

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



**Vztah metabolismu kortikosteroidů a ontogeneze
ke stresové odpovědi**

**Relationship between corticosteroid metabolism,
ontogenesis and stress response**

Bc. Jakub Makal

Praha, 2013

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

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval lidem, bez jejichž pomoci by tato práce v podobě, v jaké ji zde předkládám, nevznikla. Především bych chtěl poděkovat mému školiteli a vedoucímu práce, panu prof. Jiřímu Páchovi, za vstřícnost, trpělivost a pozitivní přístup, s jakým mi byl vždy ochoten pomoci a poradit při získávání výsledků a sepisování této práce. Dnešní experimentální fyziologie je kolektivní práce, ve které toho samotný jedinec mnoho nezmůže. Proto můj velký dík patří celému kolektivu oddělení Funkce epitelu Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky. Jmenovitě bych chtěl poděkovat lidem, kteří se nějakým způsobem podíleli na získávání výsledků publikovaných v této práci nebo mě seznámili s metodami použitými pro získání těchto výsledků. Děkuji Ivaně Muricové, Janě Musílkové, Martinu Vodičkovi, Matúši Sotákovi, Pavle Šmigolové, Peteru Ergangovi a Petře Klusoňové.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK) – grant č.5366/2012.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 8. 2013

Podpis

Abstrakt

Stres je dnes v západní společnosti široce rozšířený fenomén, který představuje vážný rizikový faktor pro zdraví a životní komfort obyvatel. Jako takový je předmětem zájmu stresové fyziologie, která se snaží popsat děje, ke kterým dochází v organismu při stresové odpovědi, a mechanismy, které vedou k poškozování organismu vlivem stresu. Prvním cílem této práce bylo popsat vliv psychosociálního stresu na organismus. Dalším cílem bylo zjistit, zda stres aplikovaný v raném věku ovlivní stresovou odpověď v dospělosti, a jakou roli v takovém případném ovlivnění hraje enzym glukokortikoidního metabolismu 11 β -HSD1. Za tím účelem byly použity dva různé modely stresu u laboratorního potkana. Jedním z nich byl model sociální anxiety zvaný „rezident-vetřelec“. Naše práce prokázala funkčnost tohoto modelu. Samci potkanů kmene Fisher 344 vystavení psychosociálnímu stresu po sedm po sobě jdoucích dní vykazovali silně zvýšenou koncentraci plazmatického kortikosteronu a zvýšenou expresi genu pro glukokortikoidní receptor v hypofýze. Na základě analýzy chování zvířat jsme zjistili sníženou intenzitu sociálního chování u vetřelců ve srovnání s rezidenty, což svědčí o submisivním postavení vetřelců v modelu „rezident-vetřelec“. Druhým modelem stresu byl třídní stres v juvenilním věku (28. až 30. den věku), následovaný akutním adultním stresem (60. den věku). U samců potkanů kmene Wistar nebyl prokázán vliv juvenilního stresu na míru anxiety ani vliv adultního stresu na pracovní paměť. Neprokázal se ani vliv juvenilního stresu na citlivost osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny ke stresu v dospělosti. Byl však prokázán mírný vliv blokace enzymů glukokortikoidního metabolismu během juvenilního stresu na citlivost osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny ke stresu v dospělosti. Zvířata s aplikovaným blokátorem vykazovala silnější stresovou odpověď po aplikaci adultního stresu. Výsledky našich experimentů dokládají rozdílný efekt působení různých typů stresu. Ukazují také možný způsob, jak ovlivnit dopad působení stresu na organismus.

klíčová slova: stres, stresová odpověď, osa hypothalamus-hypofýza-nadledviny, glukokortikoidy, metabolismus glukokortikoidů, 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1 (11 β -HSD1)

Abstract

Stress is a widespread phenomenon in the western society of these days. It is a risky factor for health and well-being of the majority of people. Based on these facts, it is the main subject for the field of „stress physiology“ research, which aims to study processes occurring during stress response and tries to elucidate mechanisms leading to stress-induced health impairment. The first aim of this thesis was to describe effects of psycho-social stress on organism. The second aim was to find out if can stress applied in juvenile age affect the stress response in adulthood. If so, how is the role of glucocorticoid-metabolism enzyme 11 β -HSD1 in this influence? To answer these questions, two different animal models inducing stress response in the laboratory rat were used. The first one is the model of mild social stress based on the resident-intruder paradigm. Our results show efficacy of this model. Fisher 344 male rats treated under this model for seven consecutive days show highly elevated plasma corticosterone concentrations and elevated expression of the glucocorticoid receptor gene in the pituitary. Behavioral analysis demonstrates a decreased social behavioral profile of the intruders, suggesting submissive social position of these animals in the resident-intruder paradigm. The second model used is three days stress of juvenile rats (from 28 to 30 days of age), followed by acute adult stress (60 days of age). Neither evidence for the effect of juvenile stress on anxiety nor for the effect of adult stress on spatial working memory could be demonstrated. Similarly, no effect of juvenile stress on the sensitivity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis to subsequent adult stress was detected. However, it was significantly proved that the inhibition of the enzymes of glucocorticoid metabolism during juvenile stress had a mild effect on the sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to subsequent adult stress. The rats with applied inhibitor show a stronger response to adult stress compared to non-medicated controls. The results of our experiments show distinct effects of different types of applied stressors on organism. They demonstrate also possible ways how to affect impact of stress on organism's body.

key words: stress, stress response, hypothalamo-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids, metabolism of glucocorticoids, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1)

Obsah:

1. ÚVOD	- 8 -
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	- 9 -
2.1 HISTORIE VÝZKUMU STRESU	- 9 -
2.2 STRES A STRESOVÁ ODPOVĚĎ ORGANISMU	- 11 -
2.3 HPA OSA A JEJÍ EFEKTORY	- 13 -
2.3.1 <i>Regulace HPA osy</i>	- 14 -
2.3.2 <i>Ontogeneze HPA osy</i>	- 16 -
2.4 ENZYMY TKÁŇOVÉHO METABOLISMU GLUKOKORTIKOIDŮ	- 18 -
2.5 BLOKACE ENZYMŮ TKÁŇOVÉHO METABOLISMU GLUKOKORTIKOIDŮ	- 22 -
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	- 25 -
4. MATERIÁL A METODY	- 27 -
4.1 POUŽITÁ ZVÍŘATA	- 27 -
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	- 27 -
4.3 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	- 28 -
4.4 STRESOVÝ PROTOKOL	- 29 -
4.4.1 <i>Uspořádání rezident-vetřelec (model sociální anxiety)</i>	- 29 -
4.4.2 <i>Třídenní stres v juvenilním věku a akutní adultní stres</i>	- 29 -
4.5 BEHAVIORÁLNÍ TESTY	- 30 -
4.5.1 <i>Analýza sociálního chování v uspořádání rezident-vetřelec</i>	- 30 -
4.5.2 <i>Zjišťování lokomoční aktivity a míry anxiety – test otevřeného pole</i>	- 31 -
4.5.3 <i>Zjišťování pracovní paměti – trojramenné bludiště</i>	- 31 -
4.6 PLAZMATICKÁ KONCENTRACE ACTH A KORTIKOSTERONU	- 32 -
4.6.1 <i>Plazmatická koncentrace ACTH</i>	- 32 -
4.6.2 <i>Plazmatická koncentrace kortikosteronu</i>	- 33 -
4.7 KONCENTRACE MRNA VYBRANÝCH GENŮ V HYPOFÝZE	- 34 -
4.7.1 <i>Izolace totální RNA</i>	- 34 -
4.7.2 <i>Příprava cDNA</i>	- 35 -
4.7.3 <i>Kvantitativní RT-PCR</i>	- 35 -
4.8 STATISTIKA	- 36 -
5. VÝSLEDKY	- 37 -
5.1 EXPERIMENT 1: VLIV OPAKOVANÉHO SOCIÁLNÍHO STRESU NA CHOVÁNÍ A NA EXPRESI VYBRANÝCH GENŮ V HYPOFÝZE POTKANA	- 37 -
5.1.1 <i>Vliv opakovaného sociálního stresu na chování</i>	- 37 -
5.1.2 <i>Vliv opakovaného sociálního stresu na plazmatickou hladinu kortikosteronu</i>	- 39 -
5.1.3 <i>Vliv opakovaného sociálního stresu na expresi genů pro CRHr1, POMC, GR a 11β-HSD1 v hypofýze</i>	- 40 -
5.2 EXPERIMENT 2: VLIV STRESU V JUVENILNÍM VĚKU NA EXPRESI VYBRANÝCH GENŮ V HYPOFÝZE, NA STRESOVOU ODPOVĚĎ V DOSPĚLOSTI A NA BEHAVIORÁLNÍ PROJEVY	- 41 -
5.2.1 <i>Vliv stresu v juvenilním věku na hmotnost některých orgánů</i>	- 42 -
5.2.2 <i>Vliv stresu v juvenilním věku na behaviorální projevy</i>	- 43 -
5.2.3 <i>Vliv stresu v juvenilním věku na hladinu kortikosteronu a ACTH bezprostředně po stresu a při stresové odpovědi v dospělosti</i>	- 44 -
5.2.4 <i>Vliv stresu v juvenilním věku na expresi genů pro CRHr1, POMC, GR a 11β-HSD1 v hypofýze</i>	- 46 -
5.2.5 <i>Vliv stresu v juvenilním věku a následného adultního stresu na expresi genů pro CRHr1, POMC, GR a 11β-HSD1 v hypofýze</i>	- 47 -
6. DISKUSE	- 50 -

6.1	EXPERIMENT Č.1	- 50 -
6.2	EXPERIMENT Č.2	- 52 -
7.	ZÁVĚR.....	- 59 -
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 61 -

Seznam použitých zkratek:

zkratka	anglicky	česky
11 β -HSD1	11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1
11 β -HSD2	11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2	11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 2
ACTH	adrenocorticotropic hormone	adrenokortikotropní hormon
AME	apparent mineralocorticoid excess	syndrom zdánlivého nadbytku mineralokortikoidů
ANOVA	analysis of variance	analýza rozptylu
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CNS	central nervous system	centrální nervový systém
CRH	corticotropin-releasing hormone	hormon uvolňující kortikotropin
CRHr1	corticotropin-releasing hormone receptor1	receptor 1 pro hormon uvolňující kortikotropin
CTRL	control group	kontrolní skupina
GA	glycyrrhetic acid	kyselina glycyrrhetinová
GABA	gamma-aminobutyric acid	kyselina gama-aminomáselná
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa
GAS	general adaptation syndrome	všeobecný adaptační syndrom
GR	glucocorticoid receptor	glukokortikoidní receptor
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal	hypothalamus-hypofýza-nadledviny
MCI	mild cognitive impairment	lehká kognitivní dysfunkce
MR	mineralocorticoid receptor	mineralokortikoidní receptor
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
POMC	proopiomelanocortin	proopiomelanokortin
PTSD	post-traumatic stress disorder	posttraumatická stresová porucha
PVN	paraventricular nucleus	paraventrikulární jádro
RT-PCR	real-time polymerase chaing reaction	polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Poznámka: Uvedeny jsou pouze zkratky, které se vyskytují v textu více než jednou.

1. Úvod

Stres je dnes v západní společnosti široce rozšířeným fenoménem. Přesto, že se materiální situace většiny obyvatel západních zemí za poslední půlstoletí výrazně zlepšila, zůstává stres součástí našich životů. To, co se změnilo, je typ stresu, kterému jsou lidé nejčastěji vystaveni. Fyzický stres, způsobený těžkou fyzickou prací, nedostatkem potravy, častými válečnými konflikty nebo infekčními nemocemi, byl nahrazen sice méně nápadným, ale o to nevyzpytatelnějším a hůře uchopitelným stresem psychickým a psycho-sociálním. A tak, aniž by budil tento fenomén výraznou pozornost, stává se jedním z hlavních rizikových faktorů pro zdraví a životní komfort většiny obyvatel. O tom, že si tento problém začínáme alespoň částečně uvědomovat a řešit jej, svědčí například současný rozmach psychosomatické medicíny, která se snaží novými přístupy působit tam, kde jsou dnes klasické obory často bezradné.

Pro smysluplnou a efektivní léčbu zdravotních problémů je zásadní pochopení mechanismů, které způsobují tyto problémy. Není sporu o tom, že stres, zvláště stres chronický, může působit vážné zdravotní problémy. Otázkou je, k jakým procesům v organismu při působení stresu dochází a co konkrétně vede k patologickým změnám. Stres je fyziology intenzivně studován již déle než 70. let, a proto máme dnes dobrou základní představu o tom, co se děje při stresové odpovědi v organismu. Přesto není na poli stresové fyziologie v posledních letech nouze o zásadní objevy. V 90. letech byl popsán význam tkáňového metabolismu při regulaci působení glukokortikoidů, hlavních stresových hormonů uplatňujících se při pozdějších fázích stresové odpovědi. V posledních letech je hojně studován dlouhodobý efekt stresu prodělaného v mládí na fyzické i duševní zdraví stresovaných jedinců. Je totiž známo, že silně stresující zážitky prodělané v dětství jsou spojeny s vyšší prevalencí psychopatologií v dospělosti, zejména s depresí a posttraumatickou stresovou poruchou. Jedním z příznaků deprese bývá dysregulace systémů zprostředkovávajících stresovou odpověď.

Stresová fyziologie se tedy již dostala od přístupu čistě popisného, zaměřujícího se na popis dějů při stresové odpovědi, k řešení komplexnějších otázek. Jak může prodělaný stres dlouhodobě ovlivnit citlivost k dalším stresovým situacím? Jak může stres ovlivnit schopnost učení nebo sociální chování jedince? Je možné zasáhnout (např. medikací) do mechanismů stresové odpovědi, a zvrátit tak negativní dopad stresu na organismus? Příspěvkem k odpovědi na tyto komplikované otázky je i tato práce.

2. Literární přehled

2.1 Historie výzkumu stresu

Stres je fyziology studován již déle než 70 let. Zakladatelskou osobností stresové fyziologie byl Hans Selye (1907 – 1982). Ve svých pracích, publikovaných od 30. let 20. století, formuloval základní představu o tom, co je to stres a jak na něj organismus reaguje (Selye, 1936). Je také autorem základní terminologie tohoto oboru – razil používání termínů stres a stresor, eustres a distres, je autorem konceptu všeobecného adaptačního syndromu (general adaptation syndrome, GAS), jako první popsal osu hypothalamus-hypofýza-nadledviny (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) a rozdělil kortikosteroidy na glukokortikoidy a mineralokortikoidy (Selye, 1950). Přesto, že se od dob Hanse Selye naše znalosti fyziologických dějů probíhajících při stresu neskonale prohloubily a některé jeho představy se ukázaly jako nepřesné, vytvořil Hans Selye paradigmatický rámec, který je platný dodnes a uvnitř kterého probíhá výzkum již déle než půl století.

Hans Selye a Praha

Hans Selye, průkopník výzkumu stresu, získal doktorát z medicíny a chemie na Karlově Univerzitě v Praze v roce 1929. V roce 1931 získal Rockefellerovo stipendium a odebral se na Univerzitu Johna Hopkinse za Atlantický oceán. V Americe pak zůstal až do konce svého života.

Selye je autorem velké části základní terminologie ve fyziologii stresu. Je mu připisováno mimo jiné první použití termínu stres ve významu, v jakém jej známe a používáme dnes. Selye chápal stres jako odpověď organismu na tlak vnějšího prostředí, umožňující organismu tomuto tlaku čelit a přežít. Informace zpochybňující Selyeho prvenství však visí na stěně známého hostince „Uterus“ na pražském Novém Městě, na rohu ulic Viničné, Kateřinské a Lípové. Zde je doslova napsáno:

„V roce 1910 v této restauraci maďarský profesor pražské Ferdinandovy univerzity poprvé na světě použil slovo stress pro stav organismu při přípravě na zvýšený výdej energie, tedy tak, jak je chápáno i nyní. (Převzal je z angličtiny, kde existovalo v jiném významu).

Selye, jemuž je toto prvenství dodnes přisuzováno, měl tehdy jen tři roky. Byl to kanadský lékař rakouského původu. Ale stal se jím v Praze, kde se – asi – o onom použití slova stress dozvěděl.“

Kdo byl onen tajemný maďarský profesor a zda Hans Selye navštěvoval cestou z přednášek hostinec „Uterus“, se autorovi této práce zjistit nepodařilo.

Jednou z představ nejstarší generace stresových fyziologů, se kterou by dnešní odborník jistě nesouhlasil, byl názor, že glukokortikoidy mají stimulační účinky a jednostranně posilují stresovou odpověď. Již na konci 40. let 20. století byl totiž objeven jejich protizánětlivý (imunosupresivní) účinek. Philip S. Hench, Edward C. Kendall a Tadeus Reichstein dostali za tento objev v roce 1950 Nobelovu cenu (Hillier, 2007). Dali totiž lékařům do rukou nesmírně účinný imunosupresivní lék, používaný k léčbě nemocí, jako je autoimunitní rheumatoidní artritida. Glukokortikoidy se tak díky nim staly jednou z nejčastěji předepisovaných skupin léků na světě.

Látkou, kterou objevil v nadledvinách krávy Kendall, uměle ve větším množství syntetizoval organický chemik Sarett a s obrovským úspěchem poprvé použil k léčbě rheumatoidní artritidy lékař Hench, byl kortizon (zvaný tehdy látka E). Nikdo tehdy netušil, že kortizon je ve skutečnosti inaktivní forma hormonu. K tomu, aby se projevil jeho fyziologické účinky, musí být nejprve kortizon v organismu enzymaticky přeměněn na aktivní hormon – kortizol (zvaný historicky látka F). Tuto reakci prokázali při inkubaci kortizonu s jaterním homogenátem až Amelung et al. (1953). Enzymatickou aktivitu odpovědnou za tuto přeměnu lokalizovali v membránových partikulích hepatocytů, nikoli však v mitochondriích.

90. léta přinesla zásadní objev na poli stresové fyziologie – glukokortikoidy, jedna ze dvou hlavních skupin hormonů zprostředkovávajících stresovou odpověď, mohou být přímo v tkáních prereceptorově modifikovány. Nemusí jít přitom pouze o aktivaci inaktivní formy hormonu, jak se tomu děje při terapeutickém podávání kortizonu. Může docházet i k reakci ve směru opačném, při které je účinný hormon kortizol přeměňován na neaktivní kortizon (u hlodavců a některých dalších skupin živočichů je hlavním aktivním glukokortikoidem kortikosteron a jeho neaktivním protějškem β -dehydrokortikosteron). O účincích glukokortikoidů, potažmo mineralokortikoidů, tedy nerozhoduje pouze jejich koncentrace v plazmě, množství transportního proteinu nebo množství a typ receptoru. Samostatnou úroveň regulace je specifický tkáňový metabolismus těchto hormonů. Ten reguluje intracelulární koncentraci aktivního hormonu, který je schopný vázat se na glukokortikoidní nebo mineralokortikoidní receptory a aktivovat je.

2.2 Stres a stresová odpověď organismu

Organismy žijí v prostředí, které podléhá neustálým změnám. Naproti tomu, vnitřní prostředí organismu musí být udržováno co možná nejstabilnější - musí být udržována stálost vnitřního prostředí, homeostáza. Homeostáza se týká takových parametrů, jako je pH tělních tekutin, tělesná teplota, koncentrace glukózy nebo parciální tlak kyslíku. Neschopnost udržet tyto parametry konstantní nebo jen ve velmi úzkém rozmezí hodnot bývá neslučitelná se životem. Z napětí mezi proměnlivostí vnějšího prostředí na jedné straně a potřebou stálosti vnitřního prostředí na straně druhé vzniká požadavek aktivně reagovat na změny okolního prostředí a přizpůsobovat se jim. Tento aktivní proces zajišťující homeostázu se nazývá alostáza (autory konceptu alostázy jsou McEwen & Wingfield, 2003). Zatímco homeostáza se týká systémů, jejichž stabilita je zásadní pro život, alostáza se týká systémů, které tuto stabilitu napomáhají udržovat. Hlavními systémy zapojenými do alostázy jsou systém nervový, humorální a imunitní. Hlavními „vykonavateli“ alostázy v organismu jsou hormony HPA osy (hypothalamic-pituitary-adrenal, hypothalamus-hypofýza-nadledviny), katecholaminy a cytokiny.

Jakýkoli tlak vnějšího prostředí schopný narušit homeostázu můžeme označit jako stresor. Reakci organismu na stresor kompenzující jeho negativní dopady a zvyšující šance na přežití jedince pak označujeme jako stresovou odpověď. Samotné slovo stres může být zavádějící a matoucí, protože bývá používáno v několika různých významech. Může být synonymem pro stresor i pro stresovou odpověď. Dnes bývá navíc význam slova stres běžně zužován na označení stavu psychické zátěže a diskomfortu, který je spojen s životním stylem v západní společnosti. Ze slova stres, podobně jako třeba ze slova deprese, se stalo módní slovo snažící se vystihnout situaci člověka v dnešním světě. Zapomíná se při tom na to, že předešlé generace trpěly v mnohem vyšší míře například podvýživou, nemocemi nebo sociálními konflikty, což je samozřejmě také stres, pouze jiného typu. Je pozoruhodné sledovat, jak se určitý typ stresu, který ze světa dnešního člověka prakticky vymizel, do jeho světa oklikou opět vrací skrze aktivity typu paintball, fotbalové fanouškovství nebo držení půstu a diety.

Stresová reakce organismu představuje sérii dějů, o které se Hans Selye domníval, že je univerzální a neměnná. Selye nazval tento sled adaptivních reakcí na stresor všeobecným adaptačním syndromem (GAS). Rozlišil jeho tři hlavní fáze – poplachovou reakci (general alarm reaction), fázi rezistence a fázi vyčerpání (Selye, 1936). Přestože v základních obrysech se jeví stresová reakce jako univerzální – je například doprovázena vzestupem hladiny týchž

hormonů v témže pořadí, při bližším pohledu zjistíme, že velmi záleží jak na typu aplikovaného stresoru, tak na délce jeho trvání. Na základě toho dochází v organismu ke změnám, které rozhodně nemusejí být univerzální a vždy stejné.

