

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Gergely Pallag

Analýza markerů oxidativního stresu v mozku potkana: vliv maternální separace

Analysis of oxidative stress markers in rat brain: the effect of maternal separation

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2019

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, 2.1.2019

Podpis

Poděkování

Na prvním místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za možnost vypracování diplomové práce, za jeho odborné vedení, ochotu a trpělivost. Také bych rád poděkoval za možnost vyzkoušet si různé metody. Velké poděkování patří Andree Slezákové za její rady během práce v chovu a paní laborantce Miladě Slezákové za veškerou pomoc v laboratoři a během pitev. Rád bych poděkoval i lidem pracujícím ve Skupině membránových receptorů a buněčné signalizace za snahu co nejdůkladněji odpovědět na moje otázky. Jsem také vděčný Kamile za její připomínky a rady. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

Nepříznivé události vyvolávající stres během rané fáze života mohou změnit normální vývoj mozku a neuroendokrinního systému a zvýšit zranitelnost jedince vůči různým poruchám. Chronický stres a následné vyplavení mediátorů může vést k oxidativnímu stresu a poškození buněk. Prvním záměrem této práce bylo stanovení vybraných markerů oxidativního stresu v mozkové kůře, hipokampu a mozečku po vystavení potkanů časnému chronickému stresu. Pro modelování stresové situace jsme používali tříhodinovou maternální separaci mláďat během prvních tří týdnů života. Vybrané markery byly koncentrace redukovaného glutathionu, proteinových karbonylů, lipidových peroxidů a hydroperoxidů. Markery jsme stanovili v mozcích potkanů starých 22 dnů. Pomocí použitých metod se nám nepodařilo zjistit žádné signifikantní změny v hladinách sledovaných markerů po maternální separaci.

Poškození mozkových buněk se může projevit i v chování. Výzkumy četných neuropsychiatrických a neurodegenerativních onemocnění nastínily, že oxidativní stres je slibným kandidátem pro vyvolání změn na buněčné úrovni. Druhým tématem práce bylo sledování chování potkanů pomocí testu light/dark box po maternální separaci a zároveň po aplikaci N-acetylcysteinu (NAC), látky se známými antioxidačními účinky. Ze získaných výsledků testů z 22. postnatálního dne nebylo možné jednoznačně určit, jaký vliv má separace a NAC na úzkostné chování mladých potkanů. U 90 denních potkanů předchází časná separace vyvolala úzkostné chování, což bylo částečně sníženo, pokud jako mláďata dostávala NAC.

Získaná data naznačují, že v mozku dospívajících potkanů používaný model stresování nevyvolává změny ve sledovaných markerech oxidativního stresu. Negativní vliv maternální separace se však projevil ve zvýšení úzkostného chování dospělých potkanů. V našich pokusech aplikace NAC vedla k snížení úzkosti.

Klíčová slova: Mozek, potkan, oxidativní stres, maternální separace, N-acetylcystein, úzkost

Abstract

Adverse events that cause stress during the early stages of life may alter the normal development of the brain and neuroendocrine system and increase the vulnerability of the individual to various disorders. Chronic stress and subsequent releasing of stress mediators can lead to oxidative stress and cell damage. The first aim of this work was to determine selected oxidative stress markers in the cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum after the exposure of rats to early life stress. To model the stressful situation, we used maternal separation of the offspring for three hours a day during the first three weeks of life. We choose reduced glutathione, protein carbonyls, lipid peroxides and hydroperoxides as typical markers. These markers were determined in the brains of rats aged 22 days. Any significant changes were found in the levels of the studied markers after maternal separation.

Damage to brain cells may also be reflected in behavior. Studies of numerous neuropsychiatric and neurodegenerative diseases have indicated that oxidative stress is a promising candidate for inducing changes at the cellular level. The second aim of this work was to monitor the behavior of rats by the light/dark box test after maternal separation along with administration of N-acetylcysteine (NAC), a drug with known antioxidant effects. The results obtained at 22nd postnatal day did not allow us to clearly determine the effect of separation and NAC on anxiety-like behaviors of young rats. In 90-day old rats, their previous early separation caused anxiety behavior, which was partially reduced in cases where NAC was injected during infancy.

The data obtained suggest that the stress model used in this study does not induce changes in the observed oxidative stress markers in the adolescent rat brain. However, the negative impact of maternal separation manifested by increased anxiety behavior of adult rats. In our experiments, NAC administration apparently reduced anxiety.

Key words: Brain, rat, oxidative stress, maternal separation, N-acetylcysteine, anxiety

Obsah

Abstrakt	3
Abstract	4
Seznam zkratek	7
1. Úvod	9
2. Literární přehled	10
2.1. Stres	10
2.1.1. Stresový systém	12
2.1.1.1. Sympato-andrenomedulární systém	12
2.1.1.2. HPA osa	12
2.1.1.3. Zpětná vazba glukokortikoidů	15
2.2. Časný stres	17
2.2.1. Maternální separace	19
2.2.2. Epigenetické dopady časného stresu	21
2.3. Oxidativní stres	22
2.3.1. Reaktivní formy kyslíku	23
2.3.2. Antioxidační obrana	25
2.3.2.1. Antioxidační enzymy	25
2.3.2.2. Antioxidační systémy	27
2.3.3. Markery oxidativního stresu	29
2.3.3.1. Poškození lipidů	29
2.3.3.2. Poškození proteinů	30
2.3.3.3. Změna poměru GSH/GSSG	31
2.3.4. Glukokortikoidy a oxidativní stres	31
3. Cíle práce	33
4. Materiál a metody	34
4.1. Pokusná zvířata	34
4.1.1. Aplikace N-acetylcysteinu	34
4.2. Behaviorální metody	35
4.2.1. Maternální separace	35
4.2.2. Light/dark box test	35
4.3. Homogenizace mozku	36

4.4. Biochemické metody.....	37
4.4.1. Stanovení proteinů.....	37
4.4.2. TBARS	38
4.4.3. Stanovení redukovaného glutathionu	39
4.4.4. Stanovení proteinových karbonylů.....	40
4.4.5. FOX assay.....	41
4.5. Analýza dat.....	41
5. Výsledky.....	42
5.1. Light/dark box test	42
5.1.1. Věk PND 89 ± 1	42
5.1.1.1. Počet vstupů do světlé části	42
5.1.1.2. Čas strávený ve světlé části	43
5.1.2. Věk PND22.....	44
5.1.2.1. Počet vstupů do světlé části.....	44
5.1.2.2. Čas strávený ve světlé části.....	45
5.2. Biochemické metody.....	46
5.2.1. Stanovení redukovaného glutathionu.....	46
5.2.1.1. Standardizace metody	46
5.2.1.2. Vliv maternální separace na koncentrace GSH v mozkových strukturách potkanů.....	48
5.2.2. TBARS	48
5.2.2.1. Standardizace metody.....	49
5.2.2.2. Vliv maternální separace na koncentrace TBARS v mozkových strukturách potkanů	50
5.2.3. Stanovení proteinových karbonylů.....	51
5.2.3.1. Standardizace metody.....	51
5.2.3.2. Vliv maternální separace na koncentrace proteinových karbonylů v mozkových strukturách potkanů.....	52
5.2.4. FOX assay.....	53
5.2.4.1. Standardizace metody FOX assay	53
5.2.4.2. Vliv maternální separace na koncentrace lipidových hydroperoxidů v mozečku potkanů.....	53
6. Diskuze.....	54
7. Závěr.....	59
8. Literatura	60

Seznam zkratek

11 β -HSD2	11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza typu 2
ABN	kojení s vyklenutými zády (arched back nursing)
ACTH	adrenokortikotropní hormon
AVP	arginin vazopressin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAT	kataláza
CBG	globulin vázající kortikosteroid
CORT	kortizol
CREB	protein vázající cAMP-responzivní element
CRH	kortikotropin uvolňující hormon
CRHR	CRH receptor
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
DTNB	5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoová kyselina)
GAS	obecný adaptační syndrom
GC	glukokortikoid
GPCR	receptor spřažený s G proteiny
GPx	glutathionperoxidáza
GR	glukokortikoidní receptor
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
HPA osa	osa hypothalamus-hypofýza-nadledvina
HPDS	hydrogenfosforečnan disodný pufr
IsoPs	isoprostan

LG	olizování a pečování o mláďata (licking an grooming)
MDA	malondialdehyd
mPFC	mediální prefrontální kůra
MR	mineralokortikoidní receptor
NAC	N-acetylcystein
NOX	nikotinamid-adenin-dinukleotid oxidáza
OT	oxytocin
PBS	fosfátový pufr
PKA	proteinkináza A
PNS	postnukleární supernatant
POMC	proopiomelanokortin
PVN	paraventriculární jádro
ROS	reaktivní formy kyslíku
SAM	sympato-adrenomedulární systém
SCN	suprachiasmatické jádro
SHRP	stresová hyporesponzivní perioda
SOD	superoxiddismutáza
TBA	thiobarbiturátová kyselina
TCA	trichloroctová kyselina
Trx	thioredoxin
Trxr	thioredoxin reduktáza
XO	xantin oxidáza
UCN	urocortin

1. Úvod

Stresová reakce je přirozená odpověď živočichů na nepříjemné až život ohrožující stimuly. Aktivuje nervový a hormonální systém, změny v chování, které vedou k adaptaci jedince na narušené prostředí. Mimo jiné nastartuje autonomní nervový systém a osu hypotalamus-hypofýza-nadledvina (HPA osa). Následně vyplavené katecholaminy a glukokortikoidy (GC) mobilizují organismus, aby mohl čelit nečekaným podnětům. V krátkém časovém úseku jsou tyto děje nevyhnutné a žádoucí pro udržení homeostázy, jejich chronická a nadměrná aktivace však může vést k patofyziologickým změnám. Stres vyvolává zvýšení metabolismu a přenos elektronů dýchacím řetězcem, což vede k nadměrné produkci reaktivních forem kyslíku (ROS). Jejich přílišná tvorba nebo nedostatečné odstranění vede k oxidativnímu stresu. Porucha redoxního stavu navodí řetězovou reakci, která vyúsťuje v poškození buněčných proteinů, lipidů a nukleových kyselin. Poškozené biomolekuly nebo změny v obranyschopnosti buněk mohou sloužit jako markery oxidativního stresu.

Mozek je klíčový orgán pro kontrolu odpovědi na stresové reakce a sám je cílem vyplavených stresových mediátorů. Zároveň je zvláště citlivý na účinky ROS kvůli vysoké potřebě kyslíku a značné dostupnosti lipidů citlivých na peroxidaci. Jelikož vývoj mozku není dokončen *in utero*, ale pokračuje po narození, časné postnatální zkušenosti mají velký dopad na rozvoj organismu. Stres v tomto citlivém období může mít trvalé účinky na chování, a často vyvolává změny na úrovni nervového systému, jednotlivých neuronů nebo i DNA.

Maternální separace potkanů je známá metoda pro vyvolání stresu v časně fázi života. Pomocí něj se dá modelovat psychosociální stres. Stále se zvyšující počet výzkumů naznačuje, že změny v mozku vyvolané oxidativním stresem po raném stresu jsou klíčovým jevem ve vývoji neuropsychiatrických a neurodegenerativních onemocnění. Výzkum zaměřený na analýzu markerů oxidativního stresu může přispět k podrobnějšímu odhalení etiopatogeneze některých onemocnění.

2. Literární přehled

2.1. Stres

Slovo stres má původ v oblasti fyziky. Podle Hookova zákona ze 17. století je deformace pružného předmětu úměrná působení napětí – stresu. V biomedicině se stal obecně používaným pojmem zásluhou Hanse Selyeho. Všiml si, že u potkanů vystavených různým nebezpečným činitelům se objevily typické patologické změny, jako zmenšení lymfatických orgánů, gastrointestinální vředy a zvětšení nadledvin. Tyto změny byly pozorovatelné nezávisle na povaze poškozujících podnětů. Jelikož se mu zdálo, že zmíněné malformace představovaly výsledek všeobecného úsilí organismu přizpůsobit se novým podmínkám, popsal reakci jako obecný adaptační syndrom (GAS). Selye rozlišoval u GAS tři fáze. V první fázi (poplachová reakce) se organismus ocitne v kritické situaci, a během druhého stádia se stane odolným vůči poškozujícímu agensu (adaptační fáze). Pokud ale nepříjemný stav působí dále i po adaptaci, nastane třetí fáze, kdy zvířata postupně ztrácejí odolnost vůči němu a umírají (fáze vyčerpání) (Selye, 1936). Tuto třífázovou nespecifickou reakci později označoval jako stresový syndrom, a jeho příčinu jako stresor. Za hlavní neuroendokrinní odpověď organismu považoval zvýšení produkce adrenokortikotropního hormonu (ACTH), který vyvolává produkci GC v kůře nadledvin (Selye, 1951). Později se ukázalo, že i když konečné příznaky stresových odpovědí mohou být stejné, různé stresory vyvolávají odlišné neurochemické a neuroendokrinní odpovědi (Pacak *et al.*, 1998). Liší se také mozkové oblasti a cesty v centrální nervové soustavě účastníci se odpovědi (Pacak & Palkovits, 2001).

Chrousos a Gold upravili myšlenku nespecifické odpovědi. Podle nich mohou být adaptační odpovědi vůči stresorům specifické, nebo nespecifické. Nespecifická odpověď se objevuje, pokud rozsah ohrožení homeostázy překročí určitou prahovou hodnotu (Chrousos, 1992).

Sterling a Eyer, kteří se snažili definovat fyziologické základy pro některé typické vzorce nemocnosti a úmrtnosti, navrhovali nový mechanismus proti homeostáze. Podle jejich teorie musí organismus pro udržení stability měnit všechny parametry vnitřního prostředí a přizpůsobit je požadavkům životního prostředí. Tuto zásadu adaptace – shrnuto jako stabilita prostřednictvím změn - nazvali allostáze (Sterling & Eyer, 1988). Termín byl později zaveden do oblasti výzkumu stresu. Tělo má systémy, které reagují na jeho aktuální stav, na vnější

prostředí, na averzní a nebezpečné stimuly. Mezi tyto systémy podporujícími přizpůsobení těla řadíme HPA osu, autonomní nervový systém, metabolické systémy a imunitní systém. Zatímco v případě homeostázy jsou fyziologické parametry udržovány v úzkém rozmezí, aktivita allostatických systému se pohybuje na široké škále v závislosti na denní době a v reakci na vnější a vnitřní požadavky. Tyto systémy fungují nejužitečněji, když je lze rychle mobilizovat a poté jejich činnost znovu tlumit, pokud již nejsou potřebné. V případě, že jsou allostatické systémy přepracovány, nejsou utlumeny po ukončení stresové události, anebo neodpovídají adekvátně na počáteční výzvu, dochází k allostatickému zatížení. Výsledkem je zatížení i dalších systémů, aby se vytvořila nová rovnováha. Je to cena za přizpůsobení systémů. Protože již pouhá anticipace nadcházející události může řídit uvolňování mediátorů (např. ACTH, kortizol, adrenalin), je pravděpodobné, že stavy prodloužené úzkosti a anticipace mohou vést k allostatickému zatížení (McEwen, 1998). Dodnes neexistuje jednotná formulace, která by popsala stres. Podle obecně uznávaná definice stresu je stav, kdy je homeostáza ohrožená, nebo je vnímána jako ohrožená. Dynamická rovnováha je neustále napadaná vnitřními nebo vnějšími, skutečnými nebo jenom předpokládanými nepříznivými silami - stresory (Charmandari *et al.*, 2005). Koolhaas *et al.*, (2011) dále navrhovali, aby byl termín stres omezen na podmínky, kdy požadavky z prostředí překračují přirozenou regulační kapacitu organismu, zejména pro situace, které zahrnují nepředvídatelnost a nekontrolovatelnost.

