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 – deficient mice. *Endocrinology* 148(3):961-6, 2007.
- Perederiy JV, Westbrook GL.** Structural plasticity in the dentate gyrus – revisiting a classic injury model. *Front Neural Circuits* 7:17, 2013.
- Persson B, Kallberg Y.** Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact* 202(1-3):111-5, 2013.

- Polito A, Sonnevile R, Guidoux C, Barrett L, Viltart O, Mattot V, Siami S, Lorin de la Grandmaison G, Chrétien F, Singer M, Gray F, Annane D, Brouland JP, Sharshar T.** Changes in CRH and ACTH synthesis during experimental and human septic shock. *PLoS One* 6(11):e25905, 2011.
- Pournajafi-Nazarloo H, Partoo L, Sanzenbacher L, Paredes J, Hashimoto K, Azizi F, Sue Carter C.** Stress differentially modulates mRNA expression for corticotropin-releasing hormone receptors in hypothalamus, hippocampus and pituitary of prairie voles. *Neuropeptides* 43(2):113-23, 2009.
- Raadsheer FC, van Heerikhuizen JJ, Lucassen PJ, Hoogendijk WJ, Tilders FJ, Swaab DF.** Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in the paraventricular nucleus of patients with Alzheimer's disease and depression. *Am J Psychiatry* 152(9):1372-6, 1995.
- Rajan V, Edwards CR, Seckl JR.** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in cultured hippocampal cells reactivates inert 11-dehydrocorticosterone, potentiating neurotoxicity. *J Neurosci* 16(1):65-70, 1996.
- Reul JM, Gesing A, Droste S, Stec IS, Weber A, Bachmann C, Bilang-Bleuel A, Holsboer F, Linthorst AC.** The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *Eur J Pharmacol* 405(1-3):235-49, 2000.
- Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, Hogenesch JB, Gulyas J, River J, Vale WW, Sawchenko PE.** Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5):2843-8, 2001.
- Rusvai E, N aray-Fejes-Tóth A.** A new isoform of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in aldosterone target cells. *J Biol Chem* 268(15):10717-20, 1993.
- Sai S, Esteves CL, Kelly V, Michailidou Z, Anderson K, Coll AP, Nakagawa Y, Ohzeki T, Seckl JR, Chapman KE.** Glucocorticoid regulation of the promoter of the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is indirect and requires CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Mol Endocrinol* 22(9):2049-60, 2008.
- Sandeep TC, Yau JL, MacLulich AM, Noble J, Deary IJ, Walker BR, Seckl JR.** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition improves cognitive function in healthy elderly men type 2 diabetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17):6734-9, 2004.
- Sánchez MM, Young LJ, Plotsky PM, Insel TR.** Autoradiographic and in situ hybridization localization of corticotropin-releasing factor 1 and 2 receptors in nonhuman primate brain. *J Comp Neurol* 408(3):365-77, 1999.
- Sapru HN.** Role of the hypothalamic arcuate nucleus in cardiovascular regulation. *Auton Neurosci* 175(1-2):38-50, 2013.
- Sarkar SB, Sarkar S, Ghosh S, Bandyopadhyay S.** Addison's disease. *Contemp Clin Dent* 3(4):484-6, 2012.
- Scoville WB, Milner B.** Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20(1):11-21, 1957.

**Seckl JR, Dow RC, Low SC, Edwards CR, Fink G.** The 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor glycyrrhetic acid affects corticosteroid feedback regulation of hypothalamic corticotropin-releasing peptides in rats. *J Endocrinol* 136: 471-477, 1993.

**Seckl JR, Walker BR.** Minireview: 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 - a tissue specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 142(4):1371-6, 2001.

**Segal M, Richter-Levin G, Maggio N.** Stress-induced dynamic routing of hippocampal connectivity: a hypothesis. *Hippocampus* 20(12):1332-8, 2010.

**Sheng H, Sun T, Cong B, He P, Zhang Y, Yan J, Lu C, Ni X.** Corticotropin-releasing hormone stimulates SGK-1 kinase expression in cultured hippocampal neurons via CRH-R1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295(4):E938-46, 2008.

**Shoener JA, Baig R, Page KC.** Prenatal exposure to dexamethasone alters hippocampal drive on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adult male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(5):R1366-73, 2005.