Význam první fáze stresové odpovědi, poplachové reakce, je aktivně čelit akutně hrozícímu nebezpečí. Ke změnám v organismu proto dochází v řádu sekund, jejich hlavním zprostředkovatelem jsou katecholaminy. Noradrenalin figuruje jako neurotransmitter v postgangliových vláknech sympatiku, jež mají svá zakončení přímo v cílových orgánech. Adrenalin je hlavním hormonem vylučovaným z dřene nadledvin do krevního řečiště. Samotná dřeň nadledvin je vlastně sympatickým nervovým gangliem, uzpůsobeným k endokrinní činnosti. Rychlost, s jakou se projeví účinky katecholaminů, je dána tím, že jejich působení je negenomické. Tyto hormony jsou navíc syntetizovány předem a uloženy v buňkách do zásoby, a tak jsou neustále připraveny k okamžitému vylití do synaptické štěrbině či krevního řečiště (Sapolsky et al., 2000).

Prakticky současně s vylitím katecholaminů dochází k uvolnění CRH (corticotropin-releasing hormone, hormon uvolňující kortikotropin) z hypothalamu do hypothalamo-hypofyzárního portálního systému. CRH stojí na počátku systému zvaného HPA osa. To je vedle katecholaminů druhý hormonální systém zajišťující stresovou odpověď organismu. Efektorovými hormony HPA osy jsou glukokortikoidy, syntetizované v kůře nadledvin a uvolňované odsud do krevního řečiště. Účinky glukokortikoidů se projevují až v řádu desítek minut po působení stresoru. HPA osa se tedy uplatňuje v pozdějších fázích stresové odpovědi a je trvale aktivována při působení chronického stresu. Je proto odpovědná za velkou část negativních dopadů chronického stresu na organismus. Účinky glukokortikoidů jsou, na rozdíl od katecholaminů, převážně genomické. Tyto hormony nejsou syntetizovány do zásoby (Sapolsky et al., 2000).

Sympatikus s katecholaminy a HPA osa s glukokortikoidy tedy představují dva rozdílné neurohormonální systémy zajišťující stresovou odpověď organismu. Uplatňují se v různé míře v různých fázích této odpovědi, přičemž sympatikus dominuje v časně fázi a HPA osa v pozdní fázi. Oba systémy jsou však vzájemně propojené, a to na úrovni CNS (centrální nervová soustava). Receptory pro CRH byly nalezeny v LC/NE centru (locus ceruleus-norepinephrine, jádro mozkového kmene podílející se na aktivaci sympatiku). Noradrenergní neurony LC/NE zároveň inervují parvocelulární neurony v PVN hypothalamu (paraventriculární jádro, paraventricular nucleus, nucleus paraventricularis), tedy neurony secernující CRH. Je zde tedy reciproční propojení obou systémů v jejich nejvyšších patrech (Tsigos & Chrousos, 2002). Dobře je znám také permissivní účinek glukokortikoidů na

katecholaminy – přítomnost glukokortikoidů, byť v malém množství, je nezbytná pro to, aby se projevil účinek katecholaminů (Sapolsky et al., 2000).

HPA osa a její regulace jsou hlavním předmětem zájmu experimentální části této práce. Tomuto tématu je proto věnována celá následující kapitola.

2.3 HPA osa a její efekторы

HPA osa je jedním ze dvou neurohormonálních systémů zajišťujících stresovou odpověď organismu. Je tvořena třemi hlavními, hierarchicky uspořádanými centry s endokrinní aktivitou – paraventriculárním jádrem hypothalamu, předním lalokem hypofýzy (adenohypofýzou) a nadledvinami. Každé z center je pod vlivem hormonu uvolňovaného z centra jemu nadřazeného. Z PVN je uvolňován CRH, který stimuluje uvolňování ACTH (adrenokortikotropní hormon) z adenohypofýzy. Konečným efektozem HPA osy jsou glukokortikoidy, uvolňované z kůry nadledvin pod vlivem ACTH. Ty působí zpětnovazebně na nejvyšší centra HPA osy (PVN, adenohypofýza, některá další místa v CNS) a zajišťují zpětnovazebnou regulaci celého systému. V organismu zastávají glukokortikoidy bezpočet funkcí, a receptory pro ně jsou exprimovány takřka ve všech tkáních. Mohou být dvojího typu – mineralokortikoidní receptory (MR) a glukokortikoidní receptory (GR). Při klidové hladině glukokortikoidů v plazmě dochází přednostně k vazbě na MR, protože ty mají ke glukokortikoidům až 10-krát vyšší afinitu než GR (De Kloet et al., 1998). MR mohou být plně saturovány glukokortikoidy již při jejich maximálních klidových koncentracích v rámci běžného cirkadiálního rytmu. Takto aktivované MR zprostředkovávají především permisivní účinky glukokortikoidů (de Kloet et al., 1998, Sapolsky et al., 2000). Naproti tomu GR jsou aktivovány až při zvýšené, stresem indukované koncentraci glukokortikoidů. Zprostředkovávají především supresivní a stimulační účinky těchto hormonů (Sapolsky et al., 2000).

Přestože je HPA osa systémem zprostředkovávající stresovou odpověď organismu, má nezastupitelnou roli i v klidovém stavu, kdy její aktivita zajišťuje udržení bazální hladiny glukokortikoidů v krvi. Ta vykazuje cirkadiální rytmicitu s nejvyšší hladinou před začátkem aktivní periody – u člověka brzo ráno, u potkana večer. Účelem zvýšené hladiny glukokortikoidů v rámci cirkadiálního rytmu je mobilizovat energetické zásoby (katabolické účinky) tak, aby byla energie k dispozici pro fázi zvýšené aktivity (Kalsbeek et al., 1996).

Stresor zvyšuje aktivitu HPA osy, což vede v důsledku k zvýšení koncentrace glukokortikoidů v krvi. Důležité je, že zvýšení aktivity HPA osy může vyvolat jak působení

reálného stresoru, tak pouhé očekávání takového působení. Hovoříme pak o reaktivní, nebo anticipační odpovědi (Herman et al., 2003). Reaktivní odpověď nastává v důsledku reálného narušení homeostázy, o kterém je PVN informováno prostřednictvím somatických nebo viscerálních sensorických drah. Na rozdíl od reaktivní odpovědi nepředchází anticipační odpovědi reálné narušení homeostázy. Je spouštěna na základě vrozeného a druhově specifického programu, nebo na základě paměťové stopy získané podmiňováním. V její iniciaci mají hlavní roli části limbického systému, konkrétně hippocampus, amygdala a prefrontální kůra (Herman et al., 2003).

2.3.1 Regulace HPA osy

Každý funkční systém v organismu musí obsahovat jak mechanismy umožňující jeho aktivaci, tak jeho následné utlumení. Proces ukončení stresové odpovědi je obzvláště důležitý, protože zabraňuje poškození organismu v důsledku chronicky zvýšené hladiny stresových hormonů. K ukončení stresové odpovědi by mělo v ideálním případě docházet bezprostředně po ukončení působení stresoru. V opačném případě, při chronickém spuštění stresové odpovědi, dochází k sebepoškození organismu a porušování homeostázy systémem, který měl původně sloužit k jejímu udržení. Při tlumení aktivity HPA osy se uplatňuje systém negativní zpětné vazby. Glukokortikoidy, konečný produkt HPA osy, působí zpětně v nejvyšších patrech HPA osy a tlumí její aktivitu. Adenohypofýza a PVN hypothalamu představují dvě hlavní místa negativního zpětnovazebného působení glukokortikoidů (De Kloet et al., 1998). Modulační efekt na HPA osu má také působení glukokortikoidů v hippocampu a amygdale, tedy ve strukturách limbického systému. Zdá se, že excitační signály z hippocampu stimulují GABA-ergní neurony hypothalamu, které vysílají inhibiční signál do neuronů PVN a tlumí tak aktivitu HPA osy. Naopak je tomu u amygdaly, kde GABA-ergní neurony jdoucí z amygdaly inhibují GABA-ergní neurony hypothalamu, čímž potlačí jejich inhibiční působení na neurony PVN, což vede k posílení aktivity HPA osy. Signál přicházející z hippocampu tedy HPA osu tlumí, zatímco signál přicházející z amygdaly ji naopak aktivuje. Excitační signály jdoucí z hippocampu jsou vyvolávány vazbou glukokortikoidů na MR. Je-li koncentrace glukokortikoidů natolik vysoká, že se tyto hormony naváží i na nízkoafinní GR, je vysílání signálů z hippocampu potlačeno, a HPA osa přestane být hippocampem tlumena (De Kloet et al., 1998).

Význam negativní zpětné vazby na aktivitu HPA osy byl studován na adrenalectomovaných zvířatech (zvířata s odstraněnými nadledvinami). Odstraněním nadledvin zcela potlačíme produkci glukokortikoidů v organismu, čímž znemožníme jejich

zpětnovazebné tlumení HPA osy. To se projeví prudkým zvýšením produkce CRH (až o 90%, Young et al., 1986) i zvýšením plasmatické hladiny ACTH (Dallman et al., 1987). Hladinu obou hormonů je možné vrátit do normálu umělým podáním glukokortikoidů. Bylo zjištěno, že k navrácení hladiny ACTH u adrenalektomovaných potkanů do normálních hodnot postačuje ráno pouze malé množství kortikosteronu, zatímco večer je potřeba k dosažení stejnému efektu podat větší množství hormonu (Bradbury et al., 1994). Autoři citované studie z toho vyvozují, že zatímco je negativní zpětná vazba ráno zprostředkována vazbou glukokortikoidů pouze na vysokoafinní MR, večer je nutná jejich vazba jak na vysokoafinní MR, tak na nízkoafinní GR. Připomeňme, že u potkanů dosahuje bazální hladina glukokortikoidů nejnižších hodnot ráno a nejvyšších večer, protože jde o zvířata s vrcholem aktivity v nočních hodinách. Je-li tomu skutečně tak a negativní zpětná vazba při bazálních hladinách glukokortikoidů je realizována zejména vazbou na MR, pak je velmi pravděpodobné, že se tak neděje v PVN hypothalamu, kde jsou MR exprimovány jen v zanedbatelném množství. MR jsou, na rozdíl od GR, exprimovány v mozku jen v malém množství v nemnoha strukturách. Jde například o části limbického systému – hippokampus a amygdalu. O inhibičních schopnostech hippokampu na HPA osu, zprostředkovaných vazbou glukokortikoidů na MR, již byla zmínka v předešlém odstavci. Nabízí se proto otázka, zda k negativnímu zpětnovazebnému působení glukokortikoidů nedochází právě v hippokampu. I když by tomu vše dosud řečené nasvědčovalo, Bradbury et al. (1993) tuto domněnku svým experimentem spíše vyvrátili. Ukázali totiž, že přerušení nervového spojení mezi hippokampem a hypothalamem (konkrétně se jednalo o lézi fornixu) nemělo zásadní vliv na fungování negativní zpětné vazby.

V souvislosti s negativní zpětnovazebnou regulací HPA osy je třeba se zmínit o roli enzymu 11 β -HSD1 (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1). Samotný enzym a jeho funkce budou podrobněji popsány v následující kapitole. Zde pouze uvedme, že tento enzym zvyšuje lokální koncentraci aktivních glukokortikoidů ve tkáních, ve kterých je exprimován. Vzhledem k tomu, že je exprimován v mnoha oblastech mozku včetně hypothalamu, hippokampus, hypofýzy a mozkové kůry (Moisan et al., 1990), můžeme právem očekávat, že jeho aktivita bude mít vliv na HPA osu a její regulaci. Tento vliv můžeme přiblížit na modelu myši knock-outované v enzymu pro 11 β -HSD1 (Kotelevtsev et al., 1997). Tyto myši zcela postrádají funkční enzym 11 β -HSD1. Přesto jsou životaschopné a plodné, vykazují však několik abnormalit, mezi něž patří zvětšené nadledviny a zvýšená ranní bazální hladina ACTH a glukokortikoidů. K nárůstu bazální hladiny glukokortikoidů v rámci cirkadiálního rytmu dochází u těchto myši dříve a je u nich tím pádem dříve dosažena fáze plató. Úhrnná

produkce glukokortikoidů za 24 hodin je u těchto myší vyšší než u wild-type myší (Harris et al., 2001). Zdá se velmi pravděpodobné, že zmíněné odlišnosti v aktivitě HPA osy u 11 β -HSD1 knock-outovaných myší jsou způsobeny oslabením negativní zpětné vazby glukokortikoidů. Hladina glukokortikoidů v plazmě je u nich sice zvýšená, pro působení glukokortikoidů je však zásadní jejich intracelulární koncentrace. Ta je u 11 β -HSD1 knock-outovaných myší naopak snižena, protože u těchto myší nedochází k intracelulární aktivaci inaktivních glukokortikoidů. Důsledkem toho je snížená koncentrace glukokortikoidů v centrech negativní zpětné regulace HPA osy, kterými jsou především PVN, hypofýza a části limbického systému.

2.3.2 Ontogeneze HPA osy

HPA osa mláďat se strukturně i funkčně liší oproti dospělcům. V průběhu ontogeneze tak prodělává tento systém podstatné změny. U hlodavců jsou novorozená mláďata hyposenzitivní ke stresu – znamená to, že na stresor reagují jen mírným zvýšením hladiny glukokortikoidů (Vázquez, 1998). To brání výraznému spuštění katabolických dějů, které by bylo v organismu prodávajícím intenzivní růst a vývoj nežádoucí. Zdá se tedy, že mláďata jsou v období kojení (u potkanů přibližně do věku tří týdnů) chráněna vůči vysokým hladinám glukokortikoidů. Výrazný zlom však nastává po odstavu (u potkanů přibližně po dvacátém dnu života). V tomto věku, nazývaném juvenilní věk, vykazuje HPA osa mláďat oslabenou schopnost negativní zpětné regulace prostřednictvím glukokortikoidů. Tentýž stresor vyvolá u juvenilního potkana vyšší nárůst stresových hormonů, než u potkana dospělého. Doba, po kterou je hladina stresových hormonů zvýšená, je navíc u juvenilních jedinců delší, a to až dvojnásobně (Romeo et al, 2004). Také inhibice HPA osy podáním glukokortikoidů před aplikací stresoru není u mláďat po odstavu tak účinná jako u dospělců (Vázquez & Akil, 1993). Můžeme tvrdit, že juvenilní potkani jsou náchylnější ke stresu nežli potkani dospělí a jejich organismus je během stresu vystaven vyšším koncentracím stresových hormonů po delší dobu. Věk mezi odstavem a pubertou představuje u potkana ke stresu senzitivní období.

Již v mnoha pracích bylo prokázáno, že zážitky prodělané v raném věku působí v organismu dlouhodobé změny, které se mohou projevit až s odstupem času v dospělosti (například Levine, 1957; Plotsky & Meaney, 1993). Zvířata, která byla v raném věku vystavena silnému stresoru, mohou v dospělosti vykazovat horší schopnost učit se, mohou mít vyšší míru anxiety a pozměněnou citlivost ke stresorům ve srovnání s jedinci, kteří stresoru v mládí vystaveni nebyli. Většina dosud provedených experimentů se zaměřila na časný postnatální věk pokusných zvířat, tedy na období od narození do odstavu (u potkanů přibližně

první tři týdny života). Nejčastěji používaným stresorem bývá izolace mláďat od matky. V citované studii použili Plotsky a Meaney potkany staré dva dny. Rozdělili je do tří skupin, přičemž zvířata v první skupině byla kontrolní, zvířata ve druhé skupině byla každý den na 15 min izolována od matky a zvířata ve třetí skupině byla každý den izolována na 180 min od matky. Tato procedura trvala dvanáct dní, tedy do čtrnáctého dne věku zvířat. Poté, co zvířata dosáhla dospělosti (věk šedesát dní), bylo u nich zjišťováno množství mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina) pro CRH v hypothalamu. Zatímco zvířata z druhé skupiny vykazovala snížené množství transkriptu pro CRH oproti kontrolám, zvířata ze třetí skupiny měla naopak množství transkriptu pro CRH signifikantně zvýšené. Zvířata byla v dospělosti také vystavena hypokinetickému stresu. Ukázalo se, že nárůst koncentrace glukokortikoidů v krevní plazmě u zvířat z druhé skupiny byl signifikantně nižší oproti oběma ostatním skupinám. Uvedené poznatky svědčí o tom, že faktory působící na organismus v raných fázích života mohou dlouhodobě pozměnit citlivost HPA osy. Nejen, že prodělaný silný stres může její citlivost zvýšit, ale i naopak, mírný stres může dlouhodobě snížit citlivost ke stresorům.

Ve shodě s poznatky o tom, že věk mezi odstavem a pubertou představuje u potkanů ke stresu senzitivní období, stresovali Avital a Richter-Levin (2005) 28-denní potkany. Jejich přístup se tedy vymyká zavedenému modelu stresování velmi mladých, neonatálních mláďat. Stresovaná zvířata byla vystavena opětovnému stresu v dospělosti (věk 60 dnů). Cílem experimentu bylo zjistit, zda stres v mládí ovlivní stresovou odpověď v dospělosti, a zda je rozhodující věk zvířat při aplikaci prvního stresoru. Ukázalo se, že zvířata, která byla vystavena jak juvenilnímu, tak adultnímu stresu, vykazovala v dospělosti vyšší míru anxiety oproti zvířatům, která byla vystavena pouze juvenilnímu stresu, pouze adultnímu stresu, nebo byla intaktní. Dvakrát stresovaná zvířata vykazovala lepší výsledky při učení v Morrisově vodním bludišti než ostatní skupiny. Na základě těchto výsledků však nebylo možné říci, zda juvenilní věk při aplikaci prvního stresoru je skutečně podstatným faktorem. Proto byla zařazena ještě jedna skupina zvířat, která byla poprvé stresována až ve věku 60 dnů, a opakovaně stresována po měsíci, tedy ve věku 90 dnů. Zvířata, jež byla vystavena prvnímu stresoru již v juvenilním věku, byla stresem ovlivněna významněji, což se projevilo v adultním věku jak vyšší mírou anxiety, tak lepšími výsledky v Morrisově vodním bludišti. Z uvedených výsledků můžeme vyvodit několik obecných závěrů. Zatímco anxiety bývá u zvířat vystavených juvenilnímu a následně adultnímu stresu vždy zvýšená, schopnost učení velmi závisí na typu a intenzitě aplikovaného stresoru. Zdá se, že některé mírnější typy stresorů mohou schopnost učení ovlivňovat pozitivně, zatímco silné stresory vedou téměř vždy ke kognitivním dysfunkcím. Věk stresovaných zvířat je z hlediska dlouhodobých změn

v organismu podstatný, přičemž juvenilní jedinci jsou k těmto změnám náchylnější než jedinci adultní.

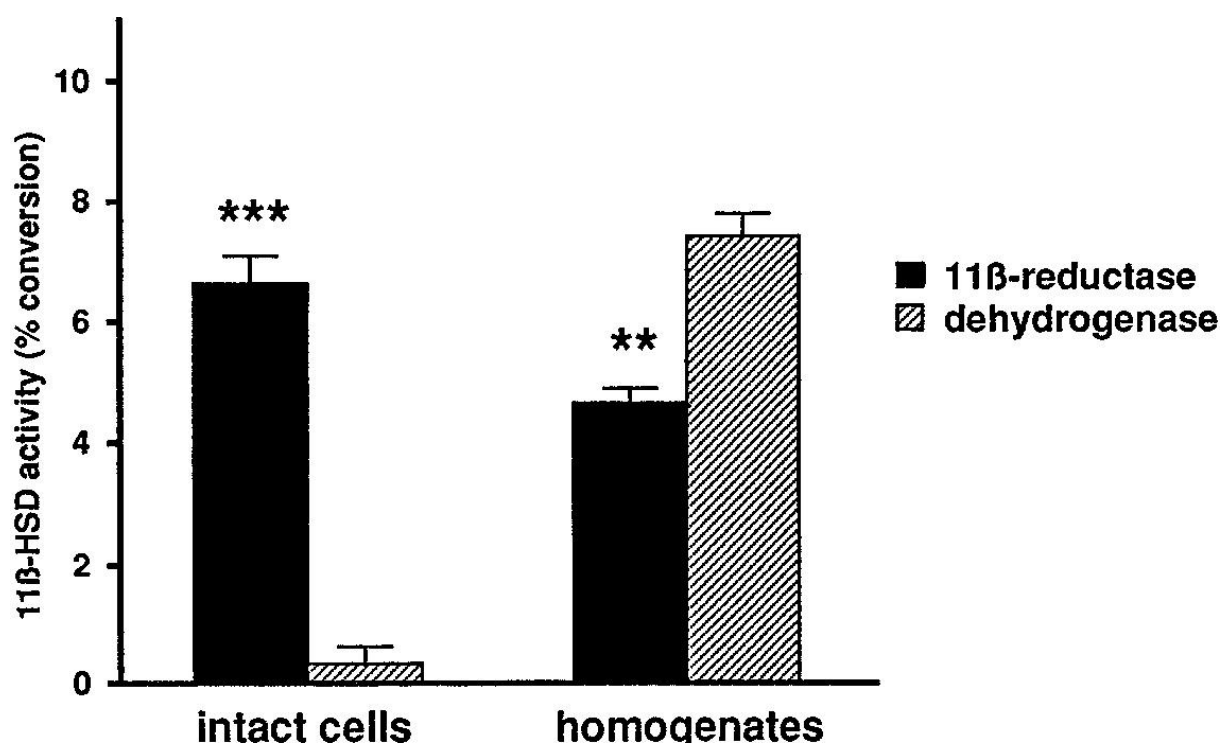
Jaká je podstata změn, ke kterým dochází pod vlivem stresu u mladých zvířat a které pak mohou přetrvat až do dospělosti? Jaké změny v nervové tkáni jsou odpovědné za to, že zvířata vystavená v mládí stresu mohou v dospělosti vykazovat horší schopnost učení, vyšší míru anxiety a pozměněný charakter stresové odpovědi? Klíč k těmto otázkám nacházíme v působení glukokortikoidů na nervovou tkáň. Glukokortikoidy působí morfologické a elektrofyziologické změny nervové tkáně, což je nejlépe zdokumentováno na hippocampu (Kerr et al., 1991; shrnuto v přehledovém článku McEwen, 1999). Tyto změny jsou přirozenou součástí procesu stárnutí, jsou však urychlovány vyššími, stresem indukovanými koncentracemi glukokortikoidů, což právě dokazuje citovaná studie. Zvýšeným hladinám glukokortikoidů je připisován negativní vliv na kognitivní funkce, který se při dlouhodobém vystavení neuronů glukokortikoidům projevuje jako „mild cognitive impairment“ (MCI). Vliv glukokortikoidů na morfologii nervové tkáně byl znám již dlouho, efekt těchto změn na behaviorální projevy popsali jako první až Dachir et al. (1993). Ve svém experimentu implantovali pokusným zvířatům pelety s pomalu se uvolňujícím kortikosteronem, čímž dosáhli dlouhodobého zvýšení hladiny tohoto hormonu v krvi zvířat. Zvýšení hladiny kortikosteronu bylo srovnatelné s účinky mírného stresu. Zvířata s implantovanými peletami vykazovala deficity kognitivních funkcí při pokusu v osmiramenném bludišti. Vztah hladiny glukokortikoidů, morfologie hippocampu a kognitivních funkcí byl popsán také na lidech, a to v pět let trvající studii provedené Lupien et al. (1998). Byla nalezena korelace mezi dlouhodobě zvýšenou hladinou kortizolu, zmenšeným objemem hippocampu (až o 14 % oproti kontrolní skupině) a zhoršením kognitivních funkcí na hippocampu závislých.