Stresory lze obecně rozdělit do čtyř skupin:

1. fyzické stresory, které mají buď negativní, nebo v některých situacích pozitivní psychologickou složku;
2. psychologické stresory, které odrážejí naučené reakce na dříve zaznamenané nepříznivé podmínky;
3. sociální stresory, které odrážejí narušené interakce mezi jednotlivci;
4. stresory, které napadají kardiovaskulární a metabolickou homeostázu

Mnohdy jsou však zkombinovány a účinkují společně. Na základě doby trvání mohou být stresory rozděleny na akutní a chronický (Pacak & Palkovits, 2001). Pokud uvažujeme o tom, jak mozek reaguje na stresory, můžeme je rozdělit do dvou kategorií. Stresory, které cíleně vyvolávají výkyvy ve fyziologických parametrech a naruší homeostázu, jsou označeny jako fyzikální či systémové (např. krvácení, infekce). Do druhé skupiny se řadí podněty, které ohrožují aktuální nebo očekávaný stav jedince a jsou pojmenovány jako psychologické, emocionální nebo procesní (Dayas *et al.*, 2001). Na základě původu lze stresory charakterizovat jako interoceptivní (nebo systémové, fyziologické či homeostatické) a exteroceptivní (nebo

neurogení, psychologické či emocionální). Ty se liší i v tom, jakými neuronálními cestami kontrolují HPA osu (Ritter *et al.*, 2003).

2.1.1. Stresový systém

Obratlovci vyvinuli regulační systém, stresový systém, aby se vyrovnali se stresovými podněty. Skládá se ze sympato-adrenomedulárního systému (SAM) a z HPA osy.

2.1.1.1. Sympato-adrenomedulární systém

SAM vychází z mozkového kmene, který přijímá vstupy signalizující hlavní odchylky v homeostáze, jako je ztráta krve, respirační potíže nebo zánět. Následně může rychle aktivovat HPA osu a autonomní nervový systém přes přímé projekce k hypofyziotropním neuronům v paraventriculárním jádru hypothalamu resp. k pregangliovým autonomním neuronům v intermediolaterálním sloupci thorakolumbálního segmentu míchy. Pregangliové neurony vedou k pre- nebo paravertebrálním gangliím, odkud vede inervace k cílovým orgánům a k chromafinním buňkám v dření nadledvin. Tato aktivace sympatiku je označována jako reakce „boj nebo útěk“ a obecně zvyšuje cirkulující hladinu adrenalinu (především z dřeně nadledvin) a noradrenalinu (především ze sympatických neuronů). Reflexní aktivace parasympatiku vede k ubývání dráždění sympatiku a proto ke krátkodobým reakcím vůči stresu (Ulrich-Lai & Herman, 2009). Poměrně nová teorie od Taylor *et al.* naznačuje, že u samic by bylo možné zavést termín „tend and befriend“ (starat se a spřátelit). U nich totiž během stresu významně stoupá hladina oxytocinu (OT), což je povzbudí najít bezpečné sociální vztahy a starat se o mládě (Taylor *et al.*, 2000).

Zmíněné katecholaminy představují první a nejrychlejší vlnu v reakci těla na stresové situace. Jsou předem připraveny ve váčcích v chromafinních buňkách, proto po aktivaci sympatiku jsou okamžitě uvolňovány do krevního oběhu. Mobilizují energetické substráty, zvyšují nebo snižují prokrvení určitých tkání, aby organizmus mohl okamžitě čelit stresoru.

2.1.1.2. HPA osa

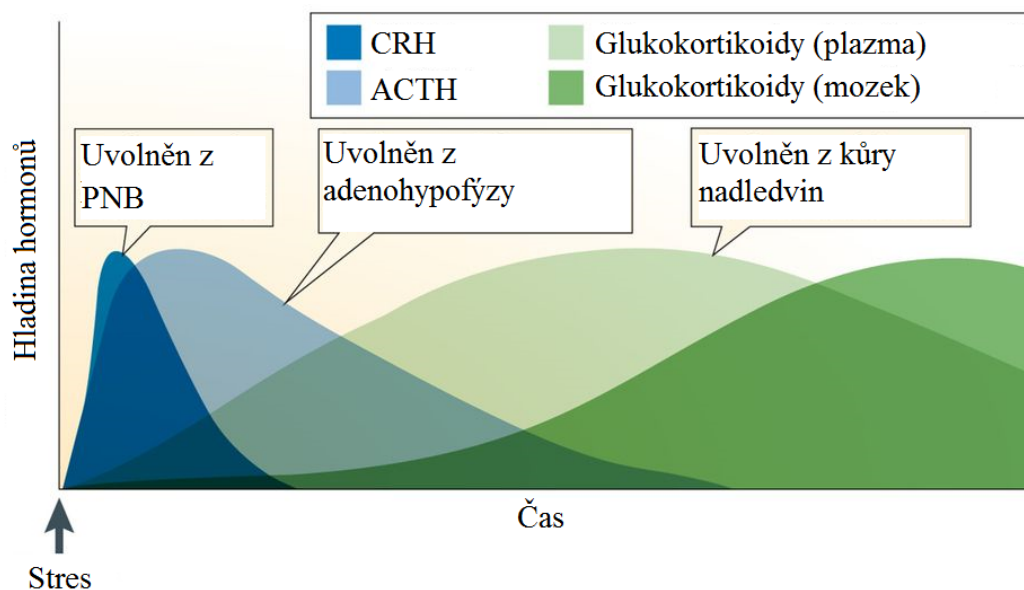
Pro zajištění dlouhodobých účinků se stimuluje HPA osa. Výchozí bodem její kontroly je paraventriculární jádro hypothalamu (PVN). Skupina parvocelulárních neuronů PVN uvolňuje do hypofyziálního portálního oběhu infundibula dva kanonické peptidy: kortikotropin

uvolňující hormon (CRH) a arginin vazopressin (AVP) (Sawchenko *et al.*, 1984). Ladění aktivity parvocelulárních neuronů se děje pomocí přímých a nepřímých aferentů. Většina přímých vstupů přichází z mozkových oblastí zpracovávajících sensorické informace, které reagují na skutečnou hrozbu pro homeostázu. Nepřímé vstupy z limbických struktur aktivují ty samé buňky a regulují stresovou odpověď za podmínek, kdy hrozbu lze jenom předpovědět podle vrozených programů nebo podmíněných podnětů. Pro vyváženou reakci jsou tyto odlišné dráhy spojeny na různých úrovních zpracování informace (Herman *et al.*, 2003).

CRH a AVP se krví dostávají do adenohipofýzy. CRH může aktivovat dva receptory spřažené s G proteiny (GPCR), CRH receptor (CRHR) typu 1 a 2 (Van Pett *et al.*, 2000). Další tři peptidy CRH rodiny, urocortiny UCN1, UCN2 a UCN3 se také váží na CRHR. Jednotlivé ligandy se liší v afinitě. CRH vykazuje vyšší afinitu k CRHR1, UCN2 a UCN3 k CRHR2. UCN1 má stejnou afinitu pro oba receptory (Dedic *et al.*, 2018). AVP v adenohipofýze reguluje HPA osu navázáním na V1b GPCR na kortikotrofních buňkách a indukcí uvolňování ACTH (Tanoue *et al.*, 2004). Vedle navázání na svůj OT receptor, OT také může aktivovat V1b receptory a indukovat sekreci ACTH (Nakamura *et al.*, 2008).

Na kortikotrofních buňkách adenohipofýzy je nejhojněji dostupný typ CRHR je CRHR1. Vazba ligandu stimuluje $G_s\alpha$ podjednotky a přes cyklický adenosinmonofosfát – proteinkináza A (cAMP – PAK) systému vede k uvolňování následující důležité molekuly HPA osy, ACTH (Aguilera *et al.*, 1983). Další možnosti jsou spouštění dráhy vedoucí k regulaci transkripčních faktorů a tím k syntéze prohormonu proopiomelanokortinu (POMC). Jedna cesta vede skrz cAMP – PKA ke vstupu Ca^{2+} přes L-typu Ca^{2+} kanálu do buňky a aktivaci CaMKII. Druhá je na CaMKII nezávislá MAPK dráha (Kovalovsky *et al.*, 2002). ACTH je jedním z štěpných produktů POMC. Po transportu do sekrečních váčků je k dispozici pro rychlé uvolnění (Cawley *et al.*, 2016).

Třetí podstatná skupina buněk HPA osy je steroidogenní populace kůry nadledvin, primárně ve vrstvě *zona fasciculata*. Po uvolnění ACTH do krevního oběhu se tady váže na GPCR melanokortinový receptor typu 2 a indukuje syntézu GC z prekursoru cholesterolu, u lidí primárně kortizol, u hlodavců kortikosteron (CORT) (Obrázek 1). Důležitým uzlovým bodem v signalizaci je PKA. Fosforyluje hormon senzitivní lipázu, která mobilizuje cholesterol. Aktivuje také StAR protein, což transportuje cholesterol na místo dalšího enzymatického zpracování. Vedle toho PKA fosforyluje protein vázající cAMP-responzivní element (CREB), který aktivuje steroidogenní geny, mimo jiné gen pro StAR (Spiga & Lightman, 2015).



Obr. 1 Po aktivaci parvocelulární neuroendokrinní buňky v PVN uvolní CRH. CRH stimuluje uvolňování ACTH z přední části hypofýzy, které působí na kůře nadledvin, aby zvýšily uvolňování glukokortikoidů. Glukokortikoidy působí periferně a pomalu procházejí hematoencefalickou bariérou. CRH – kortikotropin uvolňující hormon; ACTH – adrenokortikotropní hormon; PNB – parvocelulární neuroendokrinní buňky (upraveno podle (Bains *et al.*, 2015)).

Protože GC jsou lipofilní látky, po syntéze nejsou ukládány do vakuolu, ale postupně uvolňovány do krve. Volný hormon je biologicky aktivní, jeho biologická dostupnost a vylučování je však snížena vazbou na globulinvázející kortikosteroid (CBG). Za základních podmínek je CBG schopný vázat více než 90 % CORT, jeho vazebná kapacita se ale může snížit po stresu (Fleshner *et al.*, 1995).

Účinky glukokortikoidů v cílových tkáních jsou zprostředkovány glukokortikoidními (GR) a mineralokortikoidními (MR) receptory, které fungují jako ligandem aktivované transkripční faktory. GR vykazují nižší afinitu ke glukokortikoidům než MR, proto jsou přechodně aktivovány během období zvýšeného uvolňování GC, jako např. během stresu nebo na vrcholu cirkadiálního a ultradiálního rytmu. Po navázání GC se GR a MR přesunou z cytoplazmy do jádra, kde navázáním na svoje regulační oblasti, nebo interakcí s ostatními transkripčními faktory regulují přepis genů (Juszczak & Stankiewicz, 2018).

Pokud organizmus není ve stresu, bazální hladina GC je řízená cirkadiálním a ultradiálním rytmem. Cirkadiální kolísání sekrece a účinků glukokortikoidů je regulováno na více úrovních. Hlavním oscilátorem denního cyklu je suprachiasmatické jádro (SCN)

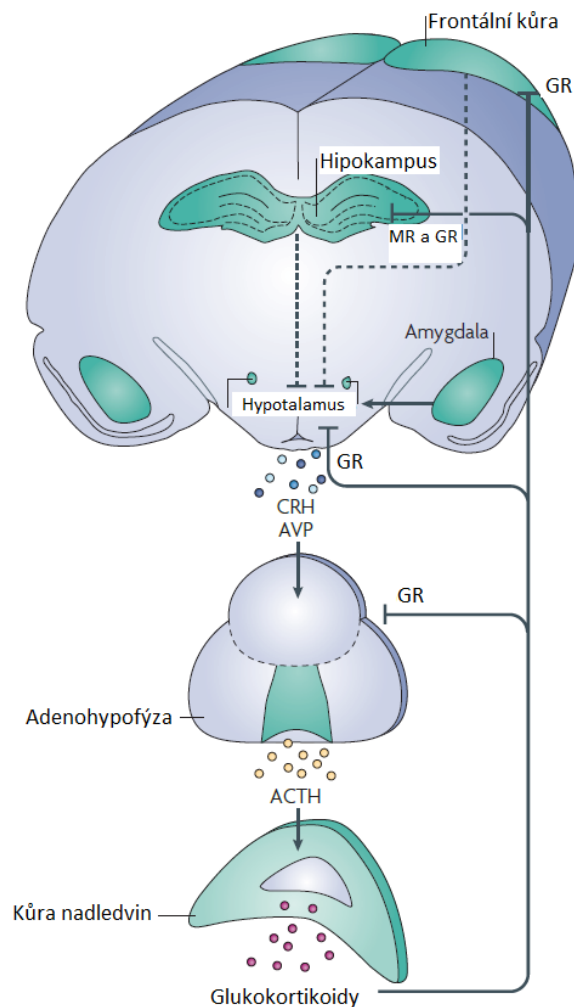
hypothalamu. Jeho excitační a inhibiční vstupy k PVN zajišťují cirkadiánní rytmus HPA osy (Kalsbeek *et al.*, 1996). Kromě toho SCN reguluje nadledviny i na HPA osy nezávislou cestou přes sympatický nervový systém (Ishida *et al.*, 2005). Nadledviny také mají vlastní periferní cirkadiánní hodiny. Heterodimerní transkripční faktor CLOCK:BMAL1 reguluje gen proteinu StAR a tím celou steroidogenezi (Son *et al.*, 2008). Prokázala se i jeho schopnost regulovat účinky GC acetylací GR. Tato posttranslační modifikace tlumí jejich transkripční aktivitu zabráněním asociaci s elementem odpovídající na GC (Nader *et al.*, 2009).

Kolísání hladiny GC není kontinuální ani v rámci cirkadiánního rytmu, ale lze pozorovat výkyvy v důsledku ultradiánního rytmu v sekreci, s frekvencí přibližně jeden pulz za hodinu. Tato pulzující hladina pozorovaná v cirkulující krvi je udržována i přes hematoencefalickou bariéru a objeví se i v mozkové tkáni (Qian *et al.*, 2012; Droste *et al.*, 2008). V pokusech po rozrušení spojení mezi SCN od HPA osy se prokázala nezávislost ultradiánního rytmu na SCN (Waite *et al.*, 2012). Ultradiánní stimulace GC způsobuje cyklickou GR-zprostředkovanou regulaci transkripce (Stavreva *et al.*, 2009; McMaster *et al.*, 2011).

2.1.1.3. Zpětná vazba glukokortikoidů

Krátkodobě je uvolňování GC nezbytné pro mobilizaci přiměřeného množství energetických substrátů a potlačení procesů nepodstatných pro přežití organismu, a to i v situacích bez stresu. Nicméně chronická aktivace HPA osy může být přímo škodlivá a omezení prodlouženého způsobení katabolických účinků GC je nevyhnutné. Účinné ukončení stresové reakce je proto stejně důležité jako její rychlý nástup. GC zpětně inhibují HPA osu přímým nebo nepřímým způsobem, což vede k poklesu jejich sekrece (Obrázek 2). Inhibice se může uskutečnit pomalu, přes regulaci genů nebo rychlým, negenomickým způsobem.

V PVN po navázání na jejich postsynaptický membránový GPCR, stimulují GC uvolňování endokanabinoidů, které retrográdně tlumí glutamátovou transmissi. Jelikož v rámci PVN se to děje i na CRH neuronech, dochází k utlumení uvolňování CRH, a tím inhibici HPA osy (Di *et al.*, 2003; Evanson *et al.*, 2010). Pomalá inhibice v hypotalamických CRH neuronech je zprostředkována přes řízení fosforylace proteinu CRTC2, který usnadňuje navázání transkripčního faktoru pCREB na *CRH* promotor. Po vystavení stresu se zvýší fosforylace CRTC2, následkem čehož se nemůže přemístit z cytoplazmy do jádra a usnadnit přepis genů (Jeanneteau *et al.*, 2012).



Obr.2 HPA osa a zpětná vazba glukokortikoidů. ACTH – adrenokortikotropní hormon; AVP - arginine vazopressin; CRH – kortikotropin uvoňující hormon; MR – mineralokortikoidní receptor; GR – glukokortikoidní receptor (upraveno podle Lupien *et al.*, 2009).

limbickými strukturami se zdá být zprostředkována synapsí na neuronech v bed nucleus stria terminalis, v hypothalamických jádrech a v jádrech mozkového kmene, které přímo inervují PVN (Myers *et al.*, 2012). Vedle obecného schématu můžeme vidět regionální rozdíly v jednotlivých strukturách. V mPFC například dorzální část inhibuje HPA osu, zatímco ventrální posiluje její aktivitu (Radley *et al.*, 2006).