**Souness GW, Latif SA, Laurenzo JL, Morris DJ.** 11 $\alpha$ - and 11 $\beta$ -hydroxyprogesterone, potent inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (isoforms 1 and 2), confer marked mineralocorticoid activity on corticosterone in the ADX rat. *Endocrinology* 136(4):1809-12, 1995.

**Spencer RL, Miller AH, Moday H, McEwen BS, Blanchard RJ, Blanchard DC, Sakai RR.** Chronic social stress produces reductions in available splenic type II corticosteroid receptor binding and plasma corticosteroid binding globulin levels. *Psychoneuroendocrinology* 21: 95-109, 1996.

**Squire LR.** Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99(2):195-231, 1992.

**Szczepanska-Sadowska E, Cudnoch-Jedrzejewska A, Ufnal M, Zera T.** Brain and cardiovascular diseases: common neurogenic background of cardiovascular, metabolic and inflammatory diseases. *J Physiol Pharmacol* 61(5):509-21, 2010.

**Teruyama R, Sakuraba M, Wilson LL, Wandrey NE, Armstrong WE.** Epithelial Na<sup>+</sup> sodium channels in magnocellular cells of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(3):E273-85, 2012.

**Thomson M.** The physiological roles of placental corticotropin-releasing hormone in pregnancy and childbirth. *J Physiol Biochem* 69(3):559-73, 2012.

**Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M, Stewart PM.** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr Rev* 25: 831-66, 2004.

**Tonelli L, Webster JI, Rapp KL, Sternberg E.** Neuroendocrine responses regulating susceptibility and resistance to autoimmune/inflammatory disease in inbred rat strains. *Immunol Rev* 184: 203-11, 2001.

**Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H.** Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61(3):283-357, 2009.

**Victor M, Angevine JB Jr, Mancall EL, Fisher CM.** Memory loss with lesions of hippocampal formation. Report of a case with some remarks on the anatomical basis of memory. *Arch Neurol* 5:244-63, 1961.

**Vivar C, van Praag H.** Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Front Neural Circuits* 7:15, 2013.

**Wamsteeker Cusulin JI, Füzesi T, Watts AG, Bains JS.** Characterization of corticotropin-releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of Crh-IRES-Cre mutant mice. *PLoS One* 8(5):e64943, 2013.

**Wang GM, Ge RS, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP.** Expression of 11 $\beta$ -hydroxylase in rat Leydig cells. *Endocrinology* 143(2):621-6, 2002.

**Williams LJ, Lyons V, MacLeod I, Rajan V, Darlington GJ, Poli V, Seckl JR, Chapman KE.** C/EBP regulates hepatic transcription of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. A novel mechanism for cross-talk between the C/EBP and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* 275(39):30232-9, 2000.

**Wong CC, Schumann G.** Integration of the circadian and stress systems: influence of neuropeptides and implications for alcohol consumption. *J Neural Transm* 119(10):1111-20, 2012.

**Wu HH, Wang S.** Strain differences in the chronic mild stress animal model of depression. *Behav Brain Res* 213: 94-102, 2010.

**Wyrwoll CS, Holmes MC, Seckl JR.** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: from zero to hero, a decade of progress. *Front Neuroendocrinol* 32(3):265-86, 2011.

**Yaguchi H, Tsutsumi K, Shimono K, Omura M, Sasano H, Nishikawa T.** Involvement of high density lipoprotein as substrate cholesterol for steroidogenesis by bovine adrenal foliculo-reticularis cells. *Life Sci* 62(16):1387-95, 1998.

**Yau JL, Noble J, Kenyon CJ, Hibberd C, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR.** Lack of tissue glucocorticoid reactivation in 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice ameliorates age-related learning impairments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(8):4716-21, 2001.

**Yau JL, Noble J, Seckl JR.** 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 deficiency prevents memory deficits with aging by switching from glucocorticoid receptor to mineralocorticoid receptor-mediated cognitive control. *J Neurosci* 31(11):4188-93, 2011.

**Yau JL, Seckl JR.** Local amplification of glucocorticoids in the aging brain and impaired spatial memory. *Front Aging Neurosci* 4:24, 2012.



**Internetové zdroje:**

<http://group14.pbworks.com/w/page/16025094/PITUITARY-GIGANTISM>

[http://highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/0071402357/156720/figure321\\_3.html](http://highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/0071402357/156720/figure321_3.html)

<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Steroidogenesis.svg>

<http://www.en.wikipedia.org/wiki/Hypothalamus>