Účinek glukokortikoidů na nervovou tkáň má podle tradičního pojetí charakter převrácené U- křivky (Diamond et al., 1992). Znamená to, že střední hladiny glukokortikoidů mají na funkce nervové tkáně pozitivní účinek, zatímco příliš nízké a zejména příliš vysoké hladiny těchto hormonů působí negativně. Role glukokortikoidů ve vztahu k nervové tkáni není tedy čistě negativní, jejich přítomnost (v nezvýšeném množství) je naopak ke správnému fungování nezbytná.

2.4 Enzymy tkáňového metabolismu glukokortikoidů

Dosud byly popsány dva enzymy, které zabezpečují tkáňový metabolismus glukokortikoidů - 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1 a typu 2 (11 β -HSD1 a 11 β -

HSD2). **11 β -HSD1** byla izolována jako první, a to z jater potkana (Lakshmi & Monder, 1988). Jde o nízkoafinní enzym (K_M pro kortikosteron = 1,83 μ M, Lakshmi & Monder, 1988) schopný obousměrně katalyzovat přeměnu kortizonu na kortizol nebo kortikosteronu na 11-dehydrokortikosteron. Tento enzym tedy vykazuje jak reduktázovou, tak dehydrogenázovou aktivitu, a jeho kofaktorem je NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfát). Přestože v homogenizované tkáni *in vitro* převažuje dehydrogenázová aktivita, v neporušených buňkách jednoznačně převažuje reduktázová aktivita, jak vidíme na obrázku č.1 (Rajan et al., 1996, Seckl, 1997). Znamená to, že *in vivo* zvyšuje 11 β -HSD1 lokální intracelulární koncentraci aktivních glukokortikoidů a tím umožňuje aktivaci relativně nízkoafinních glukokortikoidních receptorů (viz. Obrázek č.2). Činí tak v mnoha tkáních – typicky v játrech a tukové tkáni, dále v pohlavních žlázách, sliznici dělohy, stěnách cév a některých částech mozku. Zatímco v kůře nadledvin se 11 β -HSD1 nachází ve všech třech vrstvách, ve dřeni nadledvin nebyla detekována.



Obrázek č.1: Aktivita enzymu 11 β -HSD1 v intaktních hippokampálních buňkách a v homogenátu z hippokampálních buněk.

(převzato a upraveno podle Seckl, 1997)

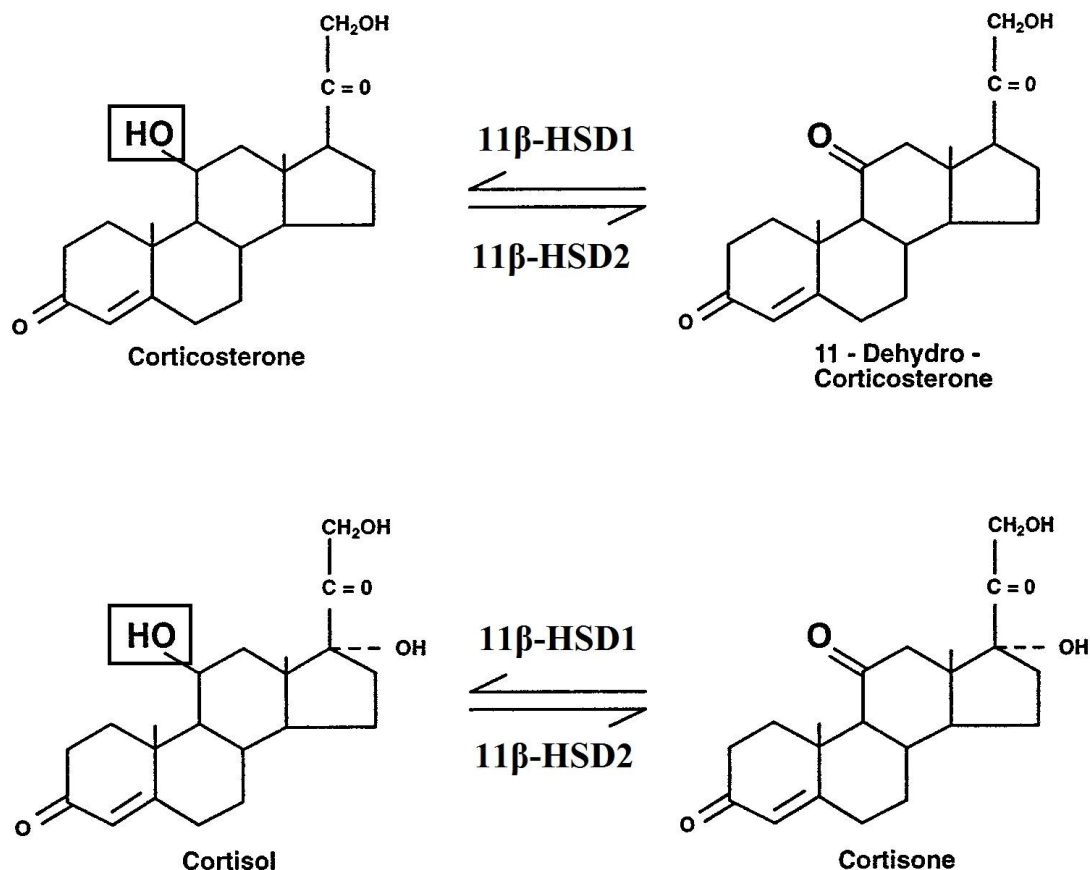
Zatímco v buněčném homogenátu převažuje u enzymu 11 β -HSD1 (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1) dehydrogenázová aktivita, v intaktních buňkách v buněčné kultuře jednoznačně převažuje

aktivita reduktázová. Původně byla aktivita enzymu 11 β -HSD1 zkoumána ve tkáňových homogenátech, což vedlo k chybnému závěru, že tento enzym převážně inaktivuje aktivní hormony. Později se však ukázalo, že zásadní význam pro činnost 11 β -HSD1 má mikroprostředí intaktních buněk, ve kterých se chová 11 β -HSD1 jako reduktáza. Proto enzym 11 β -HSD1 *in vivo* katalyzuje téměř výhradně přeměnu inaktivních glukokortikoidů na aktivní hormony.

Druhým izoenzymem schopným metabolizovat glukokortikoidy v tkáních je **11 β -HSD2**. Byla izolována ze sběracího kanálku ledviny králíka, tedy z typické cílové tkáně pro mineralokortikoidy. Jde o vysokoafinní enzym (K_M pro kortikosteron = 25,9 nM) s výhradně dehydrogenázovou aktivitou *in vivo* (Rusvai & Naray-Fejes-Toth, 1993). Znamená to, že 11 β -HSD2 výlučně inaktivuje aktivní glukokortikoidy – mění kortizol na kortizon nebo kortikosteron na 11-dehydrokortikosteron (viz. Obrázek č.2). Jejím kofaktorem je NAD⁺. Kolokalizace 11 β -HSD2 s mineralokortikoidními receptory vypovídá o fyziologické roli tohoto enzymu. Již před objevem enzymu 11 β -HSD2 bylo známo, že MR váže přibližně se stejnou afinitou jak glukokortikoidy, tak mineralokortikoidy. Bylo zřejmé, že specifita tkání pro mineralokortikoidy musí být zajištěna jinak, než na úrovni receptorů. Aniž by byl znám přesný mechanismus, byla navržena hypotéza o enzymatické inaktivaci glukokortikoidů v mineralokortikoidních tkáních (Funder et al., 1988). Ta se s objevem izoenzymu 11 β -HSD2 potvrdila. 11 β -HSD2 inaktivuje glukokortikoidy v buňce, čímž je vyřadí z kompetice o vazebná místa na MR a umožní vazbu výhradně mineralokortikoidům. Děje se tak v tkáních cílových pro mineralokortikoidy, jako jsou distální tubulus a sběrací kanálek ledvin, tlusté střevo a slinné žlázy. Placenta je jedinou tkání, ve které je exprimována 11 β -HSD2, avšak nejsou s ní koexprimovány MR (Diederich et al. 2000). Placenta je zároveň nejbohatším zdrojem tohoto enzymu (Shams et al. 1998). Inaktivace maternálních glukokortikoidů v placentě má uchránit fetus před jejich příliš vysokými koncentracemi, které by měly za následek zpomalení vývoje plodu (Benediktsson et al., 1997).

S výjimkou placenty platí, že tam, kde je exprimována 11 β -HSD2, jsou zároveň exprimovány MR. Neplatí však závislost opačná – ne ve všech tkáních, ve kterých jsou exprimovány MR, je zároveň exprimována 11 β -HSD2. Existují proto tkáně, ve kterých se na MR váží glukokortikoidy a aktivují je, aniž by se jednalo o patologický stav. Protože MR mají vyšší afinitu ke glukokortikoidům ve srovnání s GR (de Kloet et al., 1998), jsou ve tkáních s koexpresí MR a GR obsazovány přednostně MR. Systém dvou různých typů receptorů umožňuje citlivěji reagovat na změny koncentrace glukokortikoidů, a především umožňuje rozlišovat klidové koncentrace glukokortikoidů od koncentrací stresem

indukovaných. Příkladem tkáně, v níž není exprimována 11 β -HSD2 a ve které se glukokortikoidy váží jak na MR, tak na GR, je hippocampus (například Herman et al, 1989).



Obrázek č.2: Reakce, kterých se jako katalyzátory účastní enzymy tkáňového metabolismu glukokortikoidů.

(převzato a upraveno podle Seckl, 1997)

Aktivní glukokortikoidy, kortizol a kortikosteron, mají na 11. uhlíku hydroxylovou skupinu (označena obdélníkem). Dojde-li k oxidaci této skupiny na oxo skupinu, stává se hormon inaktivním – z kortizolu vzniká kortizon a z kortikosteronu 11-dehydrokortikosteron. Enzym 11 β -HSD1 (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1) katalyzuje *in vivo* přeměnu inaktivních hormonů na jejich aktivní formu. Enzym 11 β -HSD2 (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 2) katalyzuje reakci *in vivo* ve směru opačném, inaktivuje tedy aktivní glukokortikoidy. Poměr kortizolu a kortikosteronu je druhově specifický. Zatímco u člověka se vyskytuje prakticky výhradně kortizol, u myši a potkana je hlavním aktivním glukokortikoidem kortikosteron.

2.5 Blokace enzymů tkáňového metabolismu glukokortikoidů

Jako nescifický blokátor enzymů kortikosteroidního metabolismu, včetně obou izoenzymů 11 β -HSD, může být použita kyselina glycyrrhetinová (GA) nebo její syntetický analog karbenoxolon (Latif et al., 1990, Jellinck et al., 1993). Prekurzorem kyseliny glycyrrhetinové je kyselina glycyrrhizinová, látka obsažená v kořenu lékořice (*Glycyrrhiza sp.*). Je známo, že požití většího množství lékořice vyvolá podobné příznaky, které se objevují při patologickém stavu zvaném „apparent mineralocorticoid excess“ (AME). AME je vzácné autozomálně recesivní onemocnění, při kterém nefunkční 11 β -HSD2 není schopna inaktivovat glukokortikoidy v tkáních cílových pro aldosteron (Stewart et al., 1988, White et al., 1997). Tím se ztrácí selektivita těchto tkání pro aldosteron a MR jsou trvale aktivovány vazbou s glukokortikoidy. Tento stav můžeme popsat jako pseudohyperaldosteronismus. K jeho typickým příznakům patří hypokalemie a hypernatremie spojená s hypertenzí.

Protože 11 β -HSD1 je exprimována v mnoha oblastech mozku, zahrnujících hypothalamus, hippokampus, hypofýzu a mozkovou kůru (Moisan et al., 1990), je obzvláště zajímavé sledovat efekty její blokace na nervovou tkáň *in vitro*, případně na některé kognitivní funkce *in vivo* – na paměť, prostorovou orientaci či behaviorální projevy. Zdá se, že zatímco blokace 11 β -HSD2 navozuje stavy podobné některým patologiím, blokace 11 β -HSD1 naopak pomáhá patologickým stavům předcházet. V nervové tkáni má dlouhodobé vystavení vysokým hladinám glukokortikoidů negativní vliv na funkci neuronů. Stejně jako v jiných tkáních, také v nervové tkáni působí 11 β -HSD1 jako reduktáza a zvyšuje lokální koncentraci aktivních glukokortikoidů (Rajan et al., 1996). Rajan et al. ukázali, že neurotoxický efekt na buněčné kultuře z fetálního hippokampu se projeví jak po podání kortizolu, tak kortizonu. Podání blokátoru 11 β -HSD1 karbenoxolonu však neurotoxický účinek kortizonu zcela potlačilo, což ukazuje na klíčovou roli 11 β -HSD1 v aktivaci inaktivních glukokortikoidů v hippokampu. Pro experimentátory byl v polovině devadesátých let překvapením samotný fakt, že 11 β -HSD1 funguje v intaktních neuronech jako reduktáza. Očekávali totiž, že enzymy glukokortikoidního metabolismu budou v neuronech inaktivovat glukokortikoidy a tak buňky chránit před negativním účinkem jejich vysoké hladiny. Dodejme, že 11 β -HSD2 není ve většině oblastí CNS exprimována. Její exprese je omezena pouze na oblasti cílové pro aldosteron, řídící hospodaření s vodou a ionty (Roland et al. 1995).

Jako nesmírně užitečný model pro pochopení fyziologických rolí 11 β -HSD1 se ukázala být myš knock-outovaná v genu pro tento enzym. Knock-out genu pro 11 β -HSD1

v podstatě simuluje specifickou, úplnou a ireverzibilní blokaci tohoto enzymu v celém organismu, a dává nám představu, jaký by taková blokace měla efekt *in vivo* (Kotelevtsev et al., 1997). Přestože 11 β -HSD1 u těchto myší zcela chybí, jsou to zvířata životaschopná, plodná a na první pohled se neliší od wild-type myší. Při podrobení testům v Morrisově vodním bludišti bylo však zjištěno, že staré 11 β -HSD1 knock-outované myši vykazují lepší schopnost učit se než stejně staré wild-type myši (Yau et al., 2001). Stáří zvířat v citované studii bylo 18 až 20 měsíců. Snížení schopnosti učit se v pokročilém věku bylo popsáno u myší, potkanů i lidí (u lidí je označováno jako „mild cognitive impairment“, MCI) a bývá připisováno dlouhodobému vystavení neuronů zvýšeným hladinám glukokortikoidů. Přestože plasmatická hladina kortikosteronu je u myší s knock-outovaným genem pro 11 β -HSD1 po celý život zvýšená, intracelulární koncentrace kortikosteronu v hippocampu je u nich naopak nižší než u wild-type myší. Právě v dlouhodobě snížené intracelulární koncentraci kortikosteronu v hippocampálních neuronech u knock-outovaných myší spatřují autoři citované studie příčinu jejich rezistence vůči MCI v pokročilém věku. Dalším dokladem efektu blokace 11 β -HSD1 na kognitivní funkce je práce, kterou publikovali Sandeep et al. (2003). Jejich studie je o to zajímavější, že byla provedena přímo na lidech. Blokace enzymu bylo dosaženo orálním podáváním karbenoxolonu v množství 100 mg třikrát denně po dobu čtyř týdnů. Pokusné osoby byly ve věkovém průměru lehce nad 60 let. Pro potlačení nežádoucích vedlejších účinků způsobených blokací 11 β -HSD2 bylo účastníkům experimentu podáváno lehké diuretikum amilorid. Po čtyřech týdnech aplikace karbenoxolonu byly osoby podrobeny sérii testů zjišťujících kognitivní schopnosti. Ukázalo se, že karbenoxolon signifikantně zvýšil plynulost verbálního projevu u jedné skupiny osob a verbální paměť u druhé skupiny. Sandeep et al. přisuzují tento úspěch snížené koncentraci aktivních glukokortikoidů v neuronech oblastí CNS odpovědných za verbální projevy.

Je znám ještě jeden potenciálně terapeutický účinek blokace enzymu 11 β -HSD1. Není jej dosaženo blokací nervové 11 β -HSD1, jak tomu bylo ve výše uvedených případech, nýbrž je realizován blokací 11 β -HSD1 v játrech. Efekty takové blokace byly opět popsány na modelu myši knock-outované v genu pro 11 β -HSD1. K jejím fenotypovým znakům patří totiž rezistence vůči stresem a nadváhou vyvolané hyperglykémii. Glukokortikoidy v játrech spouštějí expresi genů kódujících enzymy nutné pro glukoneogenezi a glykogenolýzu. Při nefunkční 11 β -HSD1 se nevytvoří v jaterních buňkách dostatečně vysoká koncentrace aktivních glukokortikoidů nutná k aktivaci těchto enzymů (Holmes et al., 2001, Kotelevtsev et al., 1997). Na základě těchto poznatků se začalo uvažovat o specifické blokaci 11 β -HSD1

jako o možné terapii metabolického syndromu. Ten zahrnuje celý soubor příznaků, přičemž jedním z nich je právě hyperglykémie.

Z výše uvedeného je zřejmé, že blokáce enzymů tkáňového metabolismu představuje efektivní způsob ovlivnění působení glukokortikoidů. Jeví se jako nadějná forma terapie metabolického syndromu a kognitivních dysfunkcí v pokročilém věku. Bude však nutné vyvinout blokátor specifický pro 11 β -HSD1, který neovlivní činnost 11 β -HSD2 a bude mít tím pádem méně vedlejších účinků. Žádoucí by také byla možnost blokovat enzym pouze v konkrétní tkáni, a ne systémově v celém organismu.

3. Cíle diplomové práce

Experimentální část této diplomové práce je rozdělena do dvou hlavních celků. Jedná se o dvě skupiny experimentů, které budu pro zjednodušení nazývat experiment č.1 a experiment č.2.

Cílem první skupiny experimentů (experiment č.1) je za použití vhodného modelu psychosociálního stresu popsat vliv psychosociálního stresu na chování a na fyziologické parametry pokusných zvířat. V konkrétních bodech jsou cíle experimentu č.1 následující.

- Na základě rozboru chování pokusných zvířat určit, která skupina zvířat vykazuje známky sociální dominance a která sociální submisivity. Rozbor behaviorálních projevů by měl pomoci určit, zda je zvolený model sociálního stresu funkční, a měl by pomoci s kvantifikací síly navozeného psychosociálního stresu.
- Na základě stanovení hladiny stresových hormonů kvantifikovat sílu navozeného psychosociálního stresu. Porovnat hladinu stresových hormonů s výsledky behaviorální analýzy a zjistit případné korelace.
- Popsat vliv psychosociálního stresu na expresi genů klíčových pro regulaci aktivity HPA osy v hypofýze.

Druhá skupina experimentů (experiment č.2) je poněkud obsáhlejší, protože cíle, které má ambici splnit, jsou komplikovanější a komplexnější. Na počátku těchto experimentů stojí hypotéza, že stres aplikovaný v raném věku ovlivňuje dlouhodobě citlivost HPA osy ke stresu. Je-li tomu skutečně tak, mělo by se to u zvířat podrobených stresu v raném věku projevit pozměněnou stresovou odpovědí na stresor aplikovaný v dospělosti. Potvrdit to či vyvrátit je prvním cílem experimentu č.2.

Druhým velkým tématem je role enzymu 11 β -HSD1, zabezpečujícího tkáňový metabolismus glukokortikoidů, ve zpětnovazebné regulaci HPA osy. Existují doklady pro to, že enzym 11 β -HSD1 je do regulace HPA osy zapojen (viz. kapitola č.2 „Literární přehled“). Formulovali jsme proto hypotézu, podle které narušení glukokortikoidního metabolismu během aplikace stresoru v raném věku bude mít vliv na změnu citlivosti HPA osy způsobenou tímto stresem. To by se mělo projevit na stresové odpovědi při aplikaci stresoru v dospělosti. Potvrdit to či vyvrátit je druhým cílem experimentu č.2.

V konkrétních bodech jsou cíle experimentu č.2 následující:

- Zjistit, zda se stres v raném věku a na něj navazující stres v dospělosti projevují na kognitivních funkcích a na míře anxiety. Zjistit, zda blokáce

enzymu 11 β -HSD1 pozmění vliv stresu na kognitivní funkce a na míru anxiety zvířat.

- Na základě hladiny stresových hormonů popsat aktivitu HPA osy, a to u všech skupin zvířat. Popsat vliv stresu v raném věku, vliv blokace enzymu 11 β -HSD1 a vliv stresu v dospělém věku na aktivitu HPA osy.
- Popsat vliv stresu v raném věku, vliv blokace enzymu 11 β -HSD1 a vliv stresu v dospělém věku na expresi genů klíčových pro regulaci aktivity HPA osy v hypofýze.

4. Materiál a metody

4.1 Použitá zvířata

Všechna zvířata použitá v experimentech byla chována za standardních podmínek při teplotě 22 °C a světelném režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Byla krmena standardní laboratorní dietou s příjmem potravy a vody *ad libitum*. Usmrcení potkanů bylo prováděno dekapitací po inhalační anestezii isofluranem. Krev byla uspaným potkanům odebírána kardiální punkcí. Po usmrcení byly odebrané orgány uloženy do tekutého dusíku k pozdějšímu zpracování.

Nakládání se zvířaty bylo schváleno Odbornou komisí při Fyziologickém ústavu AVČR a probíhalo v souladu se zákonem České národní rady č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání.

V experimentu č.1 (psychosociální stres v modelu „rezident-vetřelec“) byli použiti samci potkanů kmene Fisher 344 (n = 21; Charles River, Německo). V den zahájení experimentu byla zvířata stará 65 dní. Experimentu předcházely tři týdny aklimatizace zvířat. Zvířata byla náhodně rozdělena do 3 skupin po 7 zvířatech – kontroly, rezidenti a vetřelci. Potkani Fisher 344 jsou inbredním kmenem potkanů. Jejich HPA osa je hypersenzitivní ke stresu, což je také důvod, proč byl právě tento kmen použit v experimentu č.1.