Regulace SAM i HPA osy se sbíhá na úrovni hypothalamu, který integruje autonomní a endokrinní funkce s chováním. Výsledky nedávných pokusů naznačují, že v PVN má začátek i další osa aktivovaná během stresu. Její CRH neurony uvolňují glutamát, což intrahypothalamicky aktivuje ependymové buňky. Ependymové buňky následně uvolňují

Na úrovni adenohypofýzy GC modulují excitabilitu kortikotropních buněk a tím sekreci ACTH (Duncan *et al.*, 2016). Zde jako příklad genové regulace můžeme zmínit GR zprostředkované snížení proteinu NeuroD1, který by se jinak vázal na *Pomc* promotor a zvýšil expresi *Pomc* genu (Parvin *et al.*, 2017).

GC inhibují i steroidogenezu v nadledvinách, kde GR spolu s transkripčním faktorem SF-1 aktivuje syntézu transkripčního faktoru DAX-1. Zvýšená hladina proteinu DAX-1 vede ke snížení exprese transportéru StAR (Gummow *et al.*, 2006).

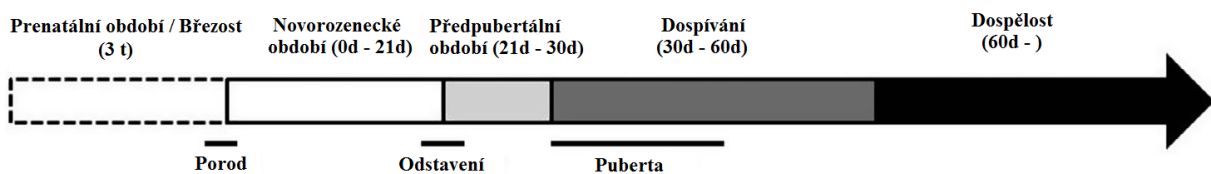
GC regulují HPA osu i přes mozkové struktury, které nemají přímé spojení s parvocelulárními PVN buňkami. Zvláště důležité jsou v tomto ohledu limbické struktury. Obecně se dá říci, že zatímco hipokampus a mediální prefrontální kůra (mPFC) jsou potřebné pro inhibici HPA osy, amygdala její odpověď stimuluje. Regulace HPA osy

ciliární neurotrofický faktor do komorového systému a tento růstový faktor se dostane cerebrospinální tekutinou do oblasti locus coeruleus. Tam aktivuje tyrozinhydroxylázu v NA buňkách. Jako poslední krok zprostředkovávají NA neurony signál do mPFC. Tato dráha může přispívat k bdělosti na delší dobu po setkání se stresorem (Alpár *et al.*, 2018).

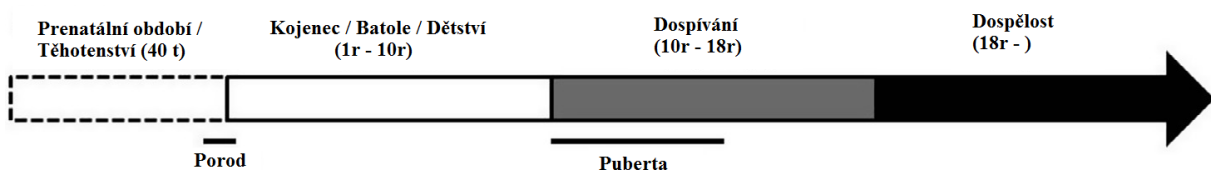
2.2. Časný stres

Vystavení stresu během kritických období v průběhu vývoje organismu může mít vážné dlouhodobé důsledky. Jelikož GC ovlivňují genovou expresi a metabolismus, vyvíjející se mozek je třeba obzvláště chránit proti jejich nadměrnému vystavení. Existují tři vývojová okna, během nichž mohou stresory vyvolávat odlišné a celoživotní změny: prenatální období, během něhož mohou stresové mediátory v matce dosáhnout na plod přes placentu; neonatální období, kdy jsou zvláště důležité interakce mezi rodiči a mláďaty; a juvenilní období, v němž mozek stále prochází zásadními vývojovými změnami (Sandi & Haller, 2015). Účinky stresorů v časně fázi života jsou nejčastěji modelovány na hlodavcích. Obrázek 3 schematicky porovnává hlavní stadia vývoje hlodavců a lidí.

A. Hlodavec (např. potkan, myš)



B. Člověk



Obr. 3 Časová osa vývoje hlodavců a lidí s přibližnými věkovými rozsahy a termíny pro označení jednotlivých fází vývoje (upraveno podle Eiland & Romeo, 2013).

Stres matky během březosti a následné zvýšení GC může významně ovlivnit vývoj plodu včetně mozku a HPA osy. Poškození potomků se projevuje mimo jiné prodlouženou dobou sekrece kortikosteronu po vyvolání stresu oproti kontrolám a snížení GR v hipokampu (Barbazanges *et al.*, 1996). Prenatálně je fetální expozice mateřským CORT minimalizována placentární 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázou typu 2 (11 β -HSD2), která během celé doby

gestace rychle metabolizuje CORT na inaktivní 11-dehydrokortikosteron. Navíc ke konci březosti, kdy hladina mateřských cirkulujících GC stoupá, se její aktivita zvyšuje (Shams *et al.*, 1998). Inaktivace enzymu během březosti vedla u mláďat ke zvýšené hladině CRH v PVN, z čehož vyplývala i vyšší bazální hladina CORT. V PVN bylo patrné i snížení hladiny GR mRNA, což také může být důvodem snížené negativní zpětné vazby a hyperaktivity HPA osy. Naopak v amygdale byla GR mRNA syntéza zvýšená. Dále mláďata vykazovala úzkost v nepříznivých situacích a nižší porodní váhu, což vytrvalo až do dospělosti (Welberg *et al.*, 2000). Dlouhodobý stres matky ale vede ke snížení syntézy 11 β -HSD2, a tím oslabuje ochrannou bariéru plodu (Mairesse *et al.*, 2007).

Obranu v časném novorozeneckém období představuje snížená schopnost HPA osy reagovat na stres. Během posledních dnů gestace a bezprostředně po porodu bazální hladina CORT u potkanů klesá, ale stále je vysoká. Nicméně během prvních dvou postnatálních dnů koncentrace CORT dramaticky klesá a zůstává na nízké hladině přibližně do 14. dne. Navíc koncentrace CRH v hypofýze a hypotalamu je během prvních dvou postnatálních týdnů také nízká. Dalším charakteristickým znakem tohoto období je, že stimuly, které by u dospělých potkanů vyvolaly zvýšení CORT, toho u mláďat nejsou schopny. Tato perioda, která u potkanů trvá od 4. do 14. dne života, se označuje jako stresová hyporesponsivní perioda (stress hyporesponsive period, SHRP) (Levine, 1994; Sapolsky & Meaney, 1986). Tato období slouží k ochraně vyvíjejícího se mozku před potenciálně škodlivými účinky zvýšené hladiny GC a dalších látek spojených se stresovou odpovědí.

Podle často používané klasifikace doba dospívání u potkanů spadá do období mezi 21. a 60. dnem života, což dále lze rozdělit na časnou (21. – 34. den), střední (34. – 46. den) a pozdní (46. – 59. den) fázi. Potkani jsou obvykle odstaveni ve věku 21 dnů. I dospívající potkani mají odlišnosti v aktivitě HPA osy v porovnání s dospělými. V časném dospívání po akutním stresu mají zpožděný vzestup a prodloužené uvolňování CORT. Prodloužené uvolňování je způsobeno neúplným dozráváním negativních zpětnovazebných systémů. Opakovaný stres v období dospívání může vést k větší glukokortikoidové odpovědi než podobné zkušenosti v dospělosti. Podle dohody se potkani považují za dospělé od 60. dne života, kdy už dosáhli fyzické a sexuální zralosti (McCormick & Mathews, 2007).

2.2.1. Maternální separace

Frekvence maternální péče v raně postnatálním období u potkanů významně ovlivňuje vývoj nervové soustavy a reaktivitu HPA osy. Péče matky o mláďata slouží k nastavení behaviorálních reakcí na stres u potomků tím, že reguluje vývoj částí nervového systému, které zprostředkovávají strach. Typické mateřské chování, které představuje péči o novorozená mláďata, je olizování a pečování o mláďata (licking and grooming, LG) a jejich kojení s vyklenutými zády (arched back nursing, ABN).

Mláďata, která během vychovávání dostala od matky bohaté impulsy v podobě LG a ABN, vykazují v dospělosti sníženou hladinu strachu a úzkosti ve srovnání s těmi, která to postrádala (Caldji *et al.*, 1998). Po nedostatečné péči lze vidět přetrvávající změny i v kognitivních funkcích a na morfologii neuronů. U dospělých potkanů, kteří raně postnatálně nedostávali dostatečný LG, je délka dendritů a hustota dendritických trnů pyramidálních buněk v hipokampu snižena oproti potkanům s vyšší úrovní LG. Podobnou změnu můžeme sledovat i v hladině kortikosteroidních receptorů. Je zajímavé, že po vystavení vysoké koncentraci kortikosteronů měly buňky potkanů s nižší úrovní LG vyšší hladinu dlouhodobé potenciace. Podobně vykazovali lepší, na hipokampu závislé učení za stresových podmínek (Champagne *et al.*, 2008). Mláďata, která častěji zažívají LG během prvních deseti dnů života, v dospělosti vykazují nižší hladinu CRF mRNA v hypothalamu, sníženou ACTH a CORT odpověď na stres a vyšší citlivost HPA osy na inhibiční účinek glukokortikoidů (Liu, 1997). Také mají zvýšenou expresi podjednotek NMDA receptorů a mRNA neurotrofického faktoru BDNF v hipokampu, což naznačuje zvýšenou tvorbu synapsí (Liu *et al.*, 2000).

Pokud jedinec čelí stresu, jsou kromě matky důležití i další společníci, kteří také mohou tlumit zatížení vystresovaného. Navíc se ukázalo, že stres se může přenést z jednoho zvířete na druhé. Stresovaní jedinci upozorňují naivní partnery na nebezpečí uvolňováním chemických signálů a u předtím nestresovaných se také aktivují glutamatergní synapse CRH neuronů v PVN (Sterley *et al.*, 2018).

Většina zvířecích modelů časného stresu manipuluje s interakcí matky s mláďaty, čímž naruší buď množství nebo kvalitu péče v raném životě. Jedna z nejčastěji používaných manipulací pro modelování stresu časného života je opakované oddělení hlodavčích mláďat od matky během prvních dvou až tří postnatálních týdnů. Tyto modely jsou běžně označeny jako maternální separace. Nicméně maternální separace není jeden definovaný model, ale zahrnuje celou řadu experimentálních paradigmat (Tabulka 1) (Nylander & Roman, 2013).

Tab.1 Shrnutí experimentálních podmínek, které se běžně používají ve studiích maternální separace (upraveno dle Nylander & Roman, 2013).

Postup	Anglický výraz a příklady zkratk	Podmínky	Interakce matka-mládě
Bez manipulace	Non-handling NH	Žádný kontakt s experimentátorem, ve většině případů žádné čištění klecí	Matka a mlád'ata jsou neustále spolu Mlád'ata jsou vystavena malému množství vnějších podnětů z prostředí
Standarní chování zvířat	Animal facility rearing AFR	Obvyklé ustájení a manipulace se zvířaty	Matka a mlád'ata jsou neustále spolu
Krátká manipulace, časná manipulace	Brief handling, early handling EH, MS0	Separace pro méně než 1 minutu až do 5 min	Zvířata jsou vystavena manipulaci a kratšímu oddělení
Krátká maternální separace	Short maternal separation MS15	Separace po dobu 15 min	
Maternální separace	Maternal separation MS180, MS360	Separace na delší dobu, obvykle ≥ 180 minut	Naruší sociální interakce mezi matkou a mlád'aty
Maternální deprivace	Maternal deprivation MD	Separace do 24 hodin	

Různá délka oddělení se používá na simulaci různé situace v prostředí. Například opakované krátké oddělení po dobu 15 minut (MS15) za den se používají k simulaci přírodních podmínek, kdy kojící matka pravidelně opouští hnízdo. To nám simuluje příznivé prostředí, které přináší pozitivní behaviorální účinky. Pokud je cílem simulovat nebezpečné prostředí, které nese negativní důsledky, využívají se delší období nepřítomnosti matky. Opakované oddělení na delší časové období, běžně 180-360 minut denně, naruší časné sociální interakce mezi matkou a mláďaty, což je nezbytné pro normální vývoj neuronů a chování. Jsou i další podmínky, které se mohou lišit mezi studii. Mláďata mohou být umístěna jednotlivě nebo spolu ve vrzích, buď v mateřské kleci nebo v oddělovací kleci. I teplota prostředí může být různě regulována. V různých protokolech se oddělení provádí denně nebo jenom příležitostně. Navíc má volba kontrolní skupiny zásadní význam pro hodnocení výsledků MS pokusu. Jako kontroly lze použít NH, AFR, EH, MS0, MS15 skupiny (Nylander & Roman, 2013).

Maternální separace ovlivní mláďata nejenom kvůli nepřítomnosti matky během doby separace, ale i v důsledku pozměněného chování matky po opětovném setkání s vrhem. Během doby, kterou matka tráví odděleně od mláďat, se naruší její schopnost poskytovat odpovídající mateřskou péči (Huot, 2004). Na druhou stranu byly pozorovány i dočasné kompenzační přírůstky v péči po opětovném setkání s mláďaty (Macri *et al.*, 2008). Vedle fyzického kontaktu moduluje maternální separace odpověď HPA osy i s indukcí změn v metabolických signálech. Pokusy s potkany ukázaly, že v průběhu separace vyvolává snížení hladiny glukózy spolu se zvýšením koncentrace ghrelinu aktivaci HPA osy (Schmidt *et al.*, 2006).

2.2.2. Epigenetické dopady časného stresu

I když působení steroidních hormonů na buněčné procesy zahrnuje jak genomické tak negenomické mechanismy, souhrnná činnost působících mediátorů vede ke změnám genové exprese prostřednictvím epigenetických mechanismů zahrnujících histonové modifikace, metylaci cytosinových bází na DNA a regulačních účinků nekódujících RNA (McEwen *et al.*, 2015). Už koncem devadesátých let se ukázalo, že rozdíly v expresi genů v oblastech mozku, které regulují reaktivitu HPA osy vůči stresu a také změny v chování, mohou být přenášeny z jedné generace do druhé prostřednictvím chování matky k mláďatům, aniž by došlo ke změně genomu (Francis, 1999). U potkanů je vysoká míra LG spojena s rychlejší negativní zpětnou vazbou HPA osy v důsledku zvýšené senzitivity GR (Liu, 1997). Zanedbání mateřské péče způsobuje na epigenetické úrovni v hipokampu stabilní změny v metylaci na úseku GR

promotoru a expresi GR (Weaver *et al.*, 2004). Navzdory stabilitě epigenomických značek získaných v rané fázi života prostřednictvím behaviorálního programování maternální péče, jsou tyto značky v dospělém mozku reverzibilní (Weaver, 2005).

Pokusy s potkany ukázaly, že stres matky během březosti může vést k epigenetickým změnám jak u matky, tak u mláďat. Zucchi a kol. pozorovali změny v charakteristickém předporodním chování matek, pokud je vystavili stresovým podmínkám během březosti. Tyto změny byly doprovázeny změnami hladiny miRNA ve frontálním kůře. Prenatální stres také ovlivnil transkriptom v mozku potomků. I u nich bylo možné zaznamenat změnu v hladinách miRNA. Mezi cíli pro tyto miRNA se v obou případech našly geny, jejichž pozměněná exprese souvisí s neuropatologiemi jako schizofrenie nebo bipolární afektivní porucha a které jsou také důležité ve vývoji mozku a diferenciaci neuronů (Zucchi *et al.*, 2013). V důsledku opakovaného vystavení matky stresu můžeme také pozorovat zvýšení hladiny mRNA pro DNA metyltransferázy *DNMT3a* a zvýšení metylace promotoru genu *11β-HSD2* v placentě. To vede ke snížení *11β-HSD2* mRNA (Jensen Peña *et al.*, 2012).

Zvýšená reakce potomků na stres po nepříznivých událostech během časného života může souviset s epigenetickými změnami genů spojených s HPA osou. Takové změny jsou hypometylace regulační oblasti genu *Avp* v PVN s doprovázející trvalou zvýšenou syntézou AVP (Murgatroyd *et al.*, 2009) nebo promotorové oblasti *Pomc* genu v hypofýze, která vede ke zvýšení syntézy POMC mRNA (Wu *et al.*, 2014). V obou případech má zásadní roli protein Mecp2. Špatné zacházení s mláďaty také vyvolá zvýšení metylace *BDNF* DNA, což vytrvá až do dospělosti a je spojeno se sníženou *BDNF* expresí v dospělém PFC (Roth *et al.*, 2009).

Ačkoliv epigenetické změny nezmění genom, nové poznatky naznačují, že časné životní zkušenosti, jako je například pozměněná kvalita maternální péče, mohou vést ke změně struktury genomu pomocí L1 retrotranspozonů (Bedrosian *et al.*, 2018).

2.3. Oxidativní stres

Volné radikály kyslíku a jiné reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species, ROS) jsou přítomné ve všech aerobních organizmech a hrají spoustu užitečných rolí. Některé z nich však mohou způsobit poškození biomolekul, o nichž se předpokládá, že přispívají k vývoji a progresi některých onemocnění. Na oxidativní poškození se často používá termín oxidativní stres. Ten byl původně jednoduše definován jako nerovnováha mezi ROS a antioxidačními obrannými mechanismy, ale tato definice byla několikrát upravena. V nedávné verzi je popsán

jako nerovnováha mezi oxidanty a antioxydanty ve prospěch oxidantů, což vede k narušení redoxní signalizace a kontroly a/nebo k poškození molekul (Gutteridge & Halliwell, 2018).

2.3.1. Reaktivní formy kyslíku

ROS je společný termín pro molekuly odvozené od O_2 , které jsou reaktivnější než samotný O_2 . Termín zahrnuje nejen kyslíkové radikály, ale také neradikálové deriváty O_2 . Proto všechny kyslíkové radikály jsou ROS, ale ne všechny ROS jsou radikály kyslíku (Halliwell & Gutteridge, 2015). Volné radikály jsou obvykle krátkodobě existující molekuly s jedním nebo více nepárovými elektrony. Podle této definice je i O_2 se svými dvěma nepárovými elektrony volným radikálem (Taverne *et al.*, 2018). Přítomnost nepárových elektronů činí volné radikály vysoce reaktivními. Tabulka 2 představuje některé ROS, radikálové i neradikálové.

Tab. 2 Reaktivní formy kyslíku s používanými vzorci (upraveno dle Sies *et al.*, 2017).

Volné radikály	Neradikálové molekuly
Superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$)	Peroxid vodíku (H_2O_2)
Hydroxylový radikál (OH^{\cdot})	Organický hydroperoxid (ROOH)
Peroxylový radikál (ROO^{\cdot})	Singletový kyslík ($O_2^1\Delta_g$)
Alkoxylový radikál (RO^{\cdot})	Ozon (O_3)

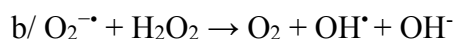
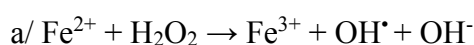
Mezi hlavní ROS podílející se na oxidativním stresu patří superoxidový radikál ($O_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál (OH^{\cdot}). Jakmile vznikne $O_2^{\cdot-}$, může způsobit oxidační poškození přímo, nebo může interagovat s jinými molekulami za účelem vytvoření "sekundárních" radikálů enzymatickými nebo kovem katalyzovanými reakcemi (Ma *et al.*, 2017).

$O_2^{\cdot-}$ je tvořen monovalentní redukcí molekulárního kyslíku. Tento proces je zprostředkován enzymy, jako jsou nikotinamid-adenin-dinukleotid oxidázy (NOX) a xantin oxidázy (XO), nebo neenzymaticky sloučeninami mitochondriálního transportního řetězce. K produkci $O_2^{\cdot-}$ dochází většinou v mitochondriích buňky. Během přenosu energie na dýchacím

řetězci uniká malé množství elektronů na kyslík předčasně. $O_2^{\cdot-}$ je produkován u komplexu I i III. $O_2^{\cdot-}$ od komplexu I je výlučně uvolněn do matrixu, kdežto komplex III uvolní $O_2^{\cdot-}$ do cytoplazmy i do matrixu přibližně v poměru 1:1 (Muller *et al.*, 2004). NOX enzymy jsou transmembránové proteiny. Generují $O_2^{\cdot-}$ přenosem elektronu z NADPH v cytosolu ke kyslíku v lumenálním nebo extracelulárním prostoru (Bedard & Krause, 2007). Fagocytující formy NOX v aktivovaných neutrofilech a makrofázích produkují velké množství $O_2^{\cdot-}$, čímž dochází k respiračnímu vzplanutí. V nefagocytujících buňkách, jako jsou kardiomyocyty nebo endotelové buňky, mohou radikály generované NOX regulovat intracelulární signalizaci (Valko *et al.*, 2007). Oxidativní stres vyvolaný podskupinou NOX2 se podílí na ztrátě parvalbumin-pozitivních interneuronů a vývoje změn v chování po sociální izolaci u potkanů. To nám poskytuje potenciální molekulární spojení mezi sociálním stresem a oxidativním stresem (Schivone *et al.*, 2009).

Dismutací $O_2^{\cdot-}$ vzniká H_2O_2 . Ten kromě mitochondrií nebo cytosolu vzniká i v peroxisomech, které mají metabolický úkol, jako např. beta-oxidaci velmi dlouhých mastných kyselin a větvičích se mastných kyselin. Dva z nejvýznamnějších zdrojů H_2O_2 v peroxizomech jsou XO a acyl-CoA oxidáza. Díky své relativní stabilitě, dlouhé době existence a mobilitě a také vysoké difúzní délce je H_2O_2 současně účinná signální molekula i potenciálně toxická látka (Walker *et al.*, 2018). Jeho signalizační funkce se může projevit například po aktivaci buňky růstovými faktory. Ty spustí produkci H_2O_2 , který následně inaktivuje tumor supressor PTEN a proteinovou tyrosinfosfatázu (Kwon *et al.*, 2004).

Ačkoli je H_2O_2 stabilní, jeho interakce s přechodnými kovy (a/ Fentonova reakce) a/nebo se $O_2^{\cdot-}$ (b/ Haber-Weiss reakce) způsobuje vznik hydroxylového radikálu (OH^{\cdot}).



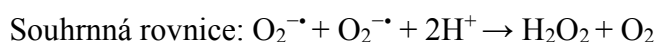
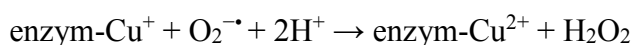
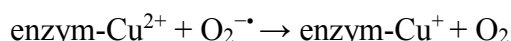
OH^{\cdot} je neutrální forma hydroxidového iontu. Má vysokou reaktivitu, což z něj činí velmi nebezpečný radikál s velmi krátkým poločasem *in vivo*, přibližně 10^{-9} s. Když se tedy produkuje *in vivo*, reaguje blízko svého místa vzniku (Valko *et al.*, 2007).

2.3.2. Antioxidační obrana

2.3.2.1. Antioxidační enzymy

Superoxiddismutáza

Superoxiddismutáza (SOD) představuje první linii obrany proti oxidativnímu stresu. Katalyzuje tvorbu H_2O_2 a O_2 z $\text{O}_2^{\cdot-}$. Všichni členové rodiny SOD vyžadují kovové ionty jako kofaktory pro katalýzu jednoelektronové oxidace a následnou jednoelektronovou redukci dvou radikálů $\text{O}_2^{\cdot-}$, čímž přispívají k jeho dismutaci:

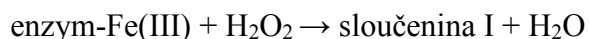


U savců byly popsány tři enzymy rodiny SOD, které se liší lokalizací. Dva z nich obsahují měď a zinek: ZnCuSOD (SOD1) najdeme uvnitř cytosolu, mitochondriálního intermembránového prostoru a v jádře, zatímco EcSOD (SOD3) je převládající antioxidační enzym sekretovaný do extracelulárního prostoru. MnSOD (SOD2) obsahující mangan je lokalizována v mitochondriální matrix (Griess *et al.*, 2017). Nepřítomnost MnSOD rychle vede k poškození mitochondriální funkce u několika orgánů. Homozygotní mutantní myši postrádající MnSOD zemřou během prvních 10 dnů života v důsledku dilatační kardiomyopatie, akumulace lipidů v játrech a kosterním svalu a metabolické acidózy (Li *et al.*, 1995). Dokonce i heterozygotní myši vykazují zvýšené mitochondriální oxidační poškození a apoptózu ve stáří (Kokoszka *et al.*, 2001). Naproti tomu se CuZnSOD nezdá být životně důležitá ve vývoji, ale kvůli jejímu nedostatku se zvýší oxidativní poškození ve svalech, což souvisí se změnou redoxního stavu neuronů, a tudíž s degenerací nervosvalového spojení (Sakellariou *et al.*, 2014). Myší model Alzheimerovy choroby bez *Sod1* genu vykazuje zvýšenou hladinu oligomerizace $\text{A}\beta$, kognitivní poruchy a neurální dysfunkce (Murakami *et al.*, 2011).

Kataláza

Lidská kataláza (CAT) je peroxisomální enzym obsahující hemovou prostetickou skupinu. Tvoří tetramer složený ze čtyřech podjednotek, z nichž každá může být rozdělena do čtyřech domén. CAT, podobně jako SOD katalyzuje dismutační reakci, kdy jedna molekula

H₂O₂ je redukována na H₂O a druhá oxidována na O₂. Katalytický mechanismus je dvoustupňová reakce. V prvním kroku hem-Fe³⁺ redukuje molekulu H₂O₂ na H₂O a generuje sloučeninu I (oxoferyl). Po svém vytvoření sloučenina I rychle reaguje s druhou molekulou H₂O₂ za vzniku H₂O a O₂ ve dvoelektronovém redoxním procesu, čili je redukována do výchozího stavu (Putnam, 2000; Glorieux & Calderon, 2017):



Myši s narušenými geny pro CAT se vyvíjejí bez jakýchkoliv vedlejších účinků, což naznačuje, že CAT není nezbytná za podmínek bez stresu. Tkáně s nedostatečnou funkcí CAT vykazují přiměřenou kapacitu pro odstraňování H₂O₂, pravděpodobně díky jiným buněčným enzymatickým a neenzymatickým antioxidačním systémům (Ho *et al.*, 2004). CAT v erythrocytech pomáhá v obraně proti H₂O₂, který vzniká dismutací O₂^{•-} při autooxidaci hemoglobinu. Vzhledem k tomu, že H₂O₂ snadno prostupuje membránou, mohou erythrocyty chránit jiné tkáně proti extracelulárnímu H₂O₂ jeho vychytáváním a ničením (Winterbourn & Stern, 1987). U lidí se vyskytuje akatalázie (Takaharova nemoc), zděděný téměř úplný nedostatek CAT aktivity. Červené krvinky jsou nejvíce postižené, často s menší než procentovou aktivitou enzymu. Jiné tkáně však mohou vykazovat různé hladiny enzymového deficitu a mohou být dokonce normální i v případě mutací, které způsobují nestabilní CAT. U pacientů s nedostatečnou CAT jsou ovlivněny a mohou být poškozeny buňky měkké tkáně (ústní dutina, hrtan, neurony, pankreatické beta buňky, melanocyty) s nízkou kapacitou pro odstranění peroxidu vodíku. Tento toxický účinek se vyskytuje více s postupujícím věkem a může vést k dřívějšímu projevu poruch (nádory, schizofrenie, Parkinsonova choroba, diabetes, arterioskleróza a vitiligo), které jsou charakteristické především pro starší věk (Góth & Nagy, 2013). Kataláza má jeden z nejvyšších obrátů mezi všemi enzymy: jedna molekula katalázy může konvertovat přibližně 6 milionů molekul peroxidu vodíku na vodu a kyslík za minutu (Valko *et al.*, 2006).

2.3.2.2. Antioxidační systémy

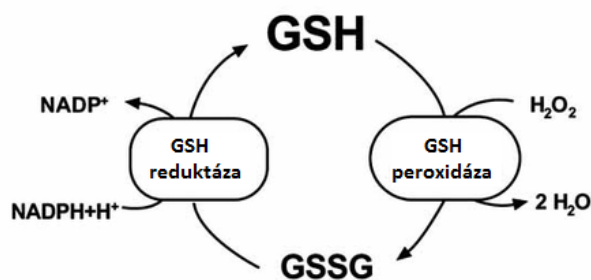
Proteiny v extracelulárním prostředí nebo na povrchu buněk jsou bohaté na stabilizační disulfidy, což odráží oxidační podmínky. Naproti tomu ve vnitřní části buňky proteiny obsahují mnoho volných sulfhydrylových skupin a disulfidy jsou vzácné (Arnér & Holmgren, 2000). Glutathionové a thioredoxinové systémy jsou disulfidové reduktázové systémy mající zásadní antioxidační schopnosti.

Glutathionový systém

Glutathion je tripeptid γ -glutamylcysteinylglycin. Existují dvě formy glutathionu - oxidovaná forma (glutathion disulfid nebo GSSG) a redukovaná forma (GSH). Je většinou syntetizován v cytosolu buněk a transportován do mitochondrie, endoplazmatického retikula a jádra, kde tvoří nezávislou zásobu (Morris *et al.*, 2014). Glutathion je vysoce bohatý v cytosolu (1-11 mM), jádře (3-15 mM) a mitochondrii (5-11 mM). Hlavní ochranné funkce glutathionu proti oxidativnímu stresu jsou následující:

- je kofaktorem několika detoxikačních enzymů proti oxidativnímu stresu
- účastní se transportu aminokyselin přes plazmatickou membránu
- přímo vychytává hydroxylový radikál a singletový kyslík, detoxikuje peroxid vodíku a lipidové peroxidy katalytickým účinkem glutathionperoxidázy (GPx)
- je schopen regenerovat nejdůležitější antioxidanty, vitamíny C a E zpět na své aktivní formy (Valko *et al.*, 2007).

Antioxidační funkce GSH jsou prováděny převážně katalyzovanými reakcemi GPx, které redukují H_2O_2 a peroxid lipidů, přičemž GSH je oxidován na GSSG. GSSG je zase redukován zpět na GSH pomocí GSSG reduktázy na úkor NADPH (Obrázek 4.). Vzhledem k tomu, že poměr GSH/GSSG z velké části určuje intracelulární redoxní potenciál, je třeba zabránit významnému posunu v redoxní rovnováze, když oxidativní stres překoná schopnost buňky redukovat GSSG na GSH. GSSG může být aktivně transportován ven z buňky, nebo může reagovat se sulfhydrylovou skupinou proteinů vedoucí k tvorbě smíšeného disulfidu. GSH se může reverzibilně vázat na -SH proteinových cysteinyllových zbytků (Prot-SH) procesem nazývaným glutathionylace, který generuje glutathionylované proteiny (Prot-SSG), které mohou aktivovat nebo inaktivovat protein. Jedná se o mechanismus ochrany citlivých bílkovinných thiolů z nevratné oxidace a mohou také sloužit k zabránění ztrátě GSH za oxidačních podmínek (Lu, 2013).



Obr. 4 Oxidačně-redukční cyklus glutathionu (upraveno podle Russell *et al.*, 2008).

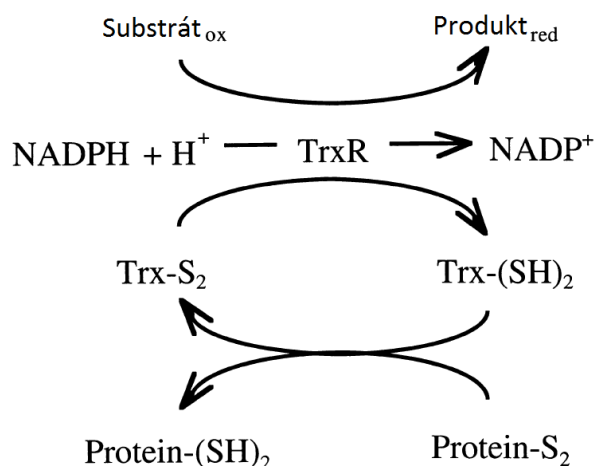
Fibroblasty pacientů se schizofrenií mají sníženou schopnost syntetizovat GSH, která může mít genetický původ (Gysin *et al.*, 2007). Podobně byl pozorován deficit GSH v mozkomíšním moku a v PFC lidí trpících tímto onemocněním, což podporuje hypotézu, že patofyziologie schizofrenie zahrnuje narušený antioxidační obranný systém (Do *et al.*, 2000). Snížení hladiny glutathionu také mění synaptické mechanismy. Dlouhodobá potenciace závislá na NMDA receptoru byla narušena na řezech potkaního mozku po vyčerpání GSH. Tato hypofunkce NMDA může být částečně vysvětlena nadměrnou oxidací redox-senzitivních míst na NMDA receptoru (Steullet *et al.*, 2006).