V experimentu č.2 (třídenní juvenilní stres a akutní adultní stres) byli použiti samci potkanů kmene Wistar (n = 120; Fyziologický ústav AV, Česká republika). Při třídenním juvenilním stresu byla zvířata stará 28 až 30 dnů, a byla usmrcena ve 30. dnu věku. Při adultním stresu byla zvířata stará 60 dnů, a byla usmrcena tentýž den. Potkani Wistar jsou outbredním kmenem, běžně používaným v biologickém i medicínském výzkumu. Aktivita jejich HPA osy nevykazuje žádné abnormality.

4.2 Použité chemikálie

Následuje seznam použitých chemikálií, seřazený abecedně podle dodavatelů:

- Abbott (Green Oaks, IL, USA):
isofluran
- Applied Biosystems (Foster City, CA, USA):
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor,
TaqMan Gene expression Master Mix , TaqMan Gene Expression Assays pro

11HSD1 (kat.č. Rn00567167-m1), GR (kat.č. Rn 00561369-m1), CRHr1 (kat.č.Rn 00578611-m1), POMC (kat.č.Rn 00595020-m1) a Pre-DevelopedTaqMan Rat GAPDH (kat.č. 4352338E), dNTP

- MP Biomedicals (Orangeburg, NY, USA):
kortikosteron ¹²⁵I RIA Kit
- Penta Chemicals (Praha, Česká republika):
ethanol
- Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA, USA):
ACTH EIA Kit
- Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA):
K₂EDTA solution, GeneElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit, 18β-glycyrrhetinová kyselina (kat.č. G1,010-5)

4.3 Použité přístroje

Následuje seznam použitých přístrojů, seřazený abecedně podle výrobců:

- Applied Biosystems (Foster City, CA, USA):
AbiPrism 7000 Sequence Detection System Instrument; ViiA 7 Real-Time PCR System
- Biosignal Group (New York, NY, USA):
iTrack (trekovací zařízení pro „openfield“)
- Bio-Tek (Winooski, VT, USA):
Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader
- Eppendorf (Hamburg, Německo):
MasterCycler
- GmCLab Gilson (Middleton, WI, USA):
stolní centrifuga
- IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Německo):
vortex MS2 minishaker
- Perkin Elmer (Waltham, MA, USA):
gamma-counter
- Roche Diagnostics (Mannheim, Německo):
MagnaLyser
- Sartorius AG (Göttingen, Německo):

analytické váhy

- Sigma Zentrifugen GmbH (Osterode am Harz, Německo):
laboratorní centrifuga 3K18
- Thermo Scientific (Waltham, MA, USA):
spektrofotometr Nanodrop ND-1000

4.4 Stresový protokol

4.4.1 Uspořádání rezident-vetřelec (model sociální anxiety)

Koncepce tohoto modelu byla převzata z práce Mitchell & Redfern (2005). Stresová procedura byla prováděna vždy dopoledne (mezi 9. a 12. hodinou). Samotné sedmidenní stresové procedury předcházela sedmidenní izolace rezidentů. Každý rezident byl chován odděleně od ostatních zvířat ve své vlastní kleci. Izolace má u rezidentů jednak navodit stav sociální deprivace, jednak vytvořit asymetrické postavení rezidentů vůči vetřelcům v domácí kleci rezidenta. Oboje by mělo být motivací pro rezidenty ke zvýšené sociální aktivitě. Vetřelci byli chováni společně v klecích po třech až čtyřech. Po sedm po sobě jdoucích dnů byl každý den do klece k rezidentovi umístěn vetřelec na dobu 30 min. Rezident a vetřelec se nikdy předtím nesetkali, a zvířata byla k sobě umístěována tak, aby se spolu konkrétní rezident a konkrétní vetřelec setkali vždy pouze jednou. Po ukončení každého sezení byli vetřelci vráceni do své původní skupiny, zatímco rezidenti byli nadále drženi izolovaně po jednom každý ve své kleci. První a sedmý den stresového protokolu byl pořízen 15 min dlouhý videozáznam ze společného pobytu rezidentů a vetřelců v jedné kleci, sloužící k analýze sociálního chování zvířat. Nebyl zjištěn rozdíl v hmotnosti rezidentů (222.1 ± 1.0 g) a vetřelců (218.5 ± 1.5 g) na konci sedmidenního stresového protokolu.

4.4.2 Třídenní stres v juvenilním věku a akutní adultní stres

Třídenní stres v juvenilním věku představoval tři různé stresové procedury, vykonané ve třech po sobě jdoucích dnech. Postup byl s drobnými úpravami převzat z práce Ilin & Richter-Levin (2009). Akutní adultní stres představovalo 15 min trvající vynucené plavání, které použili ve své práci jako adultní stres například Maggio & Segal (2011). Konkrétní podoba stresových procedur byla následující:

- **1. den (věk 28 dnů):** 10 min vynuceného plavání v plastové nádobě o průměru 30 cm a výšce 50 cm. Nádoba byla do výšky 40 cm naplněna vodou o teplotě 22 °C. Výška vody znemožňovala potkanům odpočinek.

- **2. den (věk 29 dnů):** Potkani byli umístováni na plošinu o rozměrech 12 x 12 cm, připevněnou na podstavec do výšky 70 cm. Po dobu umístění na platformě byli potkani vystaveni silnému umělému světlu (600 až 850 lx). Potkani byli na platformu umístění třikrát za sebou vždy na 30 min. Mezi sejmutím a následným umístěním byla vždy 1 h trvající pauza, celá procedura tedy trvala 3,5 h.
- **3. den (věk 30 dnů):** Potkani byli umístěni do plastových krabiček o rozměrech 10 x 4,5 x 3 cm. Ty znemožňovaly potkanům otočit se a omezovaly jejich pohyb do stran, aniž by jim působily jiný diskomfort (hypokinetický stres). V krabičkách strávili potkani 2 h.
- **akutní adultní stres (věk 60 dnů):** Akutním stresem v dospělosti bylo vynucené plavání, realizované stejným způsobem, jako stres v 28. dnu věku. Plavání trvalo 15 min.

Některým zvířatům byla před každou aplikací juvenilního stresu podána kyselina glycyrrhetinová, blokátor enzymů 11 β -HSD, zapojených do metabolismu glukokortikoidů. GA byla podávána intraperitoneálně vždy 2 h před započítím stresové procedury. Ostatním skupinám bylo intraperitoneálně vpraveno pouze samotné vehikulum, ve kterém byla GA rozpouštěna (olej).

Po první a druhé stresové proceduře byli potkani vždy vráceni do svých původních klecí. Stres byl aplikován zvířatům z každé skupiny paralelně, aby nezůstala některá zvířata v kleci osamocena.

4.5 Behaviorální testy

4.5.1 Analýza sociálního chování v uspořádání rezident-vetřelec

Pořízené videozáznamy ze společného pobytu rezidentů a vetřelců v jedné kleci 1. a 7. den stresové procedury byly použity k analýze sociálního chování zvířat. Vyhodnocení prováděli dva zkušení experimentátoři za použití specializovaného softwaru pro evaluaci chování Observer (Noldus Information Technology, Wageningen, Nizozemské království). Sociální chování bylo vyhodnocováno zvlášť u rezidentů a zvlášť u vetřelců. Byly rozlišovány následující typy sociálního chování: pronásledování (*following/chasing*; pronásledování jednoho zvířete druhým), tahání za srst (*grabbing*; jedno zvíře tahá a kouše

srst druhého zvířete, nejčastěji v oblasti krku), stavění se do vyvýšené pozice (*on-top posture*; jedno zvíře se dostane nad druhé, nejčastěji tak, že na něj položí přední končetiny), hrabání (*digging*; hrabání v substrátu předními končetinami, zadními končetinami nebo hlavou) a zápasení (*wrestling*; konflikt, při němž se zvířata přetlačují, atakují končetinami a kousou). Chování typu *wrestling* nebylo jako jediné skórováno zvlášť pro rezidenty a zvlášť pro vetřelce, neboť není možné určit původce tohoto chování. U jednotlivých typů chování byly měřeny dva parametry – celková doba trvání daného typu chování a počet, kolikrát byl daný typ chování realizován.

4.5.2 Zjišťování lokomoční aktivity a míry anxiety – test otevřeného pole

Potkani byli po jednom umístění do kruhové arény s šedou barvou povrchu, obehnané průhledným plexisklem (*openfield*). Kruhový prostor měl průměr 82 cm a byl osvětlen tlumeným světlem (85 až 105 lx). Prostor arény byl pomyslně rozdělen na dvě části – centrální část arény a tigmotaktickou zónu, širokou 11,6 cm od okraje arény.

V tomto testu byly měřeny dva parametry – celková dráha v metrech (která je mírou lokomoční aktivity) a dráha v centrální části bludiště v metrech (která je mírou anxiety potkanů). Každý potkan byl do arény umístěn na 20 min. Ke sledování jeho dráhy byl použit systém iTrack (Biosignal Group).

4.5.3 Zjišťování pracovní paměti – trojramenné bludiště

V 61. dnu věku, tedy den po akutním adultním stresu, byla zvířata podrobena testu pracovní paměti v trojramenném bludišti (*Y-maze*). Tento test je zavedeným testem prostorové a pracovní paměti u potkanů, a je podrobně popsán například v přehledovém článku Hughes (2004). Přírozenou vlastností potkanů v trojramenném bludišti je alternovat. Alternace nastává tehdy, dojde-li při trojici vstupů do ramen ke vstupu do třech různých ramen. Nezáleží přitom na pořadí vstupu do ramen, ale na tom, aby se neopakoval vstup do téhož ramene. Výstupní hodnotou tohoto testu je % uskutečněných alternací z maximálního možného počtu alternací. Maximální možný počet alternací je roven celkovému počtu vstupů do ramen – 2. Procenta uskutečněných alternací byla počítána podle následujícího vzorce, převzatého z práce Hidaka et al. (2011):

$$\text{alternace v \%} = [(\text{počet alternací}) / (\text{celkový počet vstupů do ramen} - 2)] \times 100$$

Vyšší procento alternací znamená lepší pracovní paměť. Kromě % alternací jsme počítali ještě celkový počet vstupů do ramen. Tato hodnota nevypovídá nic o pracovní paměti, ale může být použita jako ukazatel lokomoční a explorační aktivity.

Test v trojramenném bludišti byl prováděn ve večerních a nočních hodinách (9. až 12. hodina večerní), což je pro potkany doba zvýšené aktivity. Trojramenné bludiště bylo zhotoveno z hnědého plastového materiálu o rozměrech 40 cm x 15 cm x 35 cm. Každá dvě ramena mezi sebou svírají úhel 120°. Každý z potkanů byl na začátku testu umístěn do centrálního prostoru bludiště, s hlavou orientovanou ve směru jednoho z ramen. Za vstup do ramene byla považována pozice, při které se potkana ocitl všemi čtyřmi končetinami uvnitř ramene. Každý potkan byl ponechán v bludišti po dobu 8 min. Test byl prováděn za velmi slabého osvětlení, dosahujícího uvnitř bludiště hodnoty 5 lx.

4.6 Plazmatická koncentrace ACTH a kortikosteronu

Krev byla odebírána kardiální punkcí potkanům v isofluranové narkóze těsně před usmrcením do zkumavek s K₂EDTA. Zkumavky byly stočeny na centrifuze 10 min při otáčkách 3000 g. Krevní plazma byla poté uskladněna při teplotě -80 °C až do doby, než byly provedeny eseje ke zjištění hladiny hormonů.

4.6.1 Plazmatická koncentrace ACTH

Plazmatická koncentrace ACTH byla měřena s použitím komerčně dostupného EIA kitu dodávaného firmou Phoenix Pharmaceuticals (Burlingame, CA, USA). EIA (enzyme immunoassay) je metoda určená k detekci a měření koncentrace specifických peptidů. Děje se tak pomocí navázání protilátky a reakce katalyzované křenovou peroxidázou. Probíhající enzymatická reakce mění barvu vzorků. Toho je možné využít pro konstrukci standardní křivky z roztoků o známých koncentracích. Postup při měření koncentrace byl následující.

Na začátku měření jsme zředili koncentrát pufru dodávaného v kitu přidáním 950 ml destilované vody. Rozpustili jsme standard proteinu dodávaného v kitu přidáním 1 ml pufru, zvortexovali jsme a nechali 10 min stát. Následovala příprava ředící řady standardu proteinu. Připravili jsme vzorky v koncentracích 25; 5; 1; 0,2; 0,04 ng/ml. Rozpustili jsme primární protilátku dodávanou v kitu přidáním 5 ml pufru. Nechali jsme zkumavku 5 min stát a pak promíchali. Přesně to samé jsme udělali také s biotinylovaným proteinem, dodávaným v kitu. To samé jsme provedli také s pozitivní kontrolou, avšak tentokrát jsme přidali 200 µl pufru. Následovalo pipetování vzorků do 96-jamkové destičky. Do každé jamky bylo napipetováno

50 μ l tekutiny. Dvě jamky zůstaly prázdné jako blank, do dvou jamek jsme napipetovali samotný pufr, do deseti jamek jsme napipetovali ředící řadu standardu proteinu (v dupletech), do dvou jamek jsme napipetovali pozitivní kontrolu a do zbývajících jamek naše vzorky (v dupletech). Do všech jamek kromě blanku jsme napipetovali 25 μ l primární protilátky, následovalo přidání 25 μ l biotinylovaného proteinu opět do všech jamek kromě blanku. Utěsnili jsme destičku a nechali ji inkubovat 2 h při pokojové teplotě (22 °C) za stálého míchání (350 rpm). Centrifugovali jsme peroxidázu dodávanou v tomto kitu (3000 rpm, 5 s), přidali jsme 12 μ l peroxidázy do 12 μ l pufru a zvortexovali. Po ukončení inkubace destičky jsme každou jamku 4krát po sobě vymyli přidáním 350 μ l pufru. Do každé jamky jsme přidali 100 μ l roztoku peroxidázy a nechali destičku inkubovat po dobu 1 h za stejných podmínek, jako při předchozí inkubaci. Po inkubaci následovalo opět 4krát vmytí každé jamky přidáním 350 μ l pufru. Přidali jsme do každé jamky 100 μ l substrátu peroxidázy a inkubovali po dobu 1 h tak, aby byla destička chráněna před světlem. Po skončení inkubace byla reakce ukončena přidáním 100 μ l s kitem dodávané HCl. Posledním krokem bylo změření absorbance při 450 nm na přístroji Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Bio-Tek (Winooski, VT, USA)).

4.6.2 Plazmatická koncentrace kortikosteronu

Plazmatická koncentrace kortikosteronu byla měřena s použitím komerčně dostupného RIA kitu dodávaného firmou MP Biomedicals (Orangeburg, NY, USA). RIA (radioimmunoassay) je metoda používaná k měření koncentrace antigenu za pomoci protilátek a radioaktivně značeného antigenu. Postup při měření koncentrace byl následující.

Nejprve jsme v poměru 1:200 zředili 10 μ l potkaního séra ve 2 ml tzv. steroidního diluentu. 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 jsme napipetovali 0,1 ml zředěné kontroly a zředěného (1:200) potkaního séra. Do všech zkumavek bylo přidáno 0,2 ml radioaktivně značeného kortikosteronu (corticosterone-I125). Nakonec jsme do všech zkumavek s výjimkou prvních dvou přidali 0,2 ml protilátky proti kortikosteronu. Všechny zkumavky jsme zvortexovaly a nechaly po dobu 2 hodin temperovat při pokojové teplotě. Po inkubaci jsme do všech zkumavek přidali 0,5 ml srážecího roztoku (směs PEG a Goat anti-rabbit gama globulinů v TRIS pufru). Poté jsme směs pečlivě

promíchali. Všechny zkumavky jsme 15 min centrifugovali při 2300-2500 rpm (1000 g), slili jsme supernatant a nechali změřit v přístroji gamma-counter.

4.7 Koncentrace mRNA vybraných genů v hypofýze

Odebraná hypofýza byla homogenizována a byla z ní izolována totální RNA. Ta byla reverzní transkripční přepsána do cDNA (komplementární deoxyribonukleová kyselina). Tato cDNA byla použita jako templát pro kvantitativní RT-PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase). Kvantitativní RT-PCR umožňuje určit relativní koncentraci původní mRNA konkrétního genu vztaženou k referenčnímu genu. Tím byl v našem případě gen pro GAPDH (glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa), jehož exprese v mozku se při stresu nemění (Porterfield et al., 2011). V následujících podkapitolách jsou dílčí kroky rozepsány podrobněji.

4.7.1 Izolace totální RNA

Hypofýza byla ihned po usmrcení zvířat vyjmuta z mozku a zmrazena v tekutém dusíku. Při další manipulaci byla nejprve homogenizována s použitím přístroje MagnaLyser (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo). Totální RNA byla z homogenátu izolována pomocí komerčně dostupného kitu GeneElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Postup izolace byl následující.

Homogenizace byla provedena v 500 μ l Lysis Bufferu na přístroji MagnaLyser při 7000 rpm po dobu 10 s. Lyzát byl nanesen na modrou filtrační kolonku a centrifugován při 12 000 g po dobu 1 min. Kolonka byla odstraněna a k lyzátu bylo přidáno ekvivalentní množství 70% ethanolu (V/V). Směs jsme důkladně promíchali pipetou a nanесли na červenou fixační kolonku. Následovala centrifugace při 12 000 g po dobu 1 min. Supernatant jsme odstranili a na kolonku jsme nanесли 500 μ l Wash Solution 1. Následovala centrifugace při 12 000 g po dobu 1 min. Odstranili jsme supernatant a na kolonku jsme nanесли 500 μ l Wash Solution 2. Následovala centrifugace při 12 000 g po dobu 1 min. Kolonku jsme vyměnili za novou a následovala centrifugace na sucho po dobu 5 min. Poté jsme na kolonku nanесли 30 μ l injekční vody o teplotě 37 °C. Následovala centrifugace 12 000 g po dobu 30 s. Získaná RNA byla kvantifikována na přístroji NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Eluovaná totální RNA byla do dalšího zpracování uskladněna na ledu.

4.7.2 Příprava cDNA

0,1 µg totální RNA z hypofýzy bylo reverzní transkripcí přepsáno do cDNA. Byl k tomu použit komerčně dostupný kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit a random hexamery (oboje od firmy Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Postup při reverzní transkripci byl následující.

Do 200µl PCR zkumavky bylo postupně napipetováno: 2 µl 10x koncentrovaného RT Bufferu; 0,8 µl dNTP mixu; 2 µl Random Primers; 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase; 1 µl RNase Inhibitor a 3,2 µl injekční vody. Do této směsi bylo napipetováno 10 µl totální RNA tak, aby celkový vstup RNA byl 0,1 µg na reakci. Reverzní transkripce probíhala za těchto podmínek:

- 1) **Inkubace:** Při teplotě 25 °C po dobu 10 min.
- 2) **Reverzní transkripce:** Při teplotě 37 °C po dobu 120 min.
- 3) **Denaturace RNA:** Při teplotě 85 °C po dobu 5 min.

cDNA byla následně uskladněna při teplotě -20 °C.

4.7.3 Kvantitativní RT-PCR

cDNA byla použita jako templát pro kvantitativní RT-PCR, provedenou na přístrojích AbiPrism 7000 Sequence Detection System Instrument nebo ViiA 7 Real-Time PCR System (oba od firmy Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). K reakci byl použit komerčně dostupný TaqMan Gene Expression MasterMix od firmy Applied Biosystems. Celkový objem reakční směsi činil 20 µl. Reakční směs obsahovala: 4 µl MasterMixu; 14 µl injekční vody; 0,25 µl TaqMan Gene Expression Assays pro konkrétní gen; 0,75 µl Pre-Developed TaqMan Rat GAPDH a 1 µl cDNA. Vlastní polymerázová reakce probíhala v následujících krocích:

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

Koncentrace RNA byla pomocí analytického softwaru (Applied Biosystems) vypočítána z prahového cyklu metodou standardní křivky (standard curve method). Byla vztažena na expresi reporterového genu (GAPDH), a proto je udána v relativních číslech.

4.8 Statistika

Ke statistické analýze dat byl použit software Statistica 10. (StatSoft, Inc.; Oklahoma, USA). Ke zjišťování vlivu jednoho faktoru na rozdíl mezi skupinami byla používána jednofaktorová analýza rozptylu (jednofaktorová ANOVA). Vyšel-li efekt faktoru signifikantní ($p < 0,05$), následoval Fisherův LSD post-hoc test.

Ke zjišťování vlivu dvou faktorů na rozdíl mezi skupinami byla používána dvoufaktorová analýza rozptylu (dvoufaktorová ANOVA). Tak tomu bylo v experimentu č.2, kde byl u dospělých zvířat zjišťován jednak efekt zacházení v juvenilním věku, jednak efekt zacházení v dospělém věku. Vyšel-li efekt alespoň jednoho z faktorů nebo kombinace obou faktorů signifikantní ($p < 0,05$), následoval Fisherův LSD post-hoc test. Pouze u vyhodnocování sociálního chování zvířat v experimentu č.1 (model „rezident-intruder“) byl jako post-hoc test použit Newman-Keulsův test.

Hodnoty měřených veličin v této práci jsou uváděny jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (SEM). Hladina významnosti tak, jak ji stanovil Fisherův LSD post-hoc test, je značena hvězdičkami: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5. Výsledky

5.1 Experiment 1: Vliv opakovaného sociálního stresu na chování a na expresi vybraných genů v hypofýze potkana

V tomto experimentu byli použiti samci potkanů kmene Fisher 344. Jako model sociálního stresu bylo použito uspořádání „resident-intruder“. To obnáší sedmidenní proceduru, při které se každý den na dobu 30 min umisťují do klece k individuálně chovaným samcům (rezidentům) jim neznámí, stejně staří samci chovaní ve skupinách (vetřelci). První a sedmý den stresové procedury byl pořízen patnáctiminutový videozáznam sloužící k vyhodnocení chování rezidentů a vetřelců. Sedmý den byla zvířata usmrcena.