Molekula N-acetylcystein (NAC) může působit jako prekurzor pro syntézu glutathionu a stimulovat cytosolické enzymy, které se podílejí na regeneraci GSH. Mechanismy působení NAC se překrývají s patofyziologií široké škály neuropsychiatrických poruch, včetně autismu, závislosti, deprese, schizofrenie, bipolární poruchy a Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby (Berk *et al.*, 2013). U pacientů se schizofrenií podávání NAC vedlo ke zlepšení funkce sluchového kortikálního systému, což je při této diagnóze typické poškození (Lavoie *et al.*, 2008). Dále NAC zmírnil stresem vyvolané změny v chování a také oxidativní poškození v mozku potkanů (Chakraborti *et al.*, 2007). Vedle toho ale některé studie ukazují, že NAC může způsobit hyperaktivitu HPA osy (Prevatto *et al.*, 2017) a také zvyšovat proliferaci nádorových buněk a růst nádorů (Sayin *et al.*, 2014).

Thioredoxinový systém

Thioredoxinový systém je další důležitý thiolový antioxidant sestávající z thioredoxinu (Trx), thioredoxin reduktázy (TrxR) a NADPH. Trx je multifunkční selenoprotein obsahující dva redox aktivní cysteiny a konzervované aktivní místo (Cys-Gly-Pro-Cys) (Trachootham *et al.*, 2008). TrxR je dimerní enzym obsahující FAD, který katalyzuje NADPH-dependentní

redukci aktivního disulfidu v oxidovaném Trx (Trx-S₂) za vzniku dithiolu v redukovaném Trx [Trx-(SH)₂] (Obrázek 5) (Zhao *et al.*, 2002).



Obr. 5 Schematické znázornění oxidoreduktázové aktivity thioredoxinového systému. TrxR – thioredoxin reduktáza; Trx-S₂ – oxidovaný thioredoxin; Trx-(SH)₂ – redukovaný thioredoxin (upraveno podle Arnér & Holmgren, 2000).

Na důležitost Trx systému ukazuje případ, kdy pacient s mutací genu pro podtyp Trx-2 trpěl atrofií mozečku, epilepsií, dystonií, optickou atrofií a periferní neuropatií (Holzerova *et al.*, 2016).

2.3.3. Markery oxidativního stresu

Přímá kvantifikace ROS je cenným a slibným biomarkerem, který může odrážet proces onemocnění. Avšak vzhledem ke krátkému poločasů těchto molekul je jejich měření v biologických systémech složitým úkolem. Přístupy zahrnují elektronovou spinovou rezonanci, fluorescenční magnetickou rezonanci a hmotnostní spektrometrii. V posledních letech bylo vyvinuto také mnoho fluorescenčních sond, jako například dihydrochlorofluorescein diacetát nebo hydroetidín. Kromě měření tvorby radikálů je jiným přístupem měření stabilnějších markerů, které mohou odrážet systémový nebo tkáňově specifický oxidativní stres. Lipidy, proteiny a poměr GSH/GSSG jsou příklady indikátorů, které mohou být pozmeněny přítomností nadbytečných ROS (Marrocco *et al.*, 2017).

2.3.3.1. Poškození lipidů

Volné radikály mohou odebrat atom vodíku od polynenasycené mastné kyseliny za vzniku lipidového radikálu (L•). Tento nestabilní primární meziprodukt snadno reaguje s

molekulárním kyslíkem, což vede k tvorbě lipidového peroxylového radikálu (LOO•). Ten je také reaktivním radikálem a v lipidové dvojvrstvě je schopen odejmout atom vodíku od přilehlého řetězce mastné kyseliny, čímž vzniká lipidový hydroperoxid (LOOH). Lipidové hydroperoxydy nebo peroxylové radikály mohou podstoupit fragmentaci enzymatickými nebo neenzymatickými mechanismy za vzniku oxidačních produktů s krátkým řetězcem, včetně různých aldehydů, alkanů a alkenů, z nichž malondialdehyd (MDA) a 4-hydroxy-2-nonenal jsou nejvíce studovány (Sousa *et al.*, 2017).

Dalšími důležitými markery oxidace lipidů jsou isoprostany (IsoPs), molekuly podobné prostaglandinům. Nevznikají však cyklooxygenázovou dráhou, ale peroxidací mastných kyselin působením volných radikálů (Morrow *et al.*, 1990). Vzhledem k vysoké koncentraci polynenasycených mastných kyselin v mozku ve srovnání s jinými orgány je peroxidace lipidů primárním výsledkem poškození mozku indukovaným volnými radikály. Bylo prokázáno, že koncentrace podtypu isoprostanů F2-IsoPs vzrůstá v řadě chronických neurodegenerativních onemocnění, včetně Alzheimerovy choroby, Huntingtonovy choroby, Parkinsonovy choroby a amyotrofické laterální sklerózy (Milne *et al.*, 2015). Výsledky nedávného výzkumu prokázaly, že zvýšená hladina této látky v plazmě se projevuje i v případě schizofrenie (Lee *et al.*, 2016).

2.3.3.2. Poškození proteinů

Protože jsou proteiny dominantními (nevodnými) složkami většiny biologických systémů, pravděpodobně jsou hlavním cílem oxidantů. Radikály mohou být podrobeny odebrání atomů vodíku, přenosu elektronů, přidávání, fragmentaci a přeskupení, dimerizaci, disproporcionaci a substituční reakci s aminokyselinami, peptidy a bílkovinami (Davies, 2016). Změny cílových molekul mohou zahrnovat oxidaci postranních řetězců, zlom páteře, zesíťování, změny v hydrofobicitě a konformaci, změnu citlivosti k proteolytickým enzymům, a tvorbu nových reaktivních skupin (Headlam & Davies, 2004). Tvorba karbonylových sloučenin je nejobecnějším a široce užívaným markerem oxidace proteinů jak *in vitro*, tak *in vivo*. Nemůže být zvrácena žádným opravným mechanismem a proteinové karbonyly jsou obecně odstraněny degradací v proteasomu. Existuje však určitý limit kapacity buněk pro zpracování karbonylovaných proteinů (Bachi *et al.*, 2013). Jejich nahromadění může vést ke vzniku agregátů. Zvýšené hladiny karbonylovaných proteinových agregátů jsou pozorovány u pacientů s poruchami souvisejícími s věkem, jako jsou Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba a amyotrofická laterální skleróza. Právě oxidativní poškození a následná agregace

enzymu SOD1 může přispět k neurodegeneraci spojené se zmíněnými onemocněními (Choi *et al.*, 2005).

2.3.3.3. Změna poměru GSH/GSSG

V buňkách GSH existuje volně nebo vázaný na bílkoviny. Vzhledem k tomu, že enzym glutathionreduktáza je konstitutivně aktivní a indukovatelný oxidativním stresem, volný glutathion existuje téměř výhradně ve své redukované formě. Poměr GSH/GSSG uvnitř buněk se často používá jako marker buněčné toxicity (Zitka *et al.*, 2012). Koncentrace glutathionu v krvi může odrážet jeho stav v jiných méně dostupných tkáních. Díky tomu bylo stanovení jak GSH tak GSSG v krvi považováno za ukazatele stavu glutathionu v celém těle a indikátoru rizika onemocnění. Ukázalo se však, že jeho měření je často ovlivněno oxidací během zpracování vzorků, což je třeba brát v úvahu (Rossi *et al.*, 2002). V mozku pacientů trpících bipolární poruchou, depresí nebo schizofrenií byla analýzou *post-mortem* nalezena sníženou koncentrací jak GSH, tak GSSG. Navíc u depresí a schizofrenií se objevilo i snížení hladiny GPx (Gawryluk *et al.*, 2011). Kromě změn způsobených oxidativním stresem vykazuje plazmatický redoxní stav zjišťovaný pomocí poměru GSH/GSSG u zdravých dospělých lidí diurnální změny, což je ovlivněno příjmem jídla (Blanco *et al.*, 2007).

2.3.4. Glukokortikoidy a oxidativní stres

Glukokortikoidy spouštějí fyziologické procesy, které nakonec zvyšují hladiny glukózy a lipidů v krevním oběhu. Ačkoli zvýšený metabolismus sám generuje ROS (Yu *et al.*, 2006), glukokortikoidy mají přímou i nepřímou modulační úlohu při vzniku oxidativního stresu.

Na úrovni mitochondrií je patrný dvoufázový účinek glukokortikoidů. Podávání fyziologických dávek kortikálními neuronům akutně zvyšuje hodnotu rovnovážného potenciálu mitochondriální membrány, pufrovací schopnost mitochondrií pro Ca^{2+} a odolnost vůči apoptotické signalizaci. Chronická expozice vysokým dávkám však snižuje potenciál mitochondriální membrány a dochází ke snížení hladiny anti-apoptotického Bcl-2 proteinu, čímž se buňka stane citlivou na programovanou buněčnou smrt. Tyto poznatky jsou v souladu s teorií alostatické zátěže (Du *et al.*, 2009). *In vitro* pokusy na hipokampálních buňkách také ukázaly, že neurony inkubované s GC jsou náchylnější vůči degradaci vyvolané oxidativním stresem (Behl *et al.*, 1997). Další pozorovatelnou změnou navozenou vlivem GC

v mitochondriích je snižena aktivita komplexu I a enzymu SOD, a tato změna byla v buněčných kulturách také spojena s karbonylací proteinů (Tang *et al.*, 2013). Bazální aktivita antioxidantních enzymů Cu/ZnSOD byla snížena i na řezech kortexu, hipokampu a mozečku po GC léčbě. Zde se projevila i snižena schopnost GPx detoxifikovat vysoké hladiny peroxidu (McIntosh *et al.*, 1998). Potlačená aktivita antioxidantních enzymů byla doložena i v *in vitro* pokusu s potkany, kde perorální aplikace kortikosteronů způsobila snížení aktivity SOD, CAT a glutathion reductázy v mozku, játrech a srdci. Patrný pokles byl nalezen i v koncentraci GSH v plazmě (Zafir & Banu, 2009). Glukokortikoidy mohou také potlačit aktivitu transkripčního faktoru NFκB (De Bosscher *et al.*, 1997). Ukázala se významná role NFκB v ochraně nervových buněk vůči oxidativnímu stresu (Lezoualc'h *et al.*, 1998). Tento transkripční faktor má protektivní účinek proti Aβ a jeho inhibice však může vést k degradaci neuronů (Kaltschmidt *et al.*, 1999).

3. Cíle práce

1. Standardizovat metody pro monitorování vybraných markerů oxidativního stresu.
2. Stanovit markery oxidativního stresu ve vybraných částech potkaního mozku po maternální separaci.
3. Sledovat vliv maternální separace a aplikace N-acetylcysteinu na chování potkanů.

4. Materiál a metody

4.1. Pokusná zvířata

K pokusům byli použiti potkani kmene Long-Evans získaní od dodavatele Velaz s.r.o. K připuštění bylo použito šest samic a dva samci. Byli ustájeni po jednom v průhledné nádobě z plexiskla (28 cm x 43,5 cm x 23 cm). Potkani měli krmivo (ST-1) a pitnou vodu *ad libitum*. Byli chováni v klimatizované místnosti, při konstantní teplotě (22 ± 2 °C), vlhkosti vzduchu (35-60%) a světelném režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Intenzita osvětlení se pohybovala mezi 30 - 150 lx, v závislosti na umístění chovných boxů v místnosti.

Po připuštění byli samec a samice spolu v jednom boxu 14 dní. Narozená mláďata zůstala s matkou a byla usmrcena PND22 nebo $PND90 \pm 1$, podle dalších pokusů (kde PND0 byl den narození). Skupina ponechaná až do dospělosti zůstala s matkou do PND28 a následně byla odstavena a rozdělena podle pohlaví do skupin po čtyřech v jednom boxu (33 cm x 53 cm x 19 cm). Usmrcení zvířat probíhalo rychlou dekapitací vždy v době od 9:00 do 11:00 hodin. Po usmrcení byl potkanům vyjmut mozek, který byl opláchnutý ledovým fosfátovým puřem (PBS) a na ledu okamžitě rozdělen na kůru, hipokampu a mozečku. Tkáně byly uskladněny do mikrocentrifugačních zkumavek, zmrazeny v tekutém dusíku a následně uloženy do mrazáku s teplotou -80 °C až do doby použití. Matka byla opětovně připuštěna nejdříve 14 dní po odstavení vrhu.

4.1.1. Aplikace N-acetylcysteínu

Mláďatům, na nichž se testoval NAC, byla tato látka aplikována intraperitoneálně, každý den, 2-3 hodiny před separací od PND1 do PND21. NAC byl solubilizován ve vodě, pH bylo upraveno na 7,0 pomocí NaOH. Injikovaný objem byl 150 mg NAC na kilogram potkana za den.

Na základě stresování se potkani dělili na kontrolní a separované. Po aplikaci NAC se skupiny dále dělily na kontroly, kontroly + NAC, separované a separované + NAC. Dospělí potkani byli dále rozděleni podle pohlaví (Tabulka 3).

Tab. 3 Skupiny potkanů začleněny do pokusů.

Skupiny	PND22			
	Kontrola	Kontrola + NAC	Separace	Separace + NAC
Tělesná hmotnost	59,9 ± 2	47 ± 1,4	44,7 ± 1,3	41,4 ± 0,8
Skupiny	Samci (PND90)			
	Kontrola	Kontrola + NAC	Separace	Separace + NAC
Tělesná hmotnost	418,9 ± 11	443,4 ± 8,4	457,9 ± 11,4	455,4 ± 17,5
Skupiny	Samice (PND90)			
	Kontrola	Kontrola + NAC	Separace	Separace + NAC
Tělesná hmotnost	280,4 ± 4,1	296,3 ± 9,9	280,9 ± 6,8	267,6 ± 11,2

4.2. Behaviorální metody

4.2.1. Maternální separace

Pokus maternální separace byl prováděn od PND1 do PND21. Vrhly byly náhodně rozděleny na kontroly a na skupiny, které byly separovány. Mláďata byla oddělena bez ohledu na jejich pohlaví. Denní doba separace byla vybraná každý den náhodně v rámci světlé části režimu. Jedno oddělení trvalo 300 minut. Separanti byly odebíráni z klece a umístěni do malých plastových krabiček (10,5 cm x 7 cm x 4 cm) každý zvlášť, bez jídla, pití a podestýlky. Matka zůstala ve vlastní kleci. Mláďata v krabičce byla přesunuta do jiné místnosti. Plastové krabičky byly položeny na vyhřívací podložku (36 °C). Po PND12 byla mláďata umístěna na dobu separace do větších plastových krabiček (12,5 cm x 8 cm x 14 cm) bez jídla, pití a podestýlky. Ani zahřívací podložka jim nebyla zapnutá. Kontrolní skupina zůstala nepřetržitě s matkou, bylo s nimi manipulováno pouze jednou týdně během výměny podestýlky.

4.2.2. Light/dark box test

Testování chování v light/dark boxu probíhalo PND22, resp. PND89 ± 1. Aparatura tvaru kostky měla dvě k sobě těsně přiléhající části z plexiskla. Světlá část (30 cm x 40 cm x 40 cm) měla průhledné ohraničení, tmavý box (20 x 40 x 40 cm) měl černé a neprůhledné stěny. Dva prostory byly spojeny malým otvorem (10 cm x 10 cm) v černé stěně, která je oddělovala. Zařízení bylo shora nepokryté. Světlý kompartiment byl osvětlen z obou stran stolními lampami. Síla osvětlení (měřena Sonel LXP-10A luxmetrem) ve světlé části byla přibližně 300 lx (měřena v centru), v tmavé části přibližně 5 lx.

Potkan byl 10 minut před pokusem umístěn do místnosti, kde probíhala měření. Test byl zahájen umístěním potkana uprostřed světlé části komory s hlavou směrem od otvoru ke stěně oddělující oba kompartmenty. Testování probíhalo po dobu 300 sekund. Pokusné zvíře mělo možnost libovolně se pohybovat mezi kompartmenty po celou dobu pokusu. Laboratorním časovačem byla měřena délka pobytu v jednotlivých prostorech a manuálně zaznamenán počet přechodů z tmavé do světlé části. Za přechod byla považovaná událost, kdy potkan měl hlavu v daném boxu. Mezi jednotlivými měřeními byla aparatura očištěna etanolem. Každý pokus byl proveden v době od 10:00 do 14:00 hodin, aby byla minimalizována denní variabilita v chování a variabilita stresových hormonů.

4.3. Homogenizace mozku

K biochemickým pokusům byly odebrané části mozku homogenizovány a připraven z nich postnukleární supernatant (PNS).

Materiál

PBS: 8,05 g NaCl; 0,2 g KCl; 2,9 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O; 0,2 g KH₂PO₄; doplněno dH₂O do 1000 ml; pH upraveno na pH 7,4

Complete Protease Inhibitor Coctail (Roche)

Postup

Ve skleněné kádince bylo připraveno 10% homogenátu přidáním PBS ke tkáním (100 mg tkáně / 0,9 ml PBS). Pufr obsahoval 0,02 % směsí inhibitorů proteáz, aby nedošlo k rozštěpení proteinů v průběhu zpracování vzorků. Tkáně byly skalpelem nařezány na menší kousky. Takto zpracované vzorky byly na ledu homogenizovány pomocí sklo-teflonového homogenizátoru (IKA EUROSTAR power basic) při 1200 rpm opakovaných posunem pístu nahoru a dolu (10x, přibližně po dobu 2 minut). Homogenáty byly centrifugovány při 800 g, 4 °C, po dobu 10 minut. Získané PNS byly rozpipetovány do mikrocentrifugačních zkumavek a zamrazeny v tekutém dusíku, případně okamžitě zpracovány. Zamražené vzorky byly uloženy do mrazáku s teplotou -80 °C až do doby použití.

4.4. Biochemické metody

4.4.1. Stanovení proteinů

Koncentrace proteinů v PNS byla stanovena pomocí metody BCA (Bicinchoninic Acid Protein Assay).

Materiál

Standardy BSA: 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Činidlo A: 8 mg monohydrátu uhličitanu sodného; 1,6 mg vinanu sodného; doplněno dH₂O do 100 ml; pH upraveno pomocí 10 mM NaOH na pH 11,25

Činidlo B: 4 mg bicinchoninové kyseliny (BCA); doplněno dH₂O do 100 ml

Činidlo C: 0,4 mg pentahydrátu síranu měďnatého; doplněno dH₂O do 10 ml

Reakční směs: činidla smíchána v pořadí C, B, A v poměru C : B : A = 1 : 25 : 26

Postup

Podle tabulky 4 byla připravena do jamek 96-ti jamkové destičky ředící řada standardu BSA. Vzorky byly naředěny v destilované vodě v poměru 1:100 a naneseny vedle standardů v triplicátech. Čerstvě připravená reakční směs byla přidána k standardům i vzorkům po 100 μl na jamku. Destička byla přelepena fólií a vzorky byly inkubovány po dobu 30 minut při teplotě 60 °C. Po inkubaci, vychladnutí vzorků a odstranění fólií byla absorbance v jamkách změřena na spektrofotometru Synergy HT při 562 nm. Výsledná koncentrace proteinů byla vypočítána podle kalibrační křivky BSA v programu Gen 5.

Tab. 4 Ředící řada standardů pro sestavení kalibrační křivky BCA metody.

Číslo standardu	BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
μg BSA	0	0,2	0,5	1	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50	
BSA (0,1 μg/μl)	μl	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	
BSA (1 μg/μl)	μl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
H ₂ O	μl	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

BL – blank; BSA - hovězí sérový albumin

4.4.2. TBARS

Materiál

0,67% thiobarbiturová kyselina (TBA): 67 mg thiobarbiturová kyselina; 1 ml dimetylsulfoxid;
9 ml dH₂O

10% trichloroctová kyselina (TCA) (w/v): 10 g trichloroctová kyselina; doplněno dH₂O do
100 ml

500 μM 1,1,3,3-tetrametoxypropán (TMP): 4,167 μl tetrametoxypropán; 1 ml etanol; 49 ml
dH₂O

PBS: 8,05 g NaCl; 0,2 g KCl; 2,9 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O; 0,2 g KH₂PO₄; doplněno dH₂O do
1000 ml; pH upraveno na pH 7,4

Postup

V mikrocentrifugační zkumavce byl namíchaný 100 μl PNS, 200 μl 10% TCA a 300 μl 0,67% TBA. Stejným postupem byla připravena kalibrační křivka, kde PNS byl nahrazen standardem tetrametoxypropán podle tabulky 5. Vzorky i standardy byly následně inkubovány v termobloku (Techne DB.2A) 30 minut při 90 °C. Poté následovala krátká 5 minutová inkubace při 0 °C. Denaturované proteiny byly odstraněny centrifugací při otáčkách 10,000 rpm (Hettich Mikro 200R) po dobu 10 minut při 4 °C. Získaný supernatant byl nanesen na 96-ti jamkovou destičku, 100 μl na jamku. Standardy byly pipetovány v duplikátech, vzorky

v triplicátech. Absorbance v jamkách byla změřena na spektrofluorometru Synergy HT s excitačním maximem 540 (± 25) nm a emisním maximem 590 (± 35) nm. Množství lipidových peroxidů bylo ustanoveno podle kalibrační křivky TMP (Tabulka 5) v programu Gen5. Koncentrace byly vztaženy na počáteční koncentrace proteinů ve vzorcích a vyjádřeny v jednotkách nmol/mg.

Tab. 5 Ředící řada standardů pro metodu TBARS.

Číslo zkumavky	Koncentrace (μM)	PBS (μl)	Tetremetoxypropán
1.	0 (Blank)	500	-
2.	0,078125	500	500 μl z 3.
3.	0,15625	500	500 μl z 4.
4.	0,3125	500	500 μl z 5.
5.	0,625	500	500 μl z 6.
6.	1,25	500	500 μl z 7.
7.	2,5	500	500 μl z 8.
8.	5	990	10 μl z 500 μM zásobního roztoku

4.4.3. Stanovení redukováného glutathionu

Materiál

1% citrát sodný: 1 g citrát sodný; 10 ml dH₂O

0,001 M 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB): 0,001 g DTNB; 2,5 ml 1% citrát sodný

0,3M hydrogenfosforečnan disodný pufr (HPDS): 8,52 g NaH₂PO₄; doplněno dH₂O do 200 ml, pH upraveno pomocí H₂SO₄ na pH 8,4

10% trichloroctová kyselina (TCA) (w/v): 10 g trichloroctová kyselina; doplněno dH₂O do 100 ml

10 mM redukováný glutathion (GSH): 6,1 mg GSH; 2 ml H₂O

PBS: 8,05 g NaCl; 0,2 g KCl; 2,9 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O; 0,2 g KH₂PO₄; doplněno dH₂O do 1000 ml; pH upraveno na pH 7,4

Postup

PNS byl smíchán s 10% TCA v poměru jedna ku jedné (100 μ l + 100 μ l) a následně centrifugován 10 minut při otáčkách 5000 rpm (Hettich Mikro 200R) při 4°C. K 100 μ l získanému supernatantu byl přidán 400 μ l 0,3M HPDS, 80 μ l dH₂O a 50 μ l čerstvě připravený 0,001 M DTNB. Reakční směs byla inkubována 10 minut ve tmě. Intenzita žluté barvy byla měřena Synerg HT spektrofotometrem při vlnové délce 412 nm. Výsledná koncentrace GSH ve vzorcích byla vypočítána pomocí kalibrační křivky, ve které místo PNS byl používán GSH podle tabulky 6. Koncentrace GSH byly vztaženy na počáteční koncentrace proteinů ve vzorcích a vyjádřena v jednotkách nmol/mg.

Tab. 6 Ředící řada standardů pro stanovení GSH.

Číslo zkumavky	Koncentrace (μ M)	PBS (μ l)	GSH (μ l)
1.	250	975	25 z 10 mM zásobního roztoku
2.	125	250	250 z 1.
3.	100	300	200 z 1.
4.	50	250	250 z 3.
5.	25	250	250 z 4.
6.	12,5	250	250 z 5.
7.	0	500	-

4.4.4. Stanovení proteinových karbonylů

Materiál

2,5 M HCl: 11 ml 75% HCl; 39 ml dH₂O

10 mM 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH): 0,198 g DNPH + 10 ml 2,5 M HCl

6 M NaOH: 2,4 g NaOH; doplněno dH₂O 10 ml

PBS: 8,05 g NaCl; 0,2 g KCl; 2,9 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O; 0,2 g KH₂PO₄; doplněno dH₂O do 1000 ml; pH upraveno na pH 7,4

Postup

200 μ l PNS bylo smícháno s 200 μ l 10 mM DNPH. Směs byla inkubována 10 minut ve tmě. Po inkubaci bylo přidáno 100 μ l 6 mol NaOH, směs byla centrifugována a opět inkubována 10 minut. Po deseti minutách byla absorbance ve vzorcích okamžitě měřená spektrofotometrem Synergy HT při vlnové délce 450 nm. V standardech byly vzorky nahrazeny PBS. Koncentrace proteinových karbonylů byla vypočítána pomocí molárního extinkčního koeficientu DNPH při 450 nm ($\epsilon = 22308 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) vztažením na počáteční koncentraci proteinů ve vzorcích.

4.4.5. FOX assay

Materiál

Reakční směs: 20 M metanol; 100 μ M xylenolová oranž; 25 mM kyselina sírová; 4 mM butylovaný hydroxytoluen; 250 μ M heptahydrát síranu železnatého
Reakční směs byla připravena čerstvě před pokusem.

Postup

0,9 ml reakční směsi bylo přidáno k 0,1 ml PNS, smícháno a inkubováno 30 minut při pokojové teplotě. Získané vzorky byly naneseny na 96-ti jamkovou destičku a absorbance byla měřena na spektrofotometru Synergy HT při 560 nm. Ze získaných hodnot absorbancí byla vypočítána koncentrace hydroperoxidů využitím molárního excitačního koeficientu $\epsilon_{560} = 43 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.5. Analýza dat

Zpracování získaných dat a tvorba grafů proběhla v programu Graphpad Prism 7.0. Výsledky light/dark box testů byly analyzovány užitím metody dvoucestná ANOVA. Výsledky biochemických pokusů byly analyzovány užitím Studentova t-testu. Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka. Data z biochemických měření jsou získána minimálně ze tří nezávislých pokusů, kdy v rámci jednoho pokusu byly srovnány dvě experimentální skupiny s $n = 3$ vzorky na jednu skupinu.

5. Výsledky

5.1. Light/dark box test

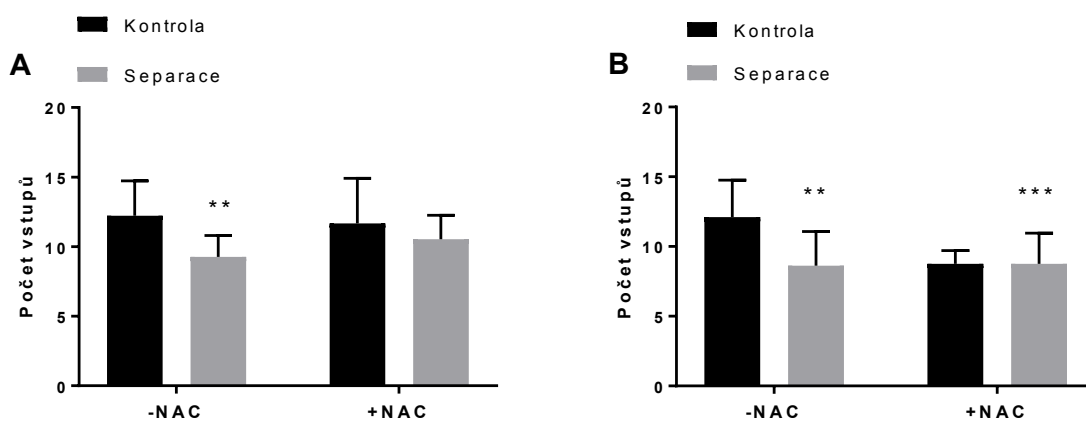
5.1.1. Věk PND 89 ± 1

V light/dark box pokusech byly porovnány kontrolní a separované skupiny samčích a samičích potkanů po aplikaci NAC nebo bez něho. Stanovoval se počet vstupů z tmavé do světlé části a čas strávený ve světlé části.

5.1.1.1. Počet vstupů do světlé části

U samců ANOVA ukázala, že separace signifikantně ovlivnila počet vstupů do světlé části ($F_{3,47}=4,736$; $p=0,0057$; Obrázek 6A). Následná *post hoc* analýza prokázala signifikantní snížení separované skupiny vůči kontrolám bez NAC ($p=0,0053$). I přes malé zvýšení vstupů separovaných potkanů po podání NAC ve srovnání se separovanou skupinou bez něho nebyl prokázán významný vliv jeho aplikace na počet vstupů ($F_{3,47}=0,3223$; $p=0,5730$).

Významný vliv separace na počet vstupů byl patrný také u samic ($F_{1,44}=4,335$; $p=0,0432$; Obrázek 6B). *Post hoc* analýza prokázala významné snížení vstupů separovaných potkanů vůči kontrolám v případě bez NAC ($p=0,0070$). ANOVA dále prokázala vzájemné působení faktorů separace a NAC, což ale byl těsně pod hladinou významnosti ($F_{1,44}=4,335$; $p=0,0432$).

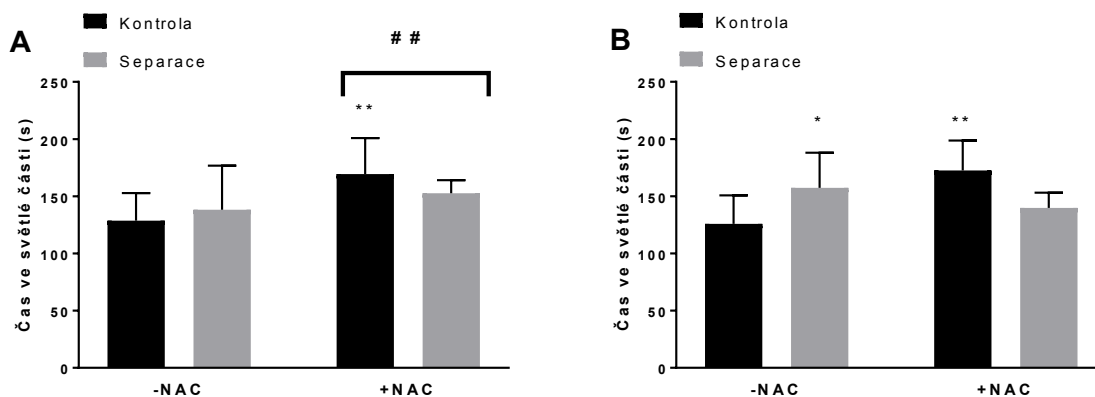


Obr. 6 Počet vstupů samců (A) a samic (B) starých PND 89 ± 1 z tmavé do světlé části aparatury. Na grafech jsou porovnány kontrolní a separované skupiny potkanů po aplikaci nebo bez N-acetylcysteinu (NAC). Data reprezentují průměrné hodnoty \pm standardní odchylku, jsou vyhodnocena pomocí testu dvoucestná ANOVA, skupiny jsou porovnávány Bonferroniho *post hoc* testem (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ v porovnání s kontrolní skupinou bez NAC). Počet potkanů: (A) $n =$ Kontrola -NAC 14, +NAC 9; Separace -NAC 15, +NAC 13; (B) $n =$ Kontrola -NAC 20, +NAC 4; Separace -NAC 8, +NAC 16.

5.1.1.2. Čas strávený ve světlé části

Analýza pomocí ANOVY ukázala, že délka pobytu samců ve světlé části byla významně ovlivněna NAC ($F_{1,49}=11,82$; $p=0,0012$; Obrázek 7A). Následná *post hoc* analýza odhalila statisticky významný rozdíl mezi kontrolními skupinami ($p=0,0084$).

U samic bylo možno sledovat při porovnání dvou skupin výrazný časový rozdíl. Jak separovaná skupina bez NAC ($p=0,0119$) tak kontroly po podání NAC ($p=0,0034$) trávily více času ve světlém kompartmentu než kontroly bez NAC (Obrázek 7B). U samic i v tomto případě bylo vidět vzájemné působení NAC a separace ($F_{1,44}=16,15$; $p=0,0002$).