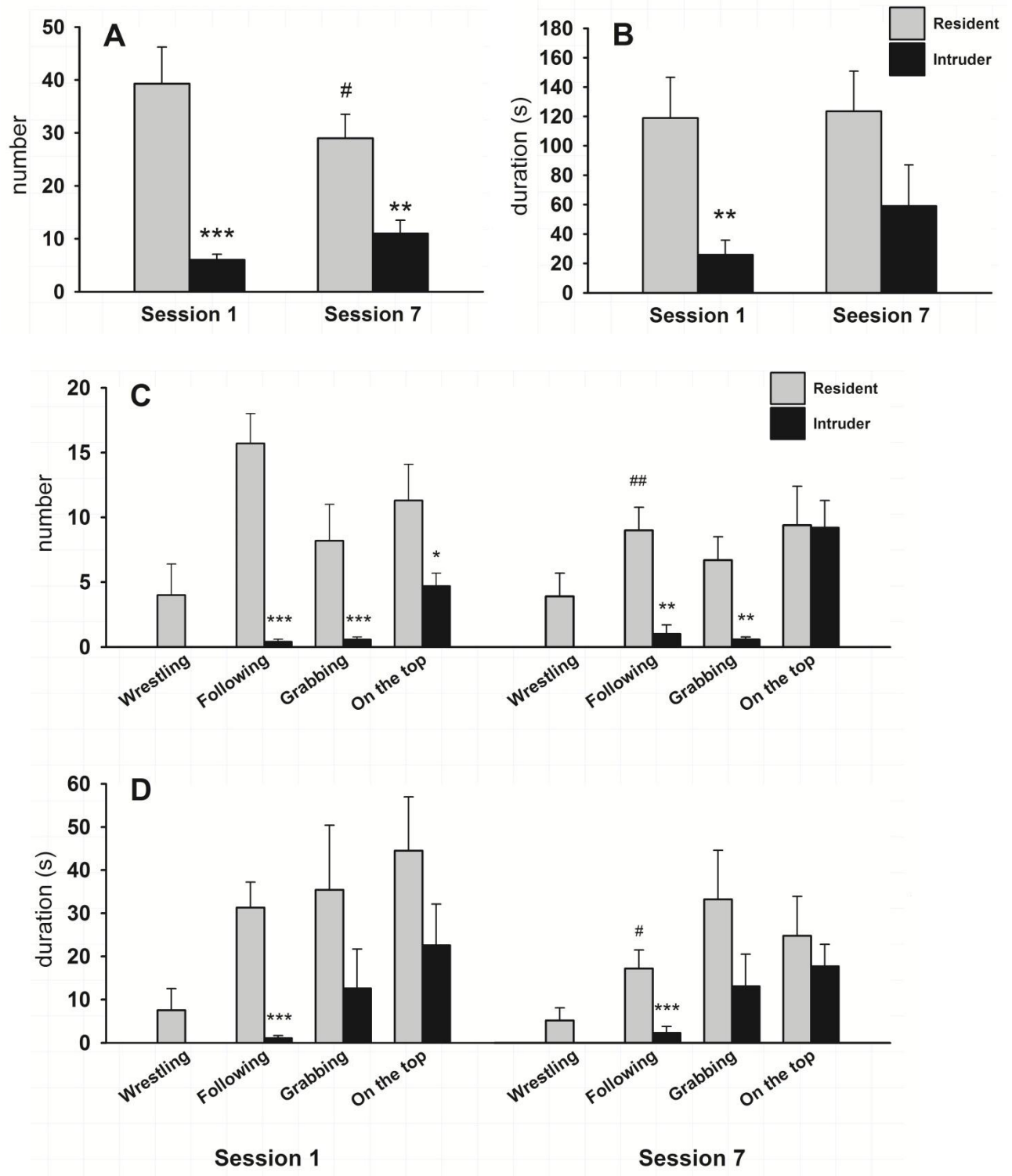
5.1.1 Vliv opakovaného sociálního stresu na chování

Při experimentu „resident-intruder“, trvajícím sedm dní, byl první a sedmý den pořízen videozáznam experimentálních zvířat. Ten byl použit k vyhodnocení sociálního chování zvířat. Výsledky byly zpracovány jednak jako celkový počet a celková doba trvání všech projevů sociálního chování (viz. Tabule č.1, grafy A a B), jednak jako počet a doba trvání jednotlivých, konkrétních typů sociálního chování (viz. Tabule č.1, grafy C a D). Zvířata byla v experimentu rozdělena na dvě skupiny – rezidenty ($n = 7$) a vetřelce ($n = 7$).

Rozdíl mezi rezidenty a vetřelci v prvním dnu experimentu se ukázal signifikantní jak v celkovém počtu projevů sociálního chování ($p < 0,001$), tak v jejich celkové době trvání ($p < 0,001$). Rozdíl v počtu zůstal signifikantní i sedmý den experimentu ($p < 0,01$), zatímco rozdíl v době trvání signifikantní nebyl. Rezidenti vykazovali obecně vyšší aktivitu v sociálním chování ve srovnání s vetřelci. Celkový počet projevů sociálního chování se však u nich sedmý den signifikantně snížil ($p < 0,05$). Toto snížení se však neprojevovalo na celkové době trvání sociálního chování.

Podíváme-li se na podrobný rozbor jednotlivých typů sociálního chování (viz. Tabule č.1, grafy C a D), zjistíme, že v mnoha z nich vykazují rezidenti vyšší aktivitu oproti vetřelcům. Konkrétně je tomu tak v počtu projevů chování typu „following“ ($p < 0,001$), „grabbing“ ($p < 0,001$) a „on the top“ ($p < 0,05$) první den experimentu. Sedmý den zůstává u rezidentů zvýšený počet chování typu following ($p < 0,01$) a grabbing ($p < 0,01$), zatímco u chování „on the top“ není signifikantní rozdíl vetřelců oproti rezidentům. Co se týká doby trvání, je signifikantní rozdíl mezi rezidenty a vetřelci pouze u chování typu following, a to jak první ($p < 0,001$), tak sedmý ($p < 0,001$) den. U většiny typů chování pozorujeme tendenci k vyrovnání rozdílů mezi rezidenty a vetřelci v průběhu experimentu. K takovému vyrovnání

dochází například v počtu projevů chování typu „on the top“, u kterého je rozdíl mezi rezidenty a vetřelci první den signifikantní, zatímco sedmý den nikoli. U chování typu „following“ pozorujeme signifikantní pokles jak v počtu ($p < 0,01$), tak v délce trvání ($p < 0,05$) mezi prvním a sedmým dnem. U chování typu „wrestling“ nebyl zjišťován rozdíl mezi rezidenty a vetřelci, protože u tohoto chování není možné rozlišit, které ze zvířat je jeho iniciátorem.

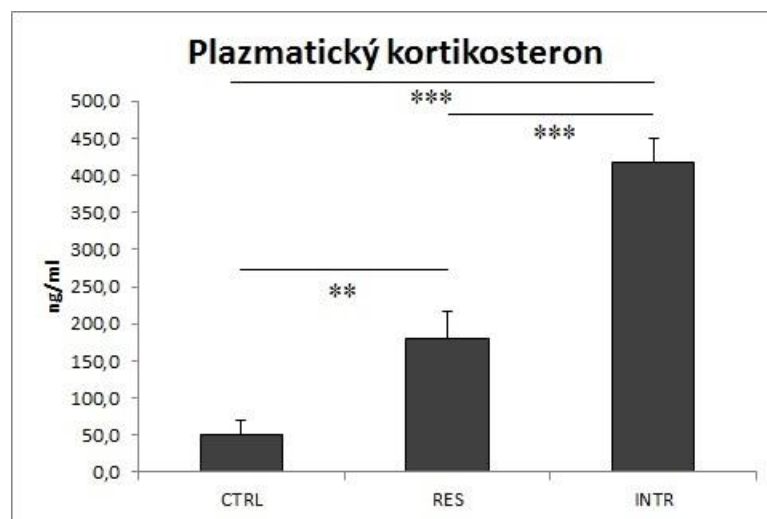


Tabule č.1: Vliv sociálního stresu na projevy sociálního chování u potkanů.

První dva grafy znázorňují celkový počet (graf A) a celkovou dobu trvání (graf B) projevů sociálního chování u potkanů v experimentálním uspořádání „resident-intruder“. Druhé dva grafy znázorňují počet projevů jednotlivých typů chování (graf C) a dobu trvání jednotlivých typů chování (graf D). Doba trvání je vyjádřena v sekundách. Jako „Session 1“ jsou označeny výsledky z prvního dne experimentu, jako „Session 7“ ze sedmého, tedy posledního dne experimentu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Vyjádření signifikance mezi rezidenty a vetřelci: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Vyjádření signifikance mezi prvním dnem a sedmým dnem: # $p < 0.01$, ## $p < 0.001$. $n = 7$ pro obě skupiny zvířat.

5.1.2 Vliv opakovaného sociálního stresu na plazmatickou hladinu kortikosteronu

Po posledním sezení, tedy sedmý den experimentu „resident-intruder“, byli potkani usmrceni a byla jim odebrána krev. V krevní plazmě byla stanovena koncentrace kortikosteronu (viz. Tabule č.2). Ta se signifikantně liší mezi všemi třemi skupinami, efekt sociálního stresu na hladinu kortikosteronu je signifikantní na hladině $p < 0,001$. Koncentrace kortikosteronu u rezidentů je vyšší oproti kontrolám ($p < 0,01$), to samé lze říci o koncentraci kortikosteronu u vetřelců při srovnání s rezidenty ($p < 0,001$). Rozdíl v koncentraci kortikosteronu mezi kontrolami a vetřelci je rovněž vysoce signifikantní ($p < 0,001$).



Tabule č.2: Vliv sociálního stresu na plazmatickou koncentraci kortikosteronu u potkana.

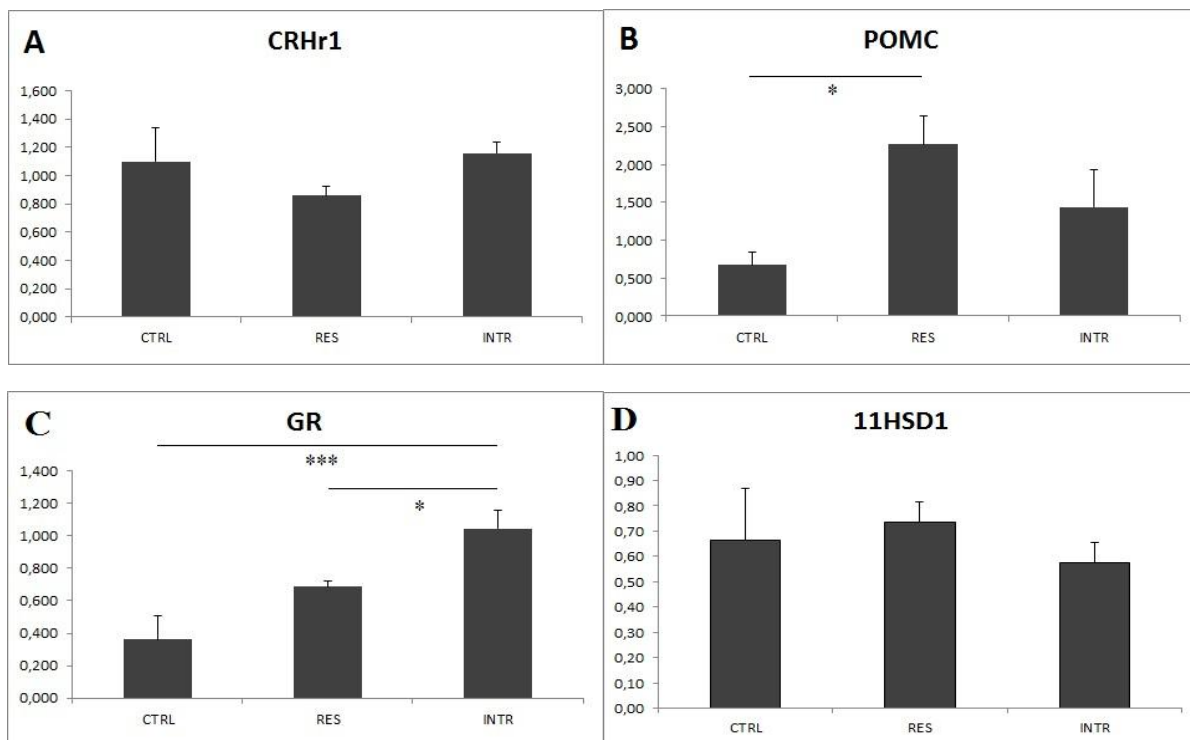
Potkani byli vystaveni sociálnímu stresu v experimentálním uspořádání „resident-intruder“ (CTRL – kontrolní zvířata, $n = 8$; RES – rezidenti, $n = 7$; INTR – vetřelci, $n = 7$). Poslední,

sedmý den experimentu byla zvířatům odebrána krev a v krevní plazmě byla stanovena koncentrace kortikosteronu. Koncentrace kortikosteronu je vyjádřena v nanogramech na mililitr krevní plazmy. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Vyjádření signifikance rozdílu mezi kontrolami, rezidenty a vetřelci: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.1.3 Vliv opakovaného sociálního stresu na expresi genů pro CRHr1, POMC, GR a 11 β -HSD1 v hypofýze

Po posledním sezení, tedy sedmý den experimentu „resident-intruder“, byli potkani usmrceni a byla jim odebrána hypofýza. V té byla metodou kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR) stanovena relativní koncentrace mRNA genů pro CRHr1 (receptor typu 1 pro hormon uvolňující kortikotropin), POMC (proopiomelanokortin), GR (glukokortikoidní receptor) a 11 β -HSD1 (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1).

Sociální stres ovlivnil expresi genu pro GR (hladina významnosti $p < 0,01$; viz. Tabule č.2, graf C). Množství transkriptu genu pro GR u vetřelců bylo zvýšené jak vůči kontrolám ($p < 0,001$), tak vůči rezidentům ($p < 0,05$). Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl mezi rezidenty a kontrolami ($p = 0,064$). Sociální stres dále změnil expresi genu pro POMC (hladina významnosti $p < 0,05$); viz. Tabule č.2, graf B), konkrétně došlo ke zvýšení exprese u rezidentů oproti kontrolám ($p < 0,05$). Nebyl však zjištěn signifikantní rozdíl vetřelců oproti kontrolám ($p = 0,190$) ani vetřelců oproti rezidentům ($p = 0,140$). U dalších dvou genů, tedy genu pro CRHr1 (viz. Tabule č.2, graf A) a genu pro 11 β -HSD1 (viz. Tabule č.2, graf D) nevyvolal sociální stres žádné signifikantní změny v jejich expresi.



Tabule č.3: Vliv sociálního stresu na expresi genů pro CRHr1, POMC, GR a 11β-HSD1 v hypofýze potkana.

Grafy znázorňují relativní koncentraci mRNA genů pro CRHr1 (receptor typu 1 pro hormon uvolňující kortikotropin, graf A), POMC (proopiomelanokortin, graf B), GR (glukokortikoidní receptor, graf C) a 11β-HSD1 (11β-hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1, graf D) v hypofýze. Zvířata byla rozdělena do tří skupin – CTRL (kontrolní skupina, n = 8), RES (rezidenti, n = 7) a INTR (vetřelci, n = 7). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Vyjádření signifikance rozdílu mezi kontrolami, rezidenty a vetřelci: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

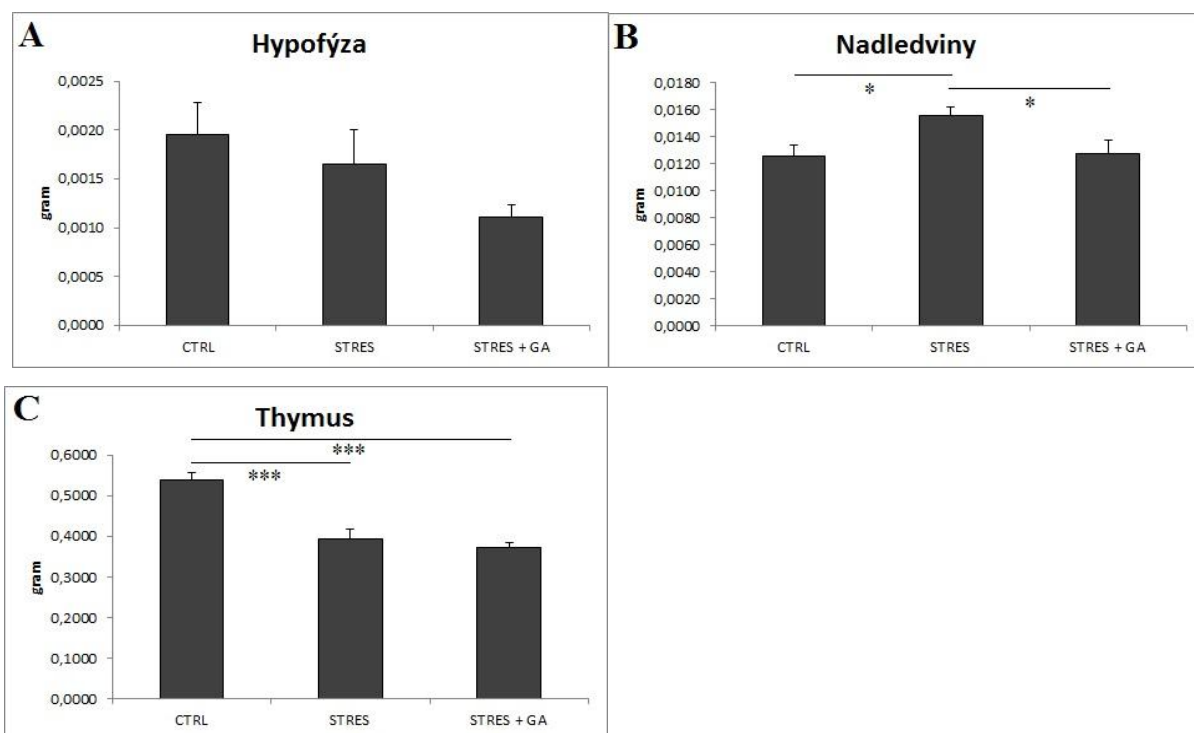
5.2 Experiment 2: Vliv stresu v juvenilním věku na expresi vybraných genů v hypofýze, na stresovou odpověď v dospělosti a na behaviorální projevy

Následující série experimentů byla provedena na samcích potkanů kmene Wistar. Jako juvenilní stres byl použit třídní stresový protokol, při kterém byla zvířata vystavena stresoru každý den od 28. do 30. dne věku. Zvířata byla při tom rozdělena do tří skupin – kontroly (CTRL), stresovaná zvířata (STRES) a stresovaná zvířata, kterým byla před každou aplikací stresoru podána glycyrrhetinová kyselina (STRES+GA). V 60. dnu věku byl některým

zvířatům aplikován akutní adultní stres. U šedesátidenních zvířat tedy rozlišujeme dvě skupiny – kontroly (CTRL) a stresovaná zvířata (STRES).

5.2.1 Vliv stresu v juvenilním věku na hmotnost některých orgánů

Bezprostředně po poslední aplikaci stresoru ve třídenním stresovém protokolu byla zvířata usmrcena a byly jim odebrány orgány – hypofýza, obě nadledviny a thymus. Juvenilní stres se projevil změnou hmotnosti některých orgánů. Měl signifikantní vliv na hmotnost nadledvin ($p < 0,05$) a thymu ($p < 0,001$), avšak neměl vliv na hmotnost hypofýzy. Signifikantní je rozdíl v hmotnosti nadledvin mezi stresovanými zvířaty a kontrolami ($p < 0,05$), stejně jako mezi stresovanými zvířaty a stresovanými zvířaty s aplikovanou GA ($p < 0,05$). Rozdíl mezi kontrolami a stresovanými zvířaty s aplikovanou GA naopak není signifikantní ($p = 0,824$). U stresovaných zvířat byla hmotnost nadledvin vyšší než u druhých dvou skupin. U thymu se ukázal jako vysoce signifikantní rozdíl mezi kontrolami a stresovanými zvířaty ($p < 0,001$), stejně jako mezi kontrolami a stresovanými zvířaty s aplikovanou GA ($p < 0,001$). Hmotnost thymu stresovaných zvířat je nižší oproti kontrolám.



Tabule č.4: Vliv juvenilního stresu na hmotnost některých orgánů u 30-ti denních potkanů.

Hmotnosti hypofýzy (graf A), nadledvin (graf B) a thymu (graf C) jsou udány v gramech. Hmotnost nadledvin byla vypočítána jako součet obou nadledvin – pravé a levé. Zvířata byla

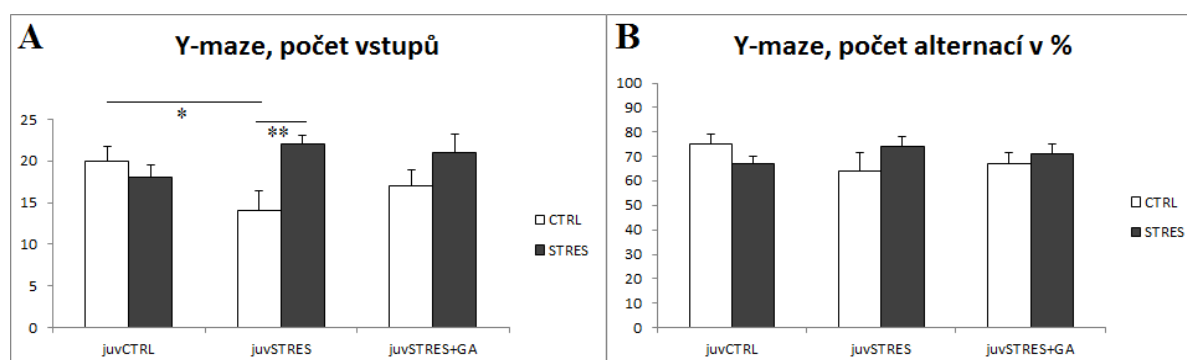
rozdělena do tří skupin – CTRL (kontrolní skupina, n = 8), STRES (stresovaná zvířata, n = 8) a STRES+GA (stresovaná zvířata, kterým byla před každým stresem aplikována glycyrrhetinová kyselina, n = 8). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Vyjádření signifikance rozdílu mezi skupinami: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

5.2.2 Vliv stresu v juvenilním věku na behaviorální projevy

5.2.2.1 Trojramenné bludiště

V 61. dnu věku, tedy den po aplikaci akutního adultního stresoru, byla zvířata podrobena testu v trojramenném bludišti (bludiště tvaru „Y“). Zjišťován byl jednak celkový počet vstupů do kteréhokoli ramene bludiště v jakémkoli pořadí (Tabule č.5, graf A), jednak počet alternací v % z celkového možného počtu alternací (Tabule č.5, graf B). Jako alternace je chápán vstup do třech různých ramen v řadě za sebou.