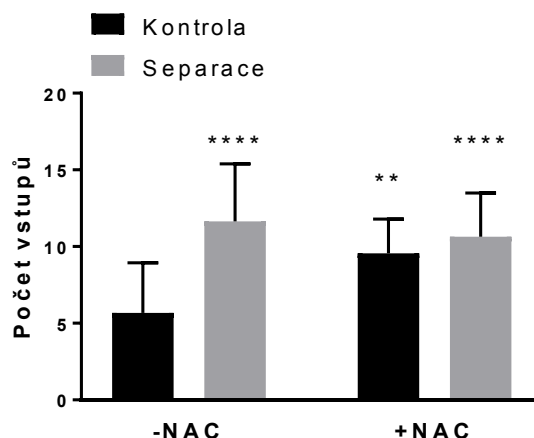
Obr. 7 Čas samců (A) a samic (B) starých PND 89 ± 1 trávený ve světlé části aparatury. Na grafech jsou porovnány kontrolní a separované skupiny potkanů po aplikaci nebo bez N-acetylcysteinu (NAC). Data reprezentují průměrné hodnoty ± standardní odchylku, jsou vyhodnocena pomocí testu dvoucestná ANOVA, skupiny jsou porovnávány Bonferroniho *post hoc* testem (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ v porovnání s kontrolou bez NAC; ## $p < 0,01$ v porovnání s –NAC skupinou). Počet potkanů: (A) $n =$ Kontrola –NAC 15, +NAC 9; Separace –NAC 16, +NAC 13; (B) $n =$ Kontrola –NAC 20, +NAC 4; Separace –NAC 8, +NAC 16.

5.1.2. Věk PND22

Mláďata (PND22) nebyla rozdělena podle pohlaví.

5.1.2.1. Počet vstupů do světlé části

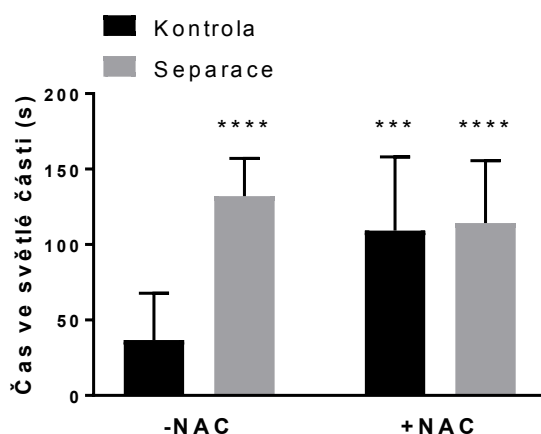
Na základě získaných dat analýza prokázala statisticky významný vliv separace na počet vstupů do světlého boxu ($F_{1,81}=23,27$; $p < 0,0001$; Obrázek 8) a interakci mezi separací a aplikací NAC. *Post hoc* test dále odhalil, že v porovnání s kontrolami bez NAC všechny skupiny vstoupily signifikantně vícekrát do světlého kompartmentu.



Obr. 8 Počet vstupů potkanů starých PND 22 z tmavé do světlé části aparatury. Na grafech jsou porovnány kontrolní a separované skupiny potkanů po aplikaci nebo bez N-acetylcysteinu (NAC). Data reprezentují průměrné hodnoty \pm standardní odchylku, je vyhodnocena pomocí testu dvoucestná ANOVA, skupiny jsou porovnávány Bonferroniho *post hoc* testem (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ v porovnání s kontrolou bez NAC). Počet potkanů: $n =$ Kontrola -NAC 9, +NAC 23; Separace -NAC 12, +NAC 39.

5.1.2.2. Čas strávený ve světlé části

Jak v případě počtu přestupů byla i doba strávená ve světlém kompartmentu významně ovlivněna nízkými hodnotami kontrolní skupiny. ANOVA prokázala signifikantní vliv separace ($F_{1,81}=24,33$; $p < 0,0001$; Obrázek 9) i NAC ($F_{1,81}=7,227$; $p=0,0087$) na délku pobytu a také interakci mezi separací a podáváním NAC ($F_{1,81}=19,63$; $p < 0,0001$). Porovnávání skupin přineslo podobný vzor výsledků jako v situaci s přestupem. Separanti bez NAC a obě NAC skupiny vykazovali statisticky významné zvýšení doby v osvětlené části aparatury.



Obr. 9 Doba, kterou potkani staří PND 22 strávili v tmavé části aparatury. Na grafech jsou porovnány kontrolní a separované skupiny potkanů po aplikaci nebo bez N-acetylcysteinu (NAC). Data reprezentují průměrné hodnoty \pm standardní odchylku, jsou vyhodnocena pomocí testu dvoucestná ANOVA, skupiny jsou porovnávány Bonferroniho *post hoc* testem (***) $p < 0,001$; ****) $p < 0,0001$ v porovnání s kontrolou bez NAC). Počet potkanů: n = Kontrola –NAC 9, +NAC 23; Separace –NAC 12, +NAC 39.

5.2. Biochemické metody

5.2.1. Stanovení redukovaného glutathionu

Principem stanovení GSH je reakce thiolových skupin molekuly GSH s Ellmanovým činidlem (DTNB). V reakci na jeden mol thiolu vzniká jeden mol aniontu TNB. Protože tento aniont je silně barevný ($A_{\max} = 412 \text{ nm}$), může být použit k měření koncentrace GSH.

5.2.1.1. Standardizace metody

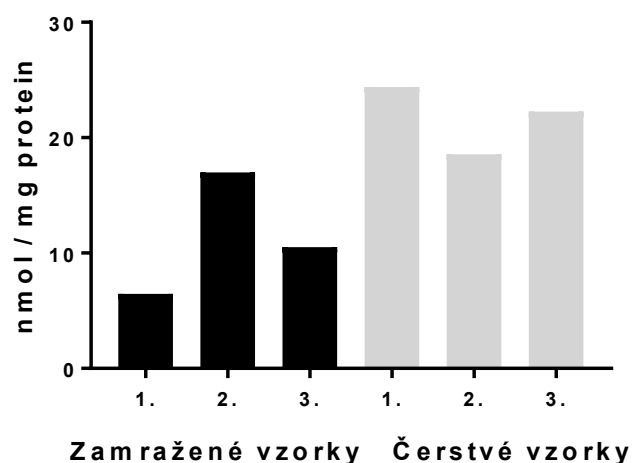
V metodě stanovení GSH se ukázala důležitost pH a složení pufru. Původně se stanovení GSH zkoušelo s PBS v reakční směsi místo pufru HPDS. To však mělo za následek nízké hodnoty absorbancí vzorků, které byly srovnatelné s hodnotami pro blank. Jedině při vysokých koncentracích standardů v kalibrační křivce bylo možné detekovat malou změnu v hodnotě absorpance (Tabulka 7).

Tab. 7 Reprezentativní hodnoty absorbance kalibrační křivky a vzorků získané použitím různých reakčních pufrů.

		Kalibrační křivka (μM DTNB)						Vzorky	
		Blank	2,5	5	10	50	100	K1	K2
A	PBS	0,065	0,065	0,061	0,067	0,075	0,109	0,069	0,064
	HPDS	0,062	0,061	0,064	0,067	0,105	0,16	0,107	0,12

A - absorbance; PBS – standardní fosfátový pufr; DSHP – disodiumhydrogenfosfátový pufr

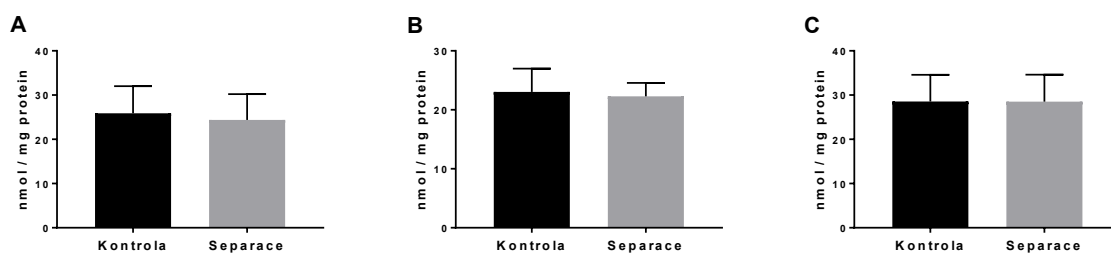
Dalším výrazným rušivým faktorem se ukázalo zamražení a opětovné rozmražení homogenátu. Obrázek 10 znázorňuje reprezentativní hodnoty koncentrace GSH získané z čerstvého a z rozmraženého homogenátu. Lze vidět výraznější odchylky a nižší hodnoty koncentrací v případě měření rozmražených vzorků. Náchylnost GSH vyvolala nutnost provádět jeho stanovení okamžitě z čerstvě zpracovaného vzorku bez významné časové prodlevy.



Obr. 10 Reprezentativní hodnoty koncentrace GSH ze tří pokusů. Jsou porovnány hodnoty získané měřením čerstvě homogenizovaných a rozmražených vzorků mozkové tkáně.

5.2.1.2. Vliv maternální separace na koncentrace GSH v mozkových strukturách potkanů

V pokusech měření GSH nebylo vidět změnu v žádné zkoumané mozkové struktuře po separaci. Jediná rozeznatelná odlišnost byla v koncentraci GSH mezi strukturami (Obrázek 11).



Obr. 11 Koncentrace GSH v mozkové kůře (A), hipokampu (B) a mozečku (C) potkanů starých 22 dnů (PND22). Na grafech jsou porovnávány kontrolní a separované skupiny potkanů. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm standardní odchylku, jsou vyhodnocena pomocí nepárového Studentova t-testu. Počet pokusů: (A) = 7; (B) = 5; (C) = 7.

5.2.2. TBARS

Pomocí TBARS (látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou, thiobarbituric acid reactive substances) metody se stanovuje úroveň lipoperoxidace měřených vzorků. Je založena na reakci jedné molekuly MDA se dvěma molekulami kyseliny thiobarbiturové (TBA) za vzniku barevného komplexu ($A_{\max} = 532 \text{ nm}$). Pro reakce musí být zachována vysoká teplota (90-100 °C) a kyselé pH (kolem 3,5).

5.2.2.1. Standardizace metody

Předtím než bylo provedeno stanovení úrovně peroxidace ve vzorcích mozkové tkáně získaných z pokusů zaměřených na sledování důsledků maternální separace, bylo vyzkoušeno několik postupů s cílem najít co nejvhodnější způsob měření.

A. V první sérii pokusů byly proteiny nejprve precipitovány pomocí TCA a odstraněny z PNS. Získaný supernatant byl smíchán s TBA a po inkubaci měřena absorbance. I přes podobný postup s konečným protokolem byly takto naměřené absorbance vzorků velmi nízké, často porovnatelné s blankem, což ztížilo kvantifikaci výsledků. Tabulka 8 obsahuje reprezentativní hodnoty absorbance kalibrační křivky a vzorků mozkové kůry kontrolních potkanů.

Tab. 8 Reprezentativní hodnoty absorbance kalibrační křivky a vzorků získané postupem A.

Kalibr. křivka	Koncentrace TMP (μM)	Blank	0,625	1,25	2,5	5	10	50	100
	Absorbance	0,049	0,0715	0,09	0,131	0,2235	0,356	1,6825	2,9585
Vzorek	Číslo	K1	K2						
	Absorbance	0,0625	0,054						

Kalibr. křivka – kalibrační křivka; TMP – tetramethoxypropán

B. Další postup využíval extrakci lipidových peroxidů. Reakční směs připravená smícháním PNS, kyseliny fosforečné a TBA byla inkubována 15 minut při 90 °C a následně byl přidán butanol. Po centrifugaci byla organická vrstva obsahující peroxidy oddělena a intenzita růžového zbarvení vyhodnocena spektrofotometricky. Absorbance vzorků v porovnání s blankem byla vyšší než v případě postupu A (Tabulka 9). V tomto případě se však ukázala obtížnost v zajištění dostatečné reprodukovatelnosti kroku spočívajícího v butanolové extrakci. Neúplná extrakce a z toho vyplývající relativně velké kolísání absorbance vzorků by mohly mít za následek nespolehlivost při vzájemném porovnávání výsledků jednotlivých pokusů.

Tab. 9 Reprezentativní hodnoty absorbance kalibračních křivek a vzorků získané postupem B.

Kalibrační křivka									Vzorek	
TMP (μM)	Blank	0,3125	0,625	1,25	2,5	5	10	20		
A	Pokus 1	0,0505	0,056	0,0615	0,074	0,0835	0,115	0,161	0,2475	0,0713
	Pokus 2	0,053	0,056	0,057	0,064	0,077	0,101	0,16	0,2565	0,133

V tabulce jsou porovnány absorbance získané ze dvou pokusů. Hodnoty absorbance stejného vzorku se významně lišily při opakovaném měření. A – absorbance; TMP - tetramethoxypropan

C. Vynechání extrakčního kroku z postupu B významně zvýšilo hodnoty absorbance vzorků a snížilo rozdíly mezi jednotlivými měřeními (Tabulka 10).

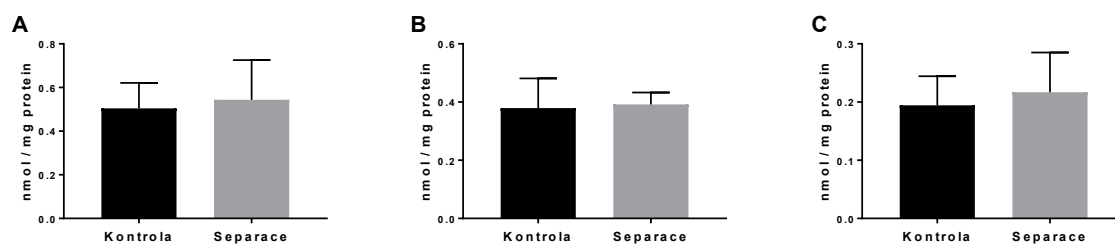
Tab. 10 Absorbance kalibračních křivek a vzorků. Porovnání absorbance tří pokusů provedené podle postupu C.

Kalibrační křivka									Vzorek	
TMP (μM)	Blank	0,3125	0,625	1,25	2,5	5	10	20		
A	Pokus 1	0,045	0,0505	0,053	0,0595	0,072	0,098	0,146	0,2415	0,086
	Pokus 2	0,0465	0,053	0,056	0,0645	0,072	0,0995	0,1485	0,249	0,08
	Pokus 3	0,049	0,053	0,056	0,068	0,078	0,107	0,1695	0,2875	0,094

Nakonec však byl zaveden protokol, na jehož základě byla získána výsledná data. Postup je podobný jako v předcházejících případech, na stanovení intenzity barevného produktu se ale využívá citlivější fluorometrické měření.

5.2.2.2. Vliv maternální separace na koncentrace TBARS v mozkových strukturách potkanů

Z grafických znázornění naměřených dat lze vidět nepatrné zvýšení TABRS ve vzorcích mozkové tkáně získané ze separovaných potkanů (Obrázek 12). V tomto případě byly rozdíly koncentrací mezi strukturami výraznější, hlavně v případě kůry (A) a mozečku (C).



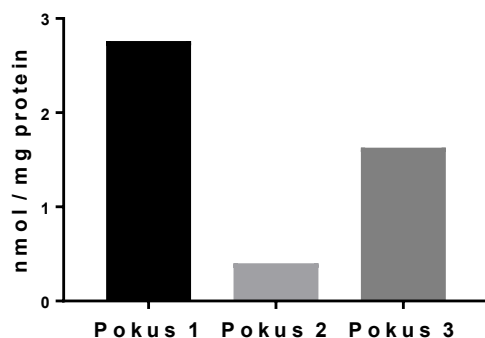
Obr. 12 Koncentrace TBARS v mozkové kůře (A), hipokampu (B) a mozečku (C) potkanů starých 22 dnů (PND22). Na grafech jsou porovnávány výsledky získané z kontrolní a separované skupiny potkanů. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm standardní odchylku, jsou vyhodnocena pomocí nepárového Studentova t-testu. Počet pokusů: (A) = 7; (B) = 5; (C) = 6.

5.2.3. Stanovení proteinových karbonylů

Koncentrace karbonylových skupin v oxidovaných proteinech byla stanovena alkalickou 2,4-dinitrofenylhydrazinovou (DNPH) metodou. Je založena na reakci karbonylů s DNPH. Přidání NaOH do roztoku posune absorpční maximum spektrofotometrického měření hydrazonových derivátů k vyšší vlnové délce (450 nm), kde interference s nenavázaným DNPH je menší.

5.2.3.1. Standardizace metody

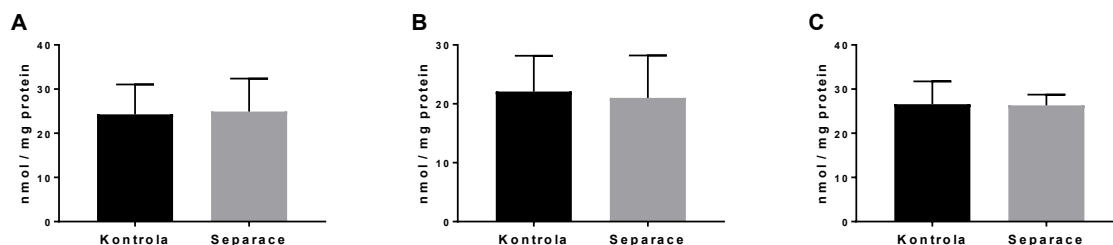
Na stanovení proteinových karbonylů byla nejdříve používána DNPH metoda zahrnující více kroků. Po reakci DNPH s karbonyly byly opakovaným promýváním odstraněny nenavázané molekuly DNPH. Na konci získaný proteinový pelet byl rozpuštěn v 6M guanidinu a následně měřena absorbance ($A_{\max} = 370 \text{ nm}$). Obtížné rozpouštění peletu neumožnilo kvantifikovat veškeré přítomné karbonyly, což mělo za následek nízké hodnoty absorbancí a kolísání hodnot výsledných koncentrací. Obrázek 13 znázorňuje výsledky třech nezávislých pokusů, ve kterých byly použity vzorky kontrolní mozkové kůry.



Obr. 13 Koncentrace proteinových karbonylů v kontrolních pokusech.

5.2.3.2. Vliv maternální separace na koncentrace proteinových karbonylů v mozkových strukturách potkanů

Ani v případě měření proteinových karbonylů jsme nezaznamenali výraznější rozdíly v koncentracích mezi jednotlivými skupinami (Obrázek 14).



Obr. 14 Koncentrace proteinových karbonylů v mozkové kůře (A), hipokampu (B) a mozečku (C) potkanů starých 33 dnů (PND22). Na grafech jsou porovnávány výsledky měření provedených na vzorcích mozkové tkáně získané z kontrolních a separovaných potkanů. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm standardní odchylku a jsou vyhodnocena pomocí nepárového Studentova t-testu. Počet pokusů: (A) = 6; (B) = 4; (C) = 5.

5.2.4. FOX assay

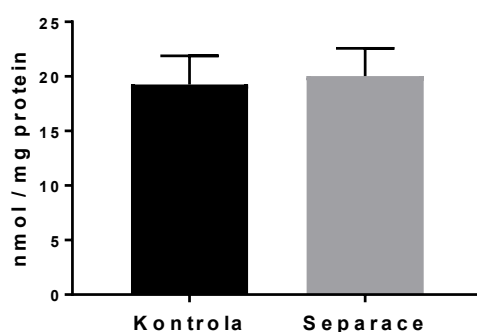
Metodou FOX (ferrous oxidation-xylenol orange assay) byly stanoveny lipidové hydroperoxydy (LOOH), primární produkty peroxidace lipidů. Byla využita oxidace Fe^{2+} s LOOH a tvorba komplexu Fe^{3+} s xylenolovou oranží. Reakce probíhá v kyselém prostředí.

5.2.4.1. Standardizace metody FOX assay

V případě metody FOX assay byl jedinou změnou během standardizace přechod na vypočítání koncentrací pomocí extinkčního koeficientu místo počátečního použití kalibrační křivky. Graf byl sestaven z hodnot signálů standardů s použitím t-BuOOH. Kalibrační křivka byla sestavena z hodnot signálů standardů s použitím peroxidu t-BuOOH. Z časových důvodů tato metoda byla aplikována jen pro měření na vzorcích mozečků.

5.2.4.2. Vliv maternální separace na koncentrace lipidových hydroperoxidů v mozečku potkanů

Výsledky této metody naměřené na vzorcích mozečků vykazovaly podobný trend jako v případě TBARS a karbonylů. Můžeme pozorovat tendenci k nepatrnému zvýšení koncentrace lipidových hydroperoxidů ve vzorcích u separované skupiny (Obrázek 15).



Obr. 15 Koncentrace lipidových hydroperoxidů v mozečku potkanů starých 22 dnů (PND22). Na grafech jsou porovnávány výsledky měření provedených na vzorcích mozečků získaných ze skupiny kontrolních a separovaných potkanů. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm standardní odchylku, jsou vyhodnocena pomocí nepárového Studentova t-testu. Počet pokusů: 3.

6. Diskuze

Výsledky některých dříve publikovaných experimentů potvrzují, že stres během časného života vede nejen k trvalé změně mozkových struktur a funkčních deficitů, ale také zvyšuje riziko duševních poruch v mládí a dospělosti (McEwen *et al.*, 2012). Vzhledem k nemožnosti použití invazivních pokusných metod při zkoumání vývoje těchto změn u lidí byly zavedeny zvířecí modely. Běžnou metodou pro modelování stresu časného života je maternální separace potkanů a myši v prvních týdnech života. Výsledky opakovaných pokusů jsou však často v rozporu s již naměřenými hodnotami a lze zaznamenat protichůdná pozorování (Tractenberg *et al.*, 2016). Náš model zahrnoval separaci potkanů kmene Long Evans na tři hodiny denně během prvních tří týdnů postnatálního života.

Vliv maternální separace a N-acetylcysteinu na úzkostné chování potkanů

Jedním z přístupů ke sledování vlivu maternální separace bylo testování chování mladých (PND22) a dospělých (PND90) potkanů v light/dark boxu. Sledovanými faktory byly počet přestupů z tmavé do světlé části a délka pobytu ve světlém kompartmentu aparatury. Vedle testování úzkostného chování nás zajímalo, jaký vliv má antioxidant NAC na potenciální odlišnosti v chování zvířat po separaci.

Po separaci bylo prokázáno signifikantní snížení počtu přestupů potkanů dospělých PND90 u obou pohlaví. To je v souladu s pozorováním u většiny dosavadních studií zabývajících se dopadem maternální separace na úzkostné chování v dospělém věku. Ve většině případů byl totiž pozorován anxiogenní účinek jak u samců (Huot *et al.*, 2002; Huot *et al.*, 2001; Aisa *et al.*, 2007), tak u samic (Kalinichev *et al.*, 2002). Je však třeba dodat, že v některých experimentech nebyly patrné rozdíly v úzkostném chování ovlivněných zvířat (Slotten *et al.*, 2006). Dokonce po separaci potkanů podle námi používaného protokolu byly naměřeny i hodnoty ukazující sníženou úroveň úzkosti dospělých samců (Zhang *et al.*, 2014).

V případě druhé naměřené veličiny vykazovala analýza hodnot samic bez NAC statisticky významné navýšení času stráveného ve světlé části aparatury po separaci. Doba, kterou zde strávili separovaní samci, byla oproti kontrolám o něco delší. Tento jev by bylo možné vysvětlit tak, že časný stres v našem pokusu snížil úroveň úzkosti u dospělých samic. Tento závěr by tudíž mohl být v souladu s prací McIntosh *et al.*, 1999, v níž autoři uvedli, že separované samice vykazovaly signifikantně méně úzkostné chování než kontroly. Nicméně z námi naměřených dat jsme nemohli ověřit, jaký vliv mělo osvětlené prostředí na chování potkanů, když překonali strach a vstoupily do něho. V parametrech našeho pokusu nebylo

stanoveno měření vzdálenosti, kterou potkani ušli, a jejich aktivity při zkoumání prostředí. Prodloužení doby strávené ve světlé části může být následkem strachové ataxie, kdy u potkanů místo průzkumné aktivity nastane dočasná nehybnost, často pozorovaná například u hlodavčích modelů PTSD (Rau *et al.*, 2005). Z toho by naopak vyplývalo zvýšení úzkosti, a tudíž negativní dopad separace.

V mnoha dosavadních studiích jsou uváděny výhody použití NAC jako možné léčby při psychiatrických stavech (McQueen *et al.*, 2018; Berk *et al.*, 2011). Jiní autoři popisují u hlodavců spojení mezi oxidativním stresem v mozku a nástupem úzkostného chování (Patki *et al.*, 2013; Deoliveira *et al.*, 2007), což ukazuje na potenciální využití NAC v této oblasti. I přesto se poměrně málo prací zabývá jeho potenciálním anxiolytickým účinkem (Santos *et al.*, 2017; Mocelin *et al.*, 2015). Mezi účinky NAC na tyto poruchy patří antioxidační ochrana proti oxidativnímu stresu.

Po aplikaci NAC byla patrná tendence zvýšení přestupů separovaných samců, i když v porovnání se separantami bez NAC nebyl nárůst statisticky významný. U samic nebyly pozorovány rozdíly v počtu vstupů po podávání NAC. Navíc u nich měla i skupina bez separace snížené hodnoty oproti neovlivněné skupině. Její hodnoty mohou ale být významně ovlivněné relativně nízkým počtem zvířat ve skupině. Z našich výsledků je dále patrné, že skupiny samců dostávajících NAC strávily více času ve světlé části aparatury než společníci bez NAC. Zvláště významný byl vzestup hodnot ve skupině, která kromě doby aplikace NAC byla nepřetržitě s matkou. U samic byl trend v NAC skupině podobný. Zde se je však opět potřeba vzít v úvahu reaktivně nízký počet naměřených dat kontrolní NAC skupiny.

Výsledky námi provedených pokusů naznačují, že maternální separace měla dlouhodobý efekt na chování potkanů, projevující se jako zvýšená úzkost v light/dark box testu v dospělosti. Další data, která jsme získali po aplikaci NAC ukazují na tendenci, že aplikace NAC soubežně se separací by mohla zvýšit počet přestupů z tmavé do světlé části aparatury a čas strávený ve světlé části u dospělých potkanů, a to hlavně u samců. To by znamenalo, že NAC má potenciální anxiolytický účinek. K podobnému závěru došli Santos *et al.*, 2017 v myších pokusech a Mocelin *et al.*, 2015 v pokusech s rybou danio pruhované.

U mladých potkanů PND22 oba faktory vykazovaly podobný trend mezi skupinami. V porovnání s kontrolní skupinou měli jak separovaní potkani, tak obě NAC ovlivněné skupiny významně zvýšené hodnoty.

Jen malé množství odborných prací se zabývá behaviorálními změnami dospívajících potkanů po časném stresu včetně změn chování po maternální separaci. Zároveň tyto práce často obsahují data získaná v různých periodách dospívání, kdy vývoj mozku stále probíhá a

mozek je monitorován v různých fázích svého vývoje. Proto je velmi obtížné porovnat získaná data u mladých potkanů. Každopádně většina výsledků naznačuje, že maternální separace má negativní vliv na úzkostné chování dospívajících potkanů (Chocyk *et al.*, 2013).

V rozporu s tím naše výsledky jednoznačně poukazují na nejvyšší stupeň úzkosti ve skupině kontrol bez NAC. Z toho vyplývá, že buď kontrolní skupina vykazovala velmi vysokou úzkost, nebo u ostatných skupin nastaly mechanismy vedoucí k anxiolyze. V prvním případě můžeme uvažovat o tom, jestli matka vysoce úzkostné skupiny strávila dostatek času s potomky, nebo je poněkud zanedbávala. Jelikož se odlišnosti v péči matek o mláďata objevují přirozeně, teoreticky mohla matka kontrolní skupiny strávit pečováním o mláďata méně času. Již dříve bylo prokázáno, že deficit mateřské péče má negativní vliv na vývoj nervových systémů, které zprostředkovávají strach (Caldji *et al.*, 2003; Caldji *et al.*, 1998).

Na druhou stranu můžeme uvažovat o tom, že matky po separaci nebo po aplikaci NAC v některých případech vykazovaly zvýšenou péči o mláďata, jak to zaznamenali Macri *et al.*, 2008. Otázkou je, jestli lze považovat každodenní aplikaci NAC za časnou manipulaci mající pozitivní dopad na vývoj mláďat. To by mohlo vysvětlit vysoké hodnoty sledovaných parametrů v NAC skupinách. Zároveň obě separované skupiny byly zvyklé na cizí prostředí, zatímco kontrolní mláďata postrádající NAC během prvních 21 dní života strávila neustále s matkou a při light/dark box testu byla poprvé vystavena většímu stresu, což na ně mohlo působit silně anxiogenně. Ze získaných dat nemůžeme s jistotou usuzovat, jaký vliv měla separace a NAC na úzkostné chování ve věku PND22.

Vliv maternální separace na markery oxidativního stresu v mozcích potkanů

Vedle sledování behaviorálních změn byla dalším těžištěm práce standardizace metod na stanovení markerů oxidativního stresu a následně jejich měření v mozkové kůře, hipokampu a mozečku kontrolních a maternálně separovaných potkanů po PND22. Sledované markery byly koncentrace GSH, proteinové karbonyly, TBARS a lipidové hydroperoxydy.

Dosud se jen málo prací zabíralo námi sledovanými biochemickými markery v mozku dospívajících hlodavců po časném stresu. Výsledky těchto pokusů nejsou konzistentní ohledně změny koncentrace markerů. V některých případech nebyly zaznamenány změny (do Prado *et al.*, 2016), zatímco Uysal *et al.* (2005) popsali změny v peroxidaci lipidů v závislosti na věku v rámci dospívání. Je však třeba zmínit, že v uvedených pracech byly použity různé protokoly na vyvolání stresu a markery byly stanoveny v různém období vývoje.

Zkoumání markerů oxidativního stresu námi používanými metodami neodhalilo téměř žádné změny v mozkových strukturách PND22 potkanů mezi kontrolní a separovanou skupinou. To je v rozporu s očekáváním, že náš protokol vede k výraznému oxidativnímu poškození biomolekul nebo k vychýlení thiolového antioxidantu GSH v mozku potkanů. To však nutně neznamená, že nedošlo k žádné změně na buněčné úrovni.

Jedno vysvětlení těchto zjištění může být, že chronický stres v buňkách může vyvolat adaptivní změny, ke kterým patří zvýšená aktivita antioxidantních enzymů. Pajovic *et al.*, (2006) například ukázali, že v hipokampu chronický stres zvýšil aktivitu MnSOD, CuZnSOD a CAT. Podobně v práci Uysal *et al.*, (2005) byla ztráta maternální péče během jednorázové 24 hodinové separace v období SHRP spojena se zvýšenou enzymatickou aktivitou GPx, po SPRH zvýšenou aktivitou SOD v hipokampu, PFC a striatu. V jiné studii bylo prokázáno, že chronický stres může vést ke zvýšení aktivity CAT, ale zároveň ke snížení aktivity SOD v pozdním dospívání (PND40) (Lucca *et al.*, 2009). Z toho je vidět, že ani změny těchto markerů nejsou uniformní po působení stresu. Nicméně jejich detekce může být nápomocná k přesnějšímu odhalení výkyvů v redoxním stavu.

Kromě enzymatických antioxidantů a antioxidantních systémů hrají roli v obraně proti ROS i některé doplňky stravy, jako jsou vitamíny. Tyto živiny mohou samy vychytávat reaktivní látky a zároveň sloužit jako kofaktory enzymů. Vitamin E představuje první linii obrany proti oxidaci lipidů (Zaidi & Banu, 2004) a bylo zaznamenáno zvýšení úzkostného chování u dospívajících a dospělých potkanů při jeho nedostatku v krmivu (Terada *et al.*, 2011). Jelikož krmivo ST-1 používané v našich pokusech také obsahuje vitamíny A, E a D, tyto vitamíny se mohly dostat mateřským mlékem z matky do mláďat a přispět k ochraně organismu. Teoreticky oxidativní stres v našem pokusu nepřesáhl kapacitu této obranné linie a nedošlo ke změně koncentrace endogenního antioxidantu GSH a ani k poškození biomolekul. Pokud to tak je, změnu způsobenou radikály bychom mohli zaznamenat jenom měřením koncentrací vitamínů.

V případě, že už došlo k ROS zprostředkovanému narušení buněk, existují i opravné mechanismy na obnovení nebo odstranění poškozených molekul. Pokusy na buněčných kulturách nervových buněk prokázaly zvýšenou expresi podjednotek proteasomu