2-faktorová ANOVA odhalila efekt zacházení v 60. dnu ($p < 0,05$) a efekt kombinace zacházení v 30. a v 60. dnu ($p < 0,05$) na celkový počet vstupů. Neprokázal se efekt samotného zacházení v 30. dnu ($p = 0,685$). Procentuální počet alternací nebyl ovlivněn žádným ze zkoumaných faktorů.



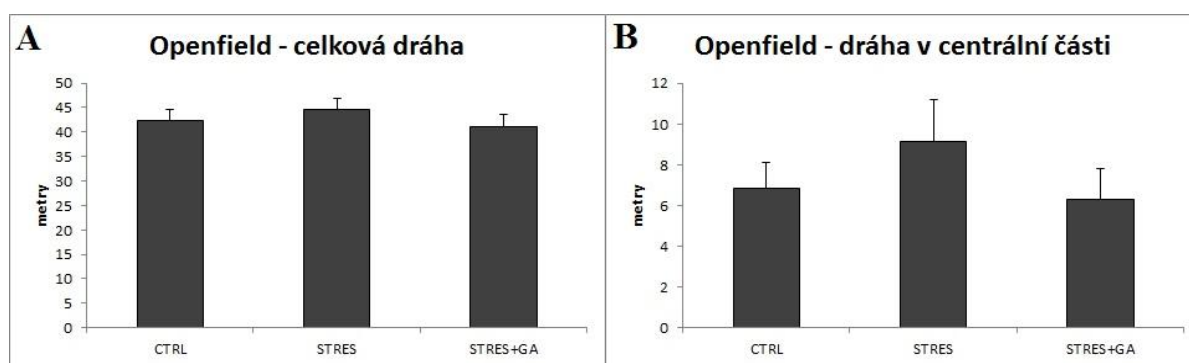
Tabule č.5: Vliv juvenilního stresu na počet vstupů a % alternací v „Y bludišti“ u dospělých potkanů.

Grafy znázorňují celkový počet vstupů do kteréhokoli ramene bludiště (graf A) a % uskutečněných alternací z maximálního možného počtu alternací (graf B). Zvířata byla rozdělena do třech skupin na základě zacházení v juvenilním věku – juCTRL (zvířata intaktní v juvenilním věku, n = 16), juSTRES (zvířata stresovaná v juvenilním věku, n = 16) a juSTRES+GA (zvířata stresovaná v juvenilním věku, kterým byla před stresem aplikována glycyrrhetinová kyselina, n = 16). Každá z těchto tří skupin obsahuje vždy dvě podskupiny po osmi zvířatech, utvořené na základě zacházení v adultním věku – CTRL (zvířata intaktní v adultním věku, bílá barva) a STRES (zvířata stresovaná v adultním věku, černá barva).

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Vyjádření signifikance rozdílu mezi skupinami: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.2.2.2 Openfield

V 31. dnu věku, tedy den po ukončení třídního stresového protokolu, byla juvenilní zvířata podrobena testu v otevřeném poli (openfield), zjišťujícím lokomoční aktivitu a míru anxiety. Zjišťovanými parametry byla jednak celková dráha, kterou zvířata během testu urazila (Tabule č.6, graf A), jednak dráha v centrální části pole (Tabule č.6, graf B). Zacházení v juvenilním věku nemělo signifikantní efekt ani na jeden ze zkoumaných parametrů ($p = 0,578$ pro celkovou dráhu; $p = 0,451$ pro dráhu v centrální části).



Tabule č.6: Vliv juvenilního stresu na chování potkanů v testu otevřeného pole.

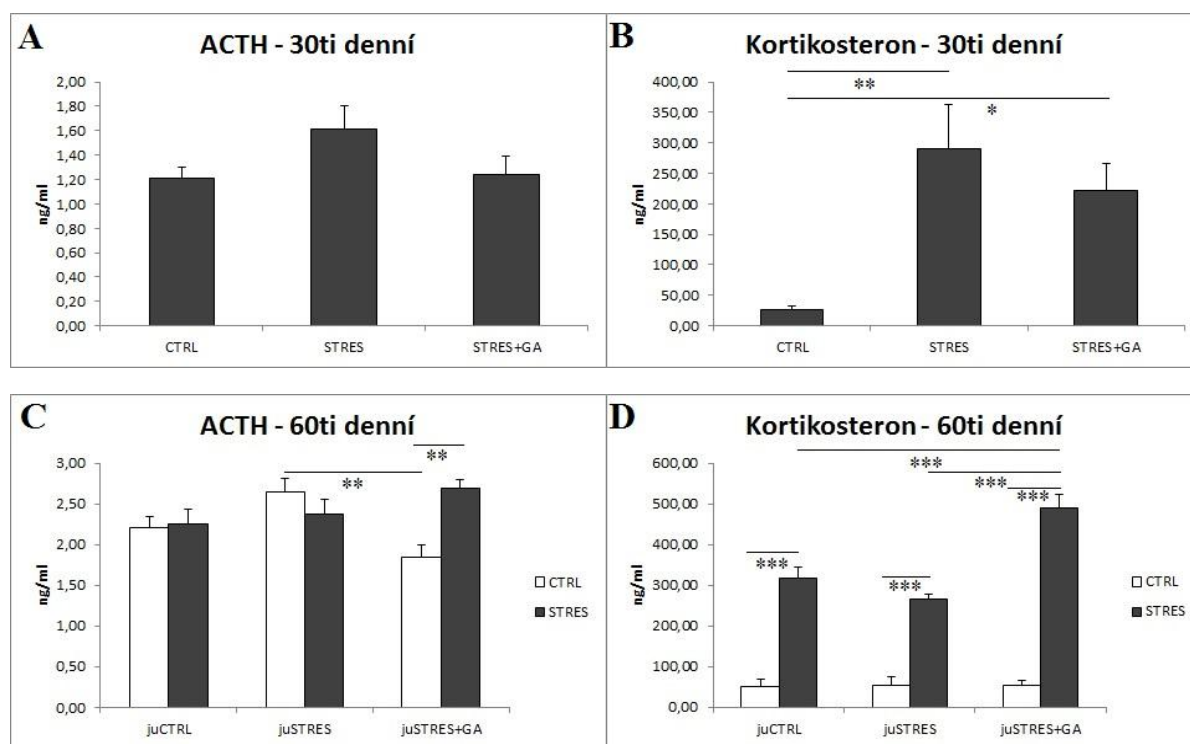
Grafy znázorňují celkovou dráhu uraženou zvířaty v otevřeném poli (graf A) a dráhu uraženou v centrální části otevřeného pole (graf B). Zvířata byla rozdělena do třech skupin na základě zacházení v juvenilním věku – juCTRL (zvířata intaktní v juvenilním věku, $n = 24$), juSTRES (zvířata stresovaná v juvenilním věku, $n = 24$) a juSTRES+GA (zvířata stresovaná v juvenilním věku, kterým byla před stresem aplikována glycyrrhetinová kyselina, $n = 24$). Uražená dráha je vyjádřena v metrech. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Vyjádření signifikance rozdílu mezi skupinami: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5.2.3 Vliv stresu v juvenilním věku na hladinu kortikosteronu a ACTH bezprostředně po stresu a při stresové odpovědi v dospělosti

U zvířat stresovaných v juvenilním věku byla bezprostředně po ukončení aplikace stresoru na konci třídního stresového protokolu zjišťována hladina stresových hormonů v krevní plazmě – ACTH (adrenokortikotropní hormon) a kortikosteronu. Stáří těchto zvířat bylo 30 dnů. Statistická analýza neodhalila signifikantní efekt stresu v juvenilním věku na plazmatickou koncentraci ACTH ($p = 0,137$; Tabule č.7, graf A). Jinak je tomu u plazmatické

koncentrace kortikosteronu ($p < 0,01$; Tabule č.7, graf B). Tam vyšel signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou stresovaných zvířat ($p < 0,01$), stejně jako mezi kontrolní skupinou a skupinou stresovaných zvířat, kterým byla před stresem aplikována GA ($p < 0,05$). Rozdíl mezi skupinou stresovaných zvířat a stresovaných zvířat, kterým byla před stresem aplikována GA, se neukázal jako signifikantní ($p = 0,342$).

Aby byl odhalen možný dlouhodobý efekt juvenilního stresu na stresovou odpověď, byla některá ze zvířat stresovaných v juvenilním věku vystavena akutnímu adultnímu stresu ve věku 60 dnů (Tabule č.7, graf C a graf D, černé sloupce). U těchto zvířat byla zjišťována hladina ACTH a kortikosteronu v krevní plazmě a byla porovnávána se zvířaty, která prošla různým zacházením v juvenilním věku, avšak v adultním věku byla intaktní (Tabule č.7, graf C a graf D, bílé sloupce). K analýze výsledků byla použita 2-faktorová ANOVA. Pro ACTH odhalila signifikantní efekt kombinace obou faktorů ($p < 0,01$), zatímco samotný efekt zacházení se zvířaty v juvenilním věku ($p = 0,183$), stejně jako efekt zacházení v adultním věku ($p = 0,138$), se neukázaly být signifikantní. Stejný způsob statistické analýzy výsledků byl použit i pro kortikosteron. Zde 2-faktorová ANOVA odhalila signifikantní efekt jak každého faktoru jednotlivě, tak jejich kombinace – pro zacházení v juvenilním věku ($p < 0,001$), pro zacházení v adultním věku ($p < 0,001$) a pro kombinaci faktorů ($p < 0,001$).



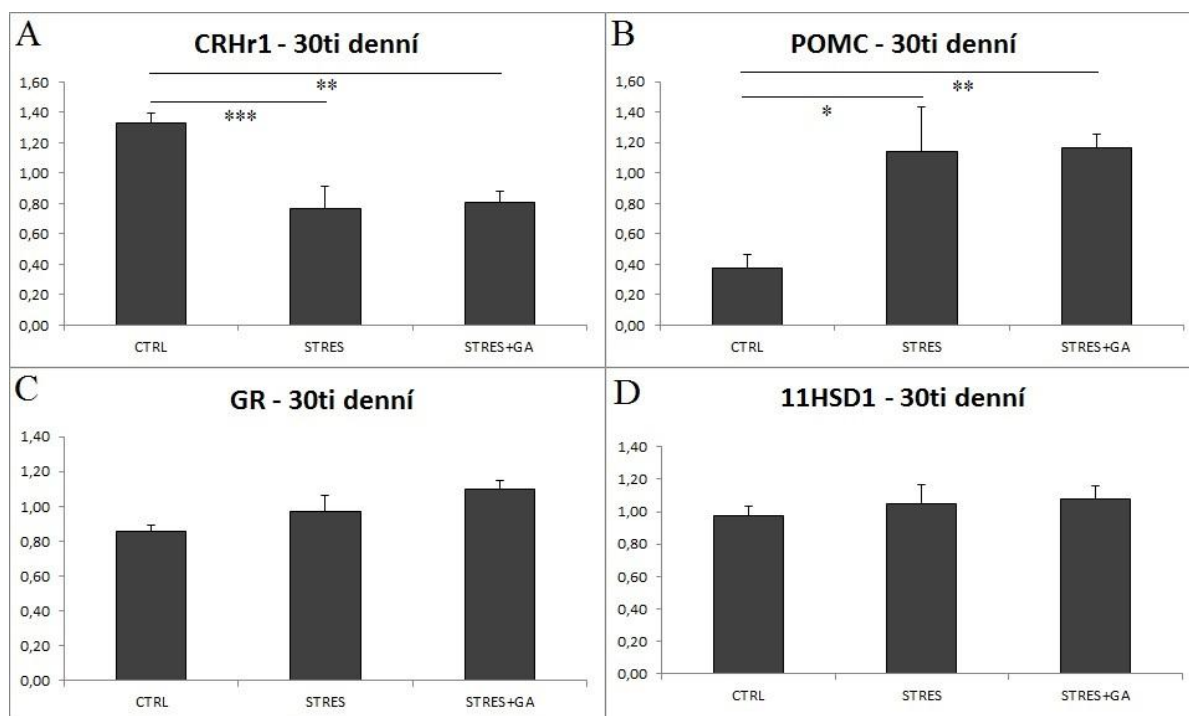
Tabule č.7: Vliv juvenilního stresu na hladinu ACTH a kortikosteronu v krevní plazmě bezprostředně po stresu a při stresové odpovědi v dospělosti u potkana.

První dvojice grafů (graf A, graf B) znázorňuje koncentraci hormonů ACTH (adrenokortikotropní hormon) a kortikosteronu v krevní plazmě bezprostředně po ukončení aplikace juvenilního stresu. To nastalo na konci třídenního stresového protokolu, kdy bylo stáří zvířat přesně 30 dnů. CTRL – kontrolní skupina (n = 8); STRES – stresovaná zvířata (n = 8); STRES+GA - stresovaná zvířata, kterým byla před každým stresem aplikována glycyrrhetinová kyselina (n = 8). Druhá dvojice grafů (graf C, graf D) znázorňuje koncentraci hormonů ACTH a kortikosteronu po aplikaci akutního adultního stresu ve věku zvířat 60 dnů. Na ose *x* jsou tři skupiny zvířat podle zacházení v juvenilním věku – juCTRL (zvířata intaktní v juvenilním věku, n = 16), juSTRES (zvířata stresovaná v juvenilním věku, n = 16) a juSTRES+GA (zvířata stresovaná v juvenilním věku, kterým byla před stresem aplikována glycyrrhetinová kyselina, n = 16). Každá z těchto tří skupin obsahuje vždy dvě podskupiny po osmi zvířatech, rozlišené barvou – CTRL (zvířata intaktní v adultním věku, bílá barva) a STRES (zvířata stresovaná v adultním věku, černá barva). Koncentrace obou hormonů je vyjádřena v nanogramech na mililitr krevní plazmy. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Vyjádření signifikance rozdílu mezi skupinami: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

5.2.4 Vliv stresu v juvenilním věku na expresi genů pro CRHr1, POMC, GR a 11β-HSD1 v hypofýze

Bezprostředně po ukončení aplikace stresoru na konci třídenního stresového protokolu byla zvířata usmrcena a byla jim odebrána hypofýza. Toho času byla zvířata stará 30 dnů. V hypofýze byla metodou kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR) stanovena relativní koncentrace mRNA genů pro CRHr1, POMC, GR a 11β-HSD1.

Třídenní stresový protokol ovlivnil u zvířat v juvenilním věku expresi CRHr1 v hypofýze (*p* < 0,01; Tabule č.8, graf A). Jeho exprese oproti kontrolám signifikantně poklesla jak u stresovaných zvířat (*p* < 0,001), tak u stresovaných zvířat s aplikovanou GA (*p* < 0,01). K ovlivnění došlo rovněž u POMC (*p* < 0,05; Tabule č.8, graf B). Na rozdíl od CRHr1 u něj však juvenilní stres vyvolal nárůst, a to jak u stresovaných zvířat (*p* < 0,05), tak u stresovaných zvířat s aplikovanou GA (*p* < 0,01). V množství transkriptu pro GR a 11β-HSD1 (Tabule č.8, grafy C a D) nevyvolal juvenilní stres žádné signifikantní změny.



Tabule č.8: Vliv juvenilního stresu na expresi genů pro CRHr1, POMC, GR a 11β-HSD1 v hypofýze potkana.

Grafy znázorňují relativní koncentraci mRNA genů pro CRHr1 (receptor typu 1 pro hormon uvolňující kortikotropin, graf A), POMC (proopiomelanokortin, graf B), GR (glukokortikoidní receptor, graf C) a 11β-HSD1 (11β-hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1, graf D) v hypofýze. Zvířata byla rozdělena do tří skupin – CTRL (kontrolní skupina, n = 8), STRES (stresovaná zvířata, n = 8) a STRES+GA (stresovaná zvířata, kterým byla před každým stresem aplikována glycyrrhetinová kyselina, n = 8). Hypofýza byla odebrána zvířatům ve věku 30 dnů bezprostředně po ukončení aplikace stresoru poslední den třídního stresového protokolu. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Vyjádření signifikance rozdílu mezi skupinami: *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

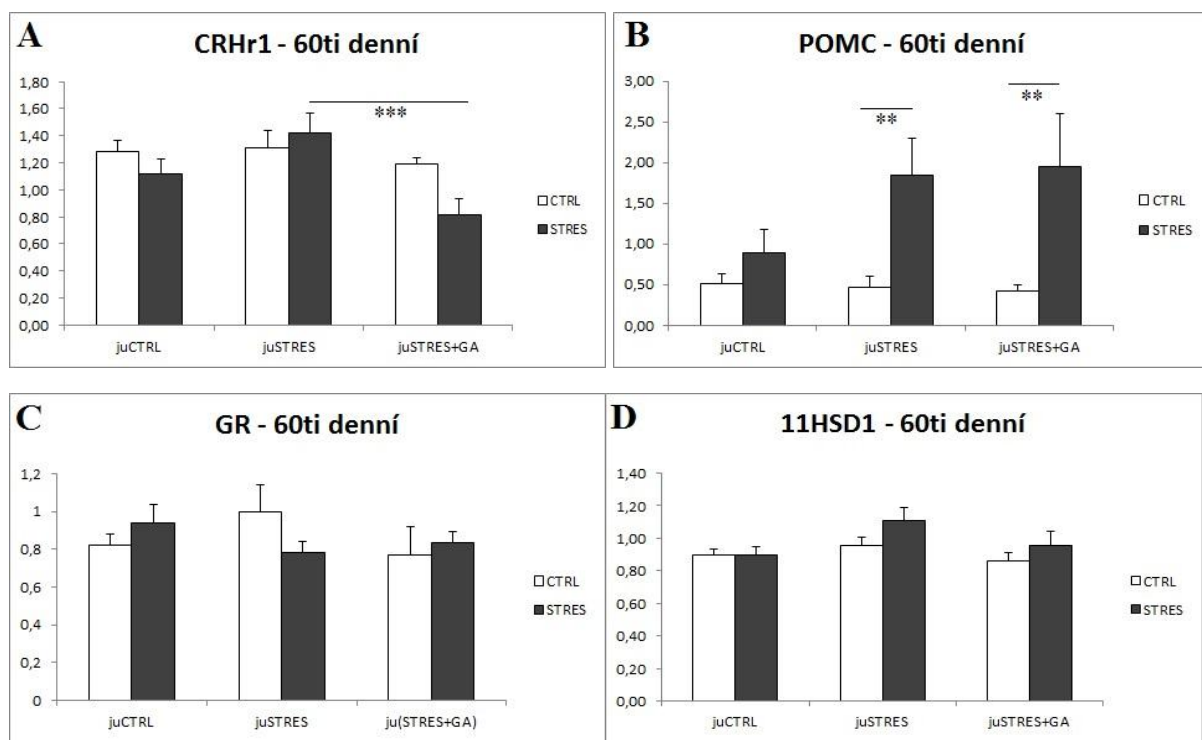
5.2.5 Vliv stresu v juvenilním věku a následného adultního stresu na expresi genů pro CRHr1, POMC, GR a 11β-HSD1 v hypofýze

Bezprostředně po ukončení aplikace akutního adultního stresoru, která byla prováděna v 60. dnu věku zvířat, byli potkani usmrceni a byla jim odebrána hypofýza. V té byla metodou kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR) stanovena relativní koncentrace mRNA genů pro CRHr1, POMC, GR a 11β-HSD1.

Aby bylo možné odhalit případný dlouhodobý efekt juvenilního stresu na citlivost exprese vybraných genů ke stresu, byla některá ze zvířat vystavených juvenilnímu stresu

podrobena akutnímu adultnímu stresu (Tabule č.9, černé sloupce). Tyto skupiny byly porovnávány se skupinami zvířat, která byla buďto zcela intaktní, nebo byla vystavena pouze juvenilnímu stresu (Tabule č.9, bílé sloupce). K analýze dat byla použita 2-faktorová ANOVA. Jedním zkoumaným faktorem bylo zacházení se zvířaty v juvenilním věku, druhým faktorem bylo zacházení v adultním věku. Byl zkoumán jak efekt každého z faktorů samostatně, tak efekt interakce obou zmíněných faktorů.

Pro CRHr1 (Tabule č.9, graf A) odhalila 2-faktorová ANOVA signifikantní efekt zacházení v juvenilním věku ($p < 0,05$), efekt zacházení v adultním věku ($p = 0,122$) ani efekt interakce obou faktorů ($p = 0,115$) se však neukázaly jako signifikantní. Efekt zacházení v adultním věku se ukázal jako vysoce signifikantní pro POMC ($p < 0,001$; Tabule č.9, graf B). To však neplatí pro efekt zacházení v juvenilním věku ($p = 0,281$) ani pro efekt interakce obou faktorů ($p = 0,187$). 2-faktorová ANOVA neodhalila signifikantní efekt sledovaných faktorů na expresi GR ani 11 β -HSD1 (Tabule č.9, grafy C a D)



Tabule č.9: Vliv juvenilního stresu a následného adultního stresu na expresi genů pro CRHr1, POMC, GR a 11 β -HSD1 v hypofýze potkana.

Grafy znázorňují relativní koncentraci mRNA genů pro CRHr1 (receptor typu 1 pro hormon uvolňující kortikotropin, graf A), POMC (proopiomelanokortin, graf B), GR (glukokortikoidní receptor, graf C) a 11 β -HSD1 (11 β -hydroxysteroiddehydrogenasa typu 1, graf D) v hypofýze. Hypofýza byla odebrána zvířatům ve věku 60 dnů bezprostředně po

ukončení aplikace akutního adultního stresoru. Na ose x jsou tři skupiny zvířat podle zacházení v juvenilním věku – juCTRL (zvířata intaktní v juvenilním věku, $n = 16$), juSTRES (zvířata stresovaná v juvenilním věku, $n = 16$) a juSTRES+GA (zvířata stresovaná v juvenilním věku, kterým byla před stresem aplikována glycyrrhetinová kyselina, $n = 16$). Každá z těchto tří skupin obsahuje vždy dvě podskupiny po osmi zvířatech, rozlišené barvou – CTRL (zvířata intaktní v adultním věku, bílá barva) a STRES (zvířata stresovaná v adultním věku, černá barva). Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Vyjádření signifikance rozdílu mezi skupinami: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

6. Diskuse

6.1 Experiment č.1

Přesto, že psychosociální stres je dnes u lidí v západní společnosti nejrozšířenějším typem stresu, nebyla mu ve stresové fyziologii dosud věnována odpovídající pozornost. Důvodů pro to je hned několik. První generace výzkumníků stresu se zaměřila raději na těžký fyzický stres, který je lépe kvantifikovatelný a který obvykle vyvolá silnou a dobře měřitelnou stresovou odpověď. V neposlední řadě bývá takový stresor snadno aplikovatelný. Výzkum psychosociálního stresu vyžaduje vytvoření složitějšího experimentálního modelu, ve kterém není snadné předem odhadnout intenzitu psychosociálního stresoru ani jeho účinky.

Ve výsledcích různých stresových experimentů se opakovaně ukazuje, že jak typ stresoru, tak jeho intenzita a délka trvání mají vliv na charakter stresové odpovědi a na celou řadu fyziologických parametrů. Výběr vhodného stresového modelu se proto zdá být jako klíčový, a chceme-li zkoumat vliv psychosociálního stresu na organismus, musíme co nejvěrněji nasimulovat podmínky psychosociálního stresu v našem experimentálním uspořádání.

V experimentu č.1 jsme použili zavedený model psychosociálního stresu podle Mitchell & Redfern (2005). Jednou z otázek, kterou jsme si položili, bylo, zda je tento model funkčním modelem psychosociálního stresu. Na základě analýzy chování rezidentů a vetřelců můžeme říci, že rezidenti vykazovali vyšší aktivitu sociálního chování oproti vetřelcům, a byli tedy dominantními zvířaty. To je vidět i na podrobném rozboru jednotlivých typů chování, kdy rezidenti vykazovali výrazně vyšší aktivitu v typech chování, kterými se projevuje sociální dominance, jako je například typ chování „grabbing“. Zároveň je však z výsledků patrná tendence k vyrovnání rozdílů v profilu sociálního chování mezi rezidenty a vetřelci v průběhu experimentu, což lze interpretovat jako adaptaci vetřelců na vzniklou situaci. Důsledkem toho je jakési „vyrovnávání sil“ mezi rezidenty a vetřelci. Podíváme-li se na hladinu stresového hormonu kortikosteronu u zvířat sedmý, tedy poslední den stresového protokolu, zjistíme, že ta je zvýšená jak u rezidentů, tak u vetřelců oproti kontrolám. U vetřelců je přitom výrazně vyšší než u rezidentů, což dobře koreluje se zjištěným sníženým profilem sociálního chování vetřelců. Vyvozujeme z toho, že použité experimentální uspořádání představovalo pro zvířata silnou stresovou zátěž. Submisivní pozice vetřelců vůči rezidentům se u těchto zvířat projevila jednak sníženou intenzitou sociálního chování, jednak extrémním zvýšením hladiny kortikosteronu v krvi. Koncentrace, které bylo u vetřelců

dosaženo (kolem 420 ng/ml krevní plazmy), je srovnatelná s koncentracemi kortikosteronu při těžkém fyzickém stresu (pro srovnání např. Zalocchi et al., 2004). Je to nepochybně také dáno tím, že v experimentu byli použiti potkani kmene Fisher 344, kteří jsou obecně citliví ke stresu a mají hyperaktivní HPA osu (Wu and Wang, 2010).

Druhým předmětem našeho zájmu v experimentu č.1 byla exprese genů v hypofýze pro proteiny klíčové z hlediska regulace HPA osy. Hypofýza je spolu s PVN hypothalamu hlavním centrem, kde dochází ke zpětnovazebnému tlumení HPA osy prostřednictvím glukokortikoidů (De Kloet, 1998). Zajímalo nás, jak se opakovaný psychosociální stres projeví na aktivitě a zpětnovazebné regulaci HPA osy. Za tím účelem jsme zjišťovali na úrovni mRNA expresi genů pro CRHr1, POMC, GR a 11 β -HSD1. Je třeba mít na paměti, že množství mRNA nemusí přesně korelovat s množstvím funkčního proteinu daného genu, neboť mezi mRNA a proteinem stojí složitý proces translace. Množství mRNA sice nelze ztotožnit s množstvím proteinu, přesto má důležitou výpovědní hodnotu ohledně exprese genů a je zavedenou a hojně užívanou metodou.

Expresa CRHr1 ani 11 β -HSD1 psychosociálním stresem ovlivněna nebyla. K ovlivnění však došlo u POMC a GR, kde psychosociální stres vyvolal signifikantní změny exprese. POMC je velký prekurzorový protein, jehož hydrolýzou v neuronech adenohypofýzy zvaných kortikotropy vzniká ACTH (Hadley & Haskell-Luevano, 1999). V některých našich experimentech se ukázalo, že zjišťovat aktivitu HPA osy na úrovni transkriptu pro POMC může být vhodnější, než na úrovni plazmatické koncentrace ACTH. ACTH je totiž uvolňován v pulzech, a jeho koncentrace po stresem indukovaném zvýšení opět rychle klesá k bazálním hodnotám. De Souza a Van Loon (1982) ukázali, že koncentrace ACTH dosahuje maximální hodnoty v intervalu 2-5 min od zahájení aplikace akutního hypokinetického stresu, trvajících 2 min. K bazálním hodnotám se pak koncentrace ACTH vrací za 30 min od zahájení aplikace stresoru. Jak ukázaly naše experimenty, transkript pro POMC se s časem tak dramaticky nemění, a lépe tak vystihuje aktivitu HPA osy. Je překvapivé, že psychosociální stres zvýšil relativní koncentraci transkriptu pro POMC signifikantně pouze u rezidentů, a nikoli u vetřelců. I u vetřelců je znatelný trend ke zvýšení koncentrace transkriptu pro POMC, změna však není signifikantní oproti kontrolám. Překvapivé je to z toho důvodu, že u vetřelců byla zjištěna nejvyšší koncentrace kortikosteronu, jehož uvolňování je regulováno právě produktem hydrolýzy POMC, hormonem ACTH. Je nezodpovězenou otázkou, jaká byla dynamika změn koncentrace transkriptu pro POMC v našem experimentu. Vzhledem k tomu, že námi použitý stresor nebyl jednorázový a akutní, ale byl chronický (procedura před

usmrčením trvala 30 min), je možné, že v době usmrčení již koncentrace transkriptu klesala, a to mohlo výsledky ovlivnit.

Psychosociální stres zvýšil relativní koncentraci transkriptu genu pro GR v hypofýze. Zvýšení přitom velmi dobře koreluje se zvýšenou hladinou kortikosteronu – jak exprese GR, tak hladina kortikosteronu, byly nejvyšší u vetřelců. Již zde bylo řečeno, že hypofýza představuje jedno ze dvou hlavních míst negativní zpětnovazebné regulace HPA osy. Ta je zde zprostředkována vazbou kortikosteronu právě na GR (De Kloet, 1998). Přestože jsou GR nízkoafinními receptory ve srovnání s MR, jsou i ony při vysokých hladinách kortikosteronu dosažených u vetřelců (až 420 ng/ml krevní plazmy) plně saturovány. Zvýšení množství GR tak představuje efektivní způsob posílení negativní zpětnovazebné regulace HPA osy.

6.2 Experiment č.2

Nejnápadnějším a nejsnáze měřitelným parametrem, na kterém se mohou projevit účinky stresu, je hmotnost některých orgánů. Proto jsme u zvířat na konci třídenního stresového protokolu (30. den věku zvířat) zjišťovali hmotnost hypofýzy, nadledvin a thymu. Třídenní stresový protokol neměl vliv na hmotnost hypofýzy. Ukázal se však signifikantní efekt stresu na hmotnost nadledvin. Hypertrofie nadledvin je přirozeným důsledkem stresové zátěže. Zvýšená aktivita HPA osy u stresovaných zvířat vede v nadledvinách k morfologickým změnám, které mají pomoci zajistit zvýšenou produkci glukokortikoidů (Bornstein & Chrousos, 1999). Tyto morfologické změny zahrnují jak hypertrofii, tak hyperplazii buněk v nadledvinách. U nadledvin zvětšených v důsledku stresu není pozměněna citlivost k ACTH, je však zvýšena celková kapacita tkáně pro produkci hormonů (Ulrich-Lai et al., 2006).

Je překvapivé, že k hypertrofii nadledvin nedošlo u zvířat, kterým byl před stresem podán blokátor enzymů 11 β -HSD zajišťujících tkáňový metabolismus glukokortikoidů. Zdá se, že velikost nadledvin je primárně řízena prostřednictvím ACTH. Při dlouhodobém vystavení nadledvin ACTH dochází nejprve k růstu celkového množství mRNA a proteinů, až později se zvyšuje také celkové množství DNA (Farese & Reddy, 1963; Ulrich-Lai et al., 2006). To by nasvědčovalo tomu, že účinkem ACTH dochází nejprve k hypertrofii buněk, která je následována zvýšením počtu buněk (hyperplazie). V nadledvinách je exprimován izoenzym 11 β -HSD1, a to ve všech třech vrstvách kůry nadledvin, ale nikoli ve dřeni nadledvin (Ricketts et al., 1998). 11 β -HSD1 zvyšuje v nadledvinách koncentraci aktivních glukokortikoidů. Zdá se nicméně nepravděpodobné, že by za potlačením růstu nadledvin, ke

kterému došlo v našem experimentu, stála blokace nadledvinové 11 β -HSD1. Velikost nadledvin je totiž regulována ACTH, a nikoli glukokortikoidy, jak již bylo řečeno. Podíváme-li se na koncentraci ACTH v plazmě zvířat (tabule č.7, graf A), zjistíme, že ta je u stresovaných zvířat s podaným blokátorem skutečně nižší oproti stresovaným zvířatům bez podaného blokátoru, avšak tento rozdíl není signifikantní. Námí zjištěná koncentrace ACTH nicméně nemusí být zcela relevantní, protože byla zjišťována po ukončení 2 hodiny trvajících hypokinetického stresu, a nezachycuje tím pádem hodnoty bezprostředně po začátku aplikace stresoru. Zdá se pravděpodobné, že efekt potlačení růstu nadledvin blokací enzymu 11 β -HSD1 je realizován na úrovni nejvyšších pater HPA osy, jako je PVN nebo hypofýza. Zde blokace enzymu naruší regulaci HPA osy a pozmění tak její aktivitu. Přesný mechanismus této změny je však nejasný.

Katabolický efekt glukokortikoidů na thymus je dobře znám. Hypertrofie nadledvin proto bývá doprovázena atrofií thymu, jak ukázali například Steffen & Musacchia (1986). V tomto smyslu je námí zjištěný pokles hmotnosti thymu v souladu s dosud popsanými efekty stresu na thymus.

V jedné z prací, zabývajících se vlivem juvenilního stresu na kognitivní funkce a na míru anxiety u potkana, se ukázalo, že juvenilní stres, v kombinaci s aplikací stresoru v dospělém věku, vede u zvířat k vyšší míře anxiety a zlepšuje některé kognitivní funkce (konkrétně výkon v Morrisově vodním bludišti; Avital & Richter-Levin, 2005). Inspirováni touto prací, zařadili jsme do experimentu č.2 test na míru anxiety a lokomoční aktivitu zvířat (test otevřeného pole, openfield) a test na pracovní paměť (trojramenné bludiště, Y-maze). Do testů byla zahrnuta i zvířata, kterým byl před každou aplikací stresoru podáván blokátor enzymů 11 β -HSD, tedy enzymů tkáňového metabolismu glukokortikoidů.

Testu v otevřeném poli byla zvířata podrobena den po skončení třídenního stresového protokolu v juvenilním věku. Efekt juvenilního stresu na lokomoční aktivitu ani na míru anxiety se neprokázal. To je částečně v rozporu s výsledky, které publikovali v nedávné době Eiland et al. (2012). Ti, podobně jako my, neprokázali vliv juvenilního stresu na míru anxiety, prokázali však zvýšení lokomoční aktivity. K měření obou parametrů použili vyvýšené bludiště (elevated plus-maze). Je však třeba doplnit, že jako stresor použili Eiland et al. hypokinetický stres trvajících 6 hodin denně po dobu 21 dnů, což je stres, který se svým charakterem výrazně liší od námí použitého stresu. Míru anxiety a lokomoční aktivitu zjišťovali v 41. dnu věku zvířat.

Nebyl prokázán ani efekt juvenilního stresu a následného akutního adultního stresu na pracovní paměť potkanů, který jsme zjišťovali u 61 dní starých zvířat. K jejímu měření jsme použili trojramenné bludiště ve tvaru „Y“, kde jsme sledovali míru spontánní alternace potkanů. Tato metoda není příliš rozšířená, což bohužel znemožňuje přímé srovnání s výsledky ostatních prací. Avital & Richter-Levin (2005), kteří použili k evaluaci prostorové paměti Morrisovo vodní bludiště, prokázali nejlepší výsledky u zvířat, která byla vystavena juvenilnímu i adultnímu stresu.

Test v bludišti tvaru „Y“ ukázal nižší celkový počet vstupů do ramen bludiště u zvířat, která byla vystavena pouze juvenilnímu stresu. To sice nic nevyovídá o pracovní paměti zvířat, tuto hodnotu však můžeme považovat za míru jejich lokomoční aktivity. To by odpovídalo i výsledkům, které získali Avital & Richter-Levin (2005) – ti však zjistili sníženou lokomoční aktivitu nejen u zvířat stresovaných v juvenilním věku, ale i u všech ostatních zvířat vystavených stresu.

Dosud publikovaná literatura nabízí celou řadu kombinací použitých stresorů a použitých testů na měření míry anxiety, případně kognitivních funkcí. Přitom práce Pohl et al. (2007) ukázala, že aplikace různých typů stresu v juvenilním věku (těžký sporadický stres vs. mírný chronický stres) má rozdílný vliv na míru anxiety u zvířat v dospělosti. Je velmi problematické porovnávat závěry prací, které se od sebe navzájem liší použitými metodami. Také naše práce byla originální kombinací použitého stresoru a použitých behaviorálních metod, která nemá v publikované literatuře přímé srovnání.

U potkanů v experimentu č.2 byla zjišťována plazmatická hladina stresových hormonů ACTH a kortikosteronu. U zvířat starých 30 dnů byly vzorky krve odebrány současně s usmrcením zvířat, které bylo provedeno po ukončení 2 hodiny trvajících hypokinetického stresu. Ukázalo se, že 2 hodiny po zahájení aplikace hypokinetického stresu již není množství ACTH v krvi zvýšené. To je plně v souladu s prací De Souza a Van Loon (1982), kteří ukázali, že po zahájení aplikace hypokinetického stresu se koncentrace ACTH vrací k bazálním hodnotám do půl hodiny. Ke zvýšení koncentrace ACTH po zahájení aplikace stresoru v našem experimentu však prokazatelně dojít muselo, na což ukazuje jednak zvýšené množství transkriptu prekurzoru pro ACTH v hypofýze (bude ještě dále zmíněno), jednak zvýšená koncentrace kortikosteronu, jehož sekrece z nadledvin je ACTH přímo řízena. Vyvozujeme z toho, že koncentrace ACTH není vhodný ukazatel aktivity HPA osy při použití déle trvajících stresorů, protože zvýšená, stresem indukovaná koncentrace klesá po zahájení aplikace stresoru velmi rychle zpět k bazálním hodnotám. Hladina kortikosteronu byla

zvýšená u stresovaných zvířat i u stresovaných zvířat s podanou GA, přičemž maximálních hodnot okolo 290 ng/ml krevní plazmy dosáhla u stresovaných zvířat. Naměřené koncentrace kortikosteronu svědčí o tom, že hypokinetický stres představoval pro zvířata silnou stresovou zátěž.

Koncentrace ACTH a kortikosteronu byla zjišťována rovněž u 60 dní starých zvířat po ukončení 15 min trvajících vynuceného plavání. Překvapivě zde nebyl zjištěn rozdíl v koncentraci ACTH mezi stresovanými zvířaty a kontrolami ve skupině, která byla v juvenilním věku intaktní. Pro koncentraci ACTH však byl zjištěn signifikantní efekt kombinace zacházení v juvenilním věku a zacházení v adultním věku. Konkrétně to znamená, že zvířata, která byla intaktní v dospělosti, ale lišila se zacházením v juvenilním věku, měla rozdílnou koncentraci ACTH v krvi v dospělém věku. U v mládí stresovaných zvířat byla koncentrace ACTH vyšší oproti zvířatům stresovaným v mládí, kterým byla podána GA. Byli však aplikován adultní stres, projevilo se to signifikantním nárůstem koncentrace ACTH pouze u zvířat, která byla v mládí stresována s aplikovanou GA.

Není překvapivé, že na koncentraci kortikosteronu se výrazně projevil efekt zacházení v dospělosti. U všech skupin zvířat vystavených nucenému plavání došlo k dramatickému nárůstu koncentrace kortikosteronu. Prokázal se rovněž efekt zacházení v juvenilním věku. U zvířat stresovaných v juvenilním věku, kterým byla aplikována GA, bylo totiž zvýšení koncentrace kortikosteronu následkem aplikace adultního stresu podstatně vyšší, než u ostatních v dospělosti stresovaných skupin.

Výsledky měření koncentrací ACTH a kortikosteronu společně svědčí o mírné dysregulaci HPA osy u zvířat, která byla v juvenilním věku stresována a kterým byla před každým stresem podávána GA. Tato zvířata vykazují známky zvýšené citlivosti HPA osy ke stresu, což se projevilo výraznějším nárůstem koncentrace ACTH a kortikosteronu po aplikaci stresoru v adultním věku. Čím může být tento efekt způsoben?

U lidí je popsán fenomén zvaný posttraumatická stresová porucha (PTSD, post-traumatic stress disorder). Ta se projevuje zvýšenou citlivostí HPA osy ke glukokortikoidům zprostředkované negativní zpětné vazbě, což je důsledek prodělaného silného stresu. U animálního modelu pro PTSD bylo prokázáno, že silný stres zvýší citlivost negativní zpětné vazby. Je-li zvířatům podán kortikosteron sedm dní po prodělaném silném stresu a těsně před vystavením dalšímu stresoru, inhibuje podaný kortikosteron u těchto zvířat stresovou odpověď (Liberzon et al., 1997). Inhibiční efekt podaného kortikosteronu není tak výrazný u zvířat, která nebyla vystavena prvotnímu stresu. Můžeme spekulovat o tom, že podání GA potlačilo modulační efekt juvenilního stresu na HPA osu. Zablokováním enzymu 11 β -HSD1

v místech klíčových pro negativní zpětnovazebnou regulaci (PVN, hypofýza) uchráníme tato místa před zvýšenou koncentrací glukokortikoidů, a znemožníme tak senzitivizaci negativní zpětné vazby. HPA osa zvířat s podaným blokátorem bude jinými slovy ve stavu, jako by se zvířata se stresem vůbec neseetkala. Tento způsob vysvětlení zvýšené citlivosti HPA osy u zvířat s podaným blokátorem však naráží na fakt, že u zvířat stresovaných v mládí bez podaného blokátoru se neprojevovalo zesílení negativní zpětné vazby. Kdyby k takovému zesílení došlo, musela by být stresová odpověď na adultní stres u těchto zvířat slabší oproti kontrolám, což však v našich výsledcích nepozorujeme – stresovaná zvířata se v koncentraci ACTH ani kortikosteronu neliší od kontrol. Druhou možností tedy je, že k zesílení stresové odpovědi u zvířat s podaným blokátorem ani tak nedošlo potlačením zesílení negativní zpětné vazby, jako spíše pozitivní stimulací excitačních míst v HPA ose. Mechanismus takového eventuálního účinku je však nejasný.

Na tomto místě je třeba zmínit úskalí týkající se námi použitého blokátoru a způsobu jeho podání. K blokaci enzymu 11β -HSD1, uplatňujícího se v tkáňovém metabolismu glukokortikoidů, byla použita glycyrrhetinová kyselina, podávaná zvířatům intraperitoneálně. GA je nespecifický blokátor, inhibující činnost obou izoenzymů 11β -HSD1 i 11β -HSD2, stejně jako některých dalších dehydrogenáz. Díky intraperitoneálnímu podání bylo navíc působení GA systémové a zasáhlo celý organismus zvířete. Bylo by samozřejmě vhodnější použít specifický blokátor 11β -HSD1 podaný přímo do cílové tkáně (v našem případě do struktur mozku zapojených do HPA osy a její regulace). Specifický blokátor izoenzymu 11β -HSD1 však dosud není znám. Podávání blokátoru přímo do mozku by bylo navíc technicky velmi náročné, a nebylo by při něm možné vyloučit zásahy, které by samy o sobě ovlivnily kognitivní funkce, které jsme v našem experimentu sledovali.

Měřením hladiny stresových hormonů jsme získali představu o aktivitě HPA osy. Abychom lépe pochopili změny, ke kterým v HPA ose pod vlivem stresu dochází, zjišťovali jsme na úrovni transkriptu expresi genů klíčových z hlediska aktivity a regulace HPA osy v hypofýze. Jednalo se o expresi genů pro CRHr1, POMC, GR a 11β -HSD1. U 30 dní starých zvířat po třídním stresovém protokolu byla zjištěna změna v expresi POMC. Exprese byla zvýšená u stresovaných zvířat i u stresovaných zvířat s aplikovanou GA, přičemž tyto dvě skupiny se mezi sebou signifikantně nelišily. Hladina transkriptu pro POMC dobře odráží aktivitu HPA osy, a to i s delším časovým odstupem od začátku aplikace stresoru (v našem případě po 2 hodinách). To se nedá říct o ACTH, produktu hydrolýzy POMC, jehož koncentrace v krvi byla 2 hodiny po začátku aplikace stresoru již na bazálních hodnotách.

Koncentrace transkriptu pro CRHr1 byla snižena jak u stresovaných zvířat, tak u zvířat s aplikovanou GA – mezi sebou se tyto dvě skupiny signifikantně nelišily. CRHr1 je receptor pro CRH bohatě exprimovaný mimo jiné právě v hypofýze (Hillhouse & Grammatopoulos, 2006). Přítomnost tohoto receptoru je zásadní pro fungování HPA osy, což dokazuje fenotyp myši s knock-outovaným genem pro CRHr1 (Timpl et al., 1998). U těchto zvířat je klidová koncentrace kortikosteronu pod hranicí detekce. Po vystavení stresoru u nich nedochází ke zvýšení koncentrace ACTH, a zvýšení koncentrace kortikosteronu je u nich 7-krát nižší oproti wild-type myším. Co je však nejzajímavější z hlediska této práce, CRH se ukázal být důležitým mediátorem projevů anxiety a exploračního chování. Transgenní myši s nadprodukcí CRH vykazují vyšší míru anxiety a nižší aktivitu exploračního chování (Stenzel-Poore et al., 1994). Naopak, myši s knock-outovaným genem pro CRHr1 vykazují nižší míru anxiety a vyšší intenzitu exploračního chování (Timpl et al., 1998). Není však vůbec jisté, zda je tento efekt realizován právě na úrovni hypofýzy. Mohl by mít svůj původ například v amygdale nebo hippocampu, kde je CRHr1 rovněž exprimován. Pokles exprese CRHr1 v hypofýze se v našem experimentu neprojevil ani na míře anxiety, ani na intenzitě exploračního chování v testu otevřeného pole.

Byl popsán přechodný pokles mRNA pro CRHr1 v hypofýze po každé aplikaci stresoru v průběhu opakovaného stresu (Makino et al., 1995). Na tomto poklesu se spolupodílejí jak CRH, tak glukokortikoidy. Oba tyto hormony mají schopnost snížit množství CRHr1 v hypofýze (Aguilera, 1994; Ochedalski et al., 1998). Zdá se, že po dobu snížené koncentrace CRHr1 v hypofýze přebírá dominantní vliv na aktivitu HPA osy vazopresin, uvolňovaný z parvocelulárních buněk PVN (Aguilera, 1998). Stresem vyvolaný pokles koncentrace transkriptu pro CRHr1 je jedním z mechanismů uplatňujícím se při negativní zpětné vazbě. Dalším takovým mechanismem je tlumení produkce CRH glukokortikoidy (Guardiola-Diaz et al., 1996). Zvýšená hladina glukokortikoidů při stresu tedy snižuje jak produkci CRH, tak koncentraci jeho receptoru.

Koncentrace transkriptu genů pro GR a 11 β -HSD1 stresem ovlivněna nebyla. Porovnáme-li změnu koncentrace transkriptu genu pro GR v experimentu č.1 a experimentu č.2, zjistíme, že v experimentu č.1 došlo pod vlivem opakujícího se psychosociálního stresu k výraznému zvýšení koncentrace, zatímco v experimentu č.2 nedošlo pod vlivem třídního stresového protokolu ani při akutním adultním stresu k žádným změnám. Je to další doklad toho, že typ a doba trvání stresu mají zásadní vliv na charakter stresové odpovědi.

Transkripty genů v hypofýze byly zjišťovány rovněž u zvířat starých 60 dnů po vystavení akutnímu adultnímu stresu. Byl prokázán efekt akutního stresu na koncentraci

transkriptu pro POMC. Tento efekt se však překvapivě neprojevil u v mládí intaktních zvířat, kde stres v dospělosti nevyvolal signifikantní změnu transkriptu pro POMC oproti kontrolám.

Byl zjištěn signifikantní rozdíl v koncentraci transkriptu pro CRHr1 u dvou skupin v dospělosti stresovaných zvířat, z nichž jedna skupina byla v juvenilním věku stresována bez aplikovaného inhibitoru a druhá s aplikovaným inhibitorem. Snížené množství CRHr1 u skupiny s aplikovaným inhibitorem dobře koreluje se zvýšenou hladinou kortikosteronu u této skupiny po akutním adultním stresu. Glukokortikoidy snižují expresi CRHr1 v hypofýze (Ochedalski et al., 1998). Námi zjištěný pokles transkriptu pro CRHr1 v hypofýze je tedy důsledkem zvýšené koncentrace kortikosteronu, a je to důkaz existence negativní zpětné vazby zprostředkované glukokortikoidy.

Nebyly zjištěny žádné signifikantní změny v expresi genů pro GR a 11 β -HSD1 hypofýze.

7. Závěr

Za účelem studia dějů, ke kterým dochází v organismu vystavenému stresu, byl vytvořen již bezpočet modelů stresu u laboratorních zvířat. Dva z nich byly použity v této práci – model sociální anxiety u potkanů (zvaný „rezident-vetřelec“ test) a model tří denního opakovaného stresu u juvenilních potkanů. S jejich použitím jsme se pokusili zodpovědět otázky, které jsme si položili před začátkem naší experimentální práce.

Podařilo se nám prokázat funkčnost uspořádání „rezident-intruder“ jakožto modelu sociální anxiety u potkanů. Naším dalším cílem bylo popsat efekt psychosociálního stresu na organismus potkana. Vzhledem k masivnímu nárůstu koncentrace stresových hormonů (podstatně vyšší u zvířat v submisivním postavení) představoval psychosociální stres pro zvířata velmi silnou stresovou zátěž. Nárůst koncentrace transkriptu pro GR v hypofýze u stresovaných zvířat svědčí o zvýšení citlivosti HPA osy ke glukokortikoidům zprostředkované negativní zpětné vazbě. Analýza chování stresovaných zvířat prokázala dominantní postavení rezidentů a submisivní pozici vetřelců. To dobře koreluje s hladinou stresových hormonů, která byla vyšší u submisivních zvířat. Ukázalo se, že analýzou chování potkanů můžeme zjistit míru jejich sociální anxiety.

Neprokázal se vliv tří denního opakujícího se stresu u juvenilních potkanů na míru jejich anxiety v mládí ani na pracovní paměť v dospělosti. Tří denní stres byl však pro zvířata prokazatelně silnou stresovou zátěží, což lze doložit jednak hmotností některých orgánů (zvětšené nadledviny a zmenšený thymus), jednak vysokým nárůstem plazmatické koncentrace kortikosteronu u stresovaných zvířat. Negativní zpětná vazba glukokortikoidů a pravděpodobně také CRH způsobila pokles transkriptu pro CRHr1 v hypofýze, což je jeden z mechanismů, kterými je negativní zpětné utlumení HPA osy realizováno. Nedošlo však ke změně citlivosti negativní zpětné vazby ke glukokortikoidům na úrovni hypofýzy, což by se v opačném případě muselo projevit změnou exprese genu pro GR. Na základě porovnání plazmatické koncentrace ACTH a koncentrace transkriptu pro POMC v hypofýze jsme došli k závěru, že koncentrace transkriptu pro POMC lépe vystihuje aktivitu HPA osy u stresorů, které trvají delší dobu. Hladina transkriptu genu pro POMC je vhodnějším indikátorem aktivity HPA osy u déle trvajících stresorů, než plazmatická koncentrace ACTH.

Jak samotný název této práce napovídá, cíle práce nebyly zúženy na pouhý popis změn, ke kterým v organismu dochází pod vlivem stresoru. Další otázky byly, zda stres v mládí dlouhodobě ovlivní citlivost HPA osy ke stresu, a jakou roli v tomto případném ovlivnění hraje tkáňový metabolismus glukokortikoidů. V našem experimentálním uspořádání

se nepodařilo prokázat dlouhodobý efekt juvenilního stresu na aktivitu HPA osy ani na její citlivost ke stresu v dospělosti. Prokázali jsme však modulační efekt blokace enzymů 11 β -HSD na HPA osu během stresu v mládí, který se projevil při opakovaném stresu v dospělosti. Při stresu v dospělosti vykazovala zvířata s v mládí podaným blokátorem mírně zvýšenou citlivost HPA osy ke stresu. To se projevilo zvýšenou koncentrací stresových hormonů (kortikosteron a ACTH) a sníženou koncentrací transkriptu pro CRHr1 v hypofýze oproti zvířatům, kterým blokátor enzymů 11 β -HSD podán nebyl. Nemáme však jasné vysvětlení mechanismu, který k takovému zvýšení citlivosti HPA osy vede.

Použití dvou různých stresových modelů nám umožňuje mezi sebou tyto modely porovnat. Výsledky nejen našich experimentů nasvědčují tomu, že na stresem vyvolané změny v organismu má vliv typ stresu, jeho intenzita i délka trvání. To lze nejlépe dokumentovat na změně koncentrace transkriptu genu pro GR v hypofýze. Zatímco u zvířat vystavených sedm dní se opakujícím sociálnímu stresu k její změně došlo, u zvířat vystavených třídnímu juvenilnímu stresu ani akutnímu adultnímu stresu jsme žádnou změnu koncentrace transkriptu nepozorovali. Stres není možné chápat jako uniformní fenomén, jak by k tomu vybízelo klasické pojetí Hanse Selye s jeho všeobecným adaptačním syndromem. Stejně jako existuje pestrá škála typů a intenzit stresu, existuje rovněž pestrá paleta změn, ke kterým v organismu pod vlivem stresu dochází. Je však třeba podotknout, že za rozdíly zjištěnými v našich experimentech může stát i rozdíl v kmenech potkanů, kteří byli k experimentům použiti.

Jedním z hlavních cílů této práce bylo zhodnotit vliv tkáňového metabolismu glukokortikoidů na aktivitu HPA osy. Podařilo se prokázat slabý efekt blokace enzymů 11 β -HSD při juvenilním stresu, což vedlo ke zvýšení citlivosti HPA osy ke stresu v dospělosti. Tento výsledek je však třeba brát spíše jako příslib směrem k budoucímu výzkumu, než jako pevný a neoddiskutovatelný fakt. Je třeba mít na paměti, že podání blokátoru bylo systémové a samotný blokátor funguje nespecificky, což znemožňuje vyloučit jeho vedlejší účinky. V nalezení specifického blokátoru 11 β -HSD1 a jeho cíleném podání přímo do tkáně zájmu spatřuji další krok, který umožní získat detailnější poznatky o vlivu metabolismu glukokortikoidů na stresovou odpověď.

Seznam použité literatury

Aguilera, G. (1994) Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 15: 321 - 350.

Aguilera, G. (1998) Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 9: 329 – 336.

Amelung, D., Hubener, H. J., Roka, L., Meyerheim, G. (1953) Conversion of cortisone to compound-F. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 13: 1125 – 1126.

Avital, A., Richter-Levin, G. (2005) Exposure to juvenile stress exacerbates the behavioral consequences of exposure to stress in the adult rat. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. 8: 163 – 173.

Benediktsson, R., Calder, A. A., Edwards, Ch. R. W., Seckl, J. R. (1997) Placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clinical Endocrinology*. 46: 161 – 166.

Bornstein, S. R., Chrousos, G. P. (1999) Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 84: 1729 – 1736.

Bradbury, M. J., Akana, S. F., Dallman, M. F. (1994) Roles of type 1 and 2 corticosteroid receptors in regulation of basal activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the diurnal trough and the peak: Evidence for a nonadditive effect of combined receptor occupation. *Endocrinology*. 134: 1286 – 1296.

Bradbury, M. J., Strack, A. M., Dallman, M. F. (1993) Lesions of the hippocampal efferent pathway (fimbria - fornix) do not alter sensitivity of adrenocorticotropin to feedback inhibition by corticosterone in rats. *Neuroendocrinology*. 58: 396 - 407.

Dachir, S., Kadar, T., Robinzon, B., Levy, A. (1993) Cognitive deficits induced in young rats by long-term corticosterone administration. *Behavioral and Neural Biology*. 60: 103 – 109.

Dallman, M. F., Akana, S. F., Jacobson, L., Levin, N., Cascio, C. S., Shinsako, J. (1987) Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 512: 402 – 414.

De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., Joels, M. (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews*. 19: 269 – 301.

De Souza, E. B., Van Loon, G. R. (1982) Stress-induced inhibition of the plasma corticosterone response to a subsequent stress in rats: a nonadrenocorticotropin-mediated mechanism. *Endocrinology*. 110: 23 – 33.

Diamond D. M., Bennett M. C., Fleshner M., Rose G. M. (1992) Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus*. 2: 421 – 430.

Diederich, S., Quinkler, M., Burkhardt, P., Grossmann, C., Bahr, V., Oelkers, W. (2000) 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase isoforms: tissue distribution and implications for clinical medicine. *European Journal of Clinical Investigation*. 30: 21 – 27.

Eiland, L., Ramroop, J., Hill, M. N., Manley, J., McEwen, B. S. (2012) Chronic juvenile stress produces corticolimbic dendritic architectural remodeling and modulates emotional behavior in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*. 37: 39 – 47.

Farese, R. V., Reddy, W. J. (1963) Observations on the interrelations between adrenal protein, RNA and DNA during prolonged ACTH administration. *Biochemica et biophysica acta*. 76: 145 – 148.

Funder, J. W., Pearce, P. T., Smith, R., Smith, A. I. (1988) Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science*. 242: 583 – 585.

Guardiola-Diaz, H. M., Kolinske, J. S., Gates, L. H., Seasholtz, A. F. (1996) Negative glucocorticoid regulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-stimulated corticotropin-releasing hormone-reporter expression in AtT-20 cells. *Molecular Endocrinology*. 10: 317 – 329.

Hadley, M. E., Haskell-Luevano, C. (1999) The proopiomelanocortin system. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 885: 1 – 21.

Harris, H. J., Kotelevtsev, Y., Mullins, J. J., Seckl, J. R., Holmes, M. C. (2001) Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD)-1 plays a key role in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Analysis of 11 β -HSD-1 deficient mice. *Endocrinology*. 142: 114 – 120.

Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Cullinan, W. E. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 24: 151 – 180.

Herman, J. P., Patel, P. D., Akil, H., Watson, S. J. (1989) Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Molecular Endocrinology*. 3: 1886 - 1894.

Hidaka, N., Suemaru, K., Takechi, K., Li, B., Araki, H. (2011) Inhibitory effects of valproate on impairment of Y-maze alternation behavior induced by repeated electroconvulsive seizures and c-Fos protein levels in rat brains. *Acta Medica Okayama*. 65: 269 – 277.

Hillhouse, E. W., Grammatopoulos, D. K. (2006) The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormones receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocrine Reviews*. 27: 260 – 286.

Hillier, S. G. (2007) Diamonds are forever: the cortisone legacy. *Journal of Endocrinology*. 195: 1 – 6.

Holmes, M. C., Kotelevtsev, Y., Mullins, J. J., Seckl, J. R. (2001) Phenotypic analysis of mice bearing targeted deletions of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases 1 and 2 genes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 171: 15 – 20.

Hughes, R. N. (2004) The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 28: 497 – 505.

Ilin, Y., Richter-Levin, G. (2009) Enriched environment experience overcomes learning deficits and depressive-like behavior induced by juvenile stress. *PLoS ONE*. 4: 1 – 12.

Jellinck, P. H., Monder, C., McEwen, B. S., Sakai, R. R. (1993) Differential inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase by carbenoxolone in rat brain regions and peripheral tissues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 46: 209 – 213.

Kalsbeek, A., van Heerikhuize, J. J., Wortel, J., Buijs, R. M. (1996) A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopresin V₁ antagonist. *The Journal of Neuroscience*. 16: 5555-5565.

Kerr, D. S., Campbell, L. W., Applegate, M. D., Brodish, A., Landfield, P. W. (1991) Chronic stress-induced acceleration of electrophysiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging. *The Journal of Neuroscience*. 11: 1316 – 1324.

Kotelevtsev, Y., Holmes, M. C., Burchell, A., Houston, P. M., Schmoll, D., Jamieson, P., Best, R., Brown, R., Edwards, Ch. R. W., Seckl, J. R., Mullins, J. J. (1997) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses

and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 94: 14924 – 14929.

Lakshmi, V., Monder, C. (1988) Purification and characterization of the corticosteroid 11 β -dehydrogenase component of the rat-liver 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase complex. *Endocrinology*. 123: 2390 – 2398.

Latif, S. A., Conca, T. J., Morris, D. J. (1990) The effects of the licorice derivatives, glycyrrhetic acid, on hepatic 3 α - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases and 5 α - and 5 β -reductase pathways of metabolism of aldosterone in male rats. *Steroids*. 55: 52 – 58.

Levine, S. (1957) Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science*. 126: 450.

Liberzon, I., Krstov, M., Young, E. A. (1997) Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology*. 22: 443 – 453.

Lupien, S. J., Leon, M., Santi, S., Convit, A., Tarshis, Ch., Nair, N. P. V., Thakur, M., McEwen, B. S., Hauger, R. L., Meaney, M. J. (1998) Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nature Neuroscience*. 1: 69 – 73.

Maggio, N., Segal, M. (2011) Persistent changes in ability to express long-term potentiation/depression in the rat hippocampus after juvenile/adult stress. *Biological psychiatry*. 69: 748 – 753.

Makino, S., Schulkin, J., Smith, M. A., Pacák, K., Palkovits, M., Gold, P. W. (1995) Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology*. 136: 4517 - 4525.

McEwen, B. S. (1999) Stress and the aging hippocampus. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 20: 49 – 70.

McEwen, B. S., Wingfield, J. C. (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*. 43: 2 – 15.

Mitchell, P. J., Redfern, P. H. (2005) Animal models of depressive illness: the importance of chronic drug treatment. *Current Pharmaceutical Design*. 11: 171 – 203.

Moisan, M. P., Seckl, J. R., Edwards, Ch. R. W. (1990) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase bioactivity and messenger RNA expression in rat forebrain: localization in hypothalamus, hippocampus, and cortex. *Endocrinology*. 127: 1450 – 1455.

Ochedalski, T., Rabadan-Diehl, C., Aguilera, G. (1998) Interaction between glucocorticoids and corticotropin releasing hormone (CRH) in the regulation of the pituitary CRH receptor in vivo in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*. 10: 363 – 369.

Plotsky, P. M., Meaney, M. J. (1993) Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Molecular Brain Research*. 18: 195 - 200.

Pohl, J., Olmstead, M. C., Wynne-Edwards, K. E., Harkness, K., Menard, J. L. (2007) Repeated exposure to stress across the childhood-adolescent period alters rats' anxiety- and depression-like behaviors in adulthood: the importance of stressor type and gender. *Behavioral Neuroscience*. 121: 462 – 474.

Porterfield, V. M., Zimomra, Z. R., Caldwell, E. A., Camp, R. M., Gabella, K. M., Johnson, J. D., (2011) Rat strain differences in restraint stress-induced brain cytokines. *Neuroscience*. 188: 48 - 54.

Rajan, V., Edwards, Ch. R. W., Seckl, J. R. (1996) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase in cultured hippocampal cells reactivates inert 11-dehydrocorticosterone, potentiating neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*. 16: 65 – 70.

Rajan, V., Edwards, Ch. R. W., Seckl, J. R. (1996) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase in cultured hippocampal cells reactivates inert 11-dehydrocorticosterone, potentiating neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*. 16: 65 – 70.

Ricketts, M. L., Verhaeg, J. M., Bujalska, I., Howie, A. J., Rainey, W. E., Stewart, P. M. (1998) Immunohistochemical localization of type 1 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 83: 1325 – 1335.

Roland, B. L., Li, K. X., Funder, J. W. (1995) Hybridization histochemical localization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat brain. *Endocrinology*. 136: 4697 – 4700.

Romeo, R. D., Lee, S. J., Chhua, N., McPherson, Ch. R., McEwen, B. S. (2004) Testosterone cannot activate an adult-like stress response in prepubertal male rats. *Neuroendocrinology*. 79: 125 – 132.

Rusvai, E., Naray-Fejes-Toth, A. (1993) A new isoform of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in aldosterone target cells. *Journal of Biological Chemistry*. 268: 10717 – 10720.

Sandeep, T. C., Yau, J. L. W., MacLulich, A. M. J., Noble, J., Deary, I. J., Walker, B. R., Seckl, J. R. (2004) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase inhibition improves cognitive function in healthy elderly men and type 2 diabetics. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 101: 6734 – 6739.

Sapolsky, R. M., Romero, L. M., Munck, A. U. (2000) How do glucocorticoids influence stress response? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*. 21: 55 – 89.

Seckl, J. R. (1997) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Frontiers in Neuroendocrinology*. 18: 49 – 99.

Selye, H. (1936) A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*. 138: 32. Přetištěno v *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 10: 230 – 231.

Selye, H. (1950) Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*. 1383 – 1392.

Shams, M., Kilby, M. D., Somerset, D. A., Howie, A. J., Gupta, A., Wood, P. J., Afnan, M., Stewart, P. M. (1998) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Human Reproduction*. 13: 799 – 804.

Steffen, J. M., Musacchia, X. J. (1986) Thymic involution in the suspended rat: adrenal hypertrophy and glucocorticoid receptor content. *Aviation, Space & Environmental Medicine*. 57: 162 – 167.

Stenzel-Poore, M. P., Heinrichs, S. C., Rivest, S., Koob, G. F., Vale, W. W. (1994) Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *Journal of Neuroscience*. 14: 2579 – 2584.

Stewart, P. M., Corrie, J. E. T., Shackleton, C. H. L., Edwards, C. R. W. (1988) Syndrome of apparent mineralocorticoid excess - a defect in the cortisol cortisone shuttle. *Journal of Clinical Investigation*. 82: 340 – 349.

Timpl, P., Spanagel, R., Sillaber, I., Kresse, A., Reul, J. M. H. M., Stalla, G. K., Blanquet, V., Steckler, T., Holsboer, F., Wurst, W. (1998) Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nature Genetics*. 19: 162 – 166.

Tsigos, C., Chrousos, G. P. (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*. 53: 865 – 871.

Ulrich-Lai, Y. M., Figueiredo, H. F., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Engeland, W. C., Herman, J. P. (2006) Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism*. 291: 965 – 973.

Vázquez, D. M. (1998) Stress and the developing limbic – hypothalamic – pituitary – adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*. 23: 663 – 700.

Vázquez, D. M., Akil, H. (1993) Pituitary-adrenal response to ether vapor in the weanling animal: characterization of the inhibitory effect of glucocorticoids on adrenocorticotropin secretion. *Pediatric Research*. 34: 646 – 653.

White, P. C., Mune, T., Agarwal, A. K. (1997) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocrine Reviews*. 18: 135 – 156.

Wu, H. H., Wang, S. (2010) Strain differences in the chronic mild stress, animal model of depression. *Behavioral Brain Research*. 213: 94 – 102.

Yau, J. L. W., Noble, J., Kenyon, Ch. J., Hibberd, C., Kotelevtsev, Y., Mullins, J. J., Seckl, J. R. (2001) Lack of tissue glucocorticoid reactivation in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice ameliorates age-related learning impairments. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 98: 4716 – 4721.

Young, W. S., Mezey, E., Siegel, R. E. (1986) Quantitative in situ hybridization histochemistry reveals increased levels of corticotropin-releasing factor mRNA after adrenalectomy in rats. *Neuroscience Letters*. 70: 198 - 203.

Zallocchi, M. L., Matkovic, L., Calvo, J. C., Damasco, M. C. (2004) Adrenal gland involvement in the regulation of renal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2. *Journal of Cellular Biochemistry*. 92: 591 – 602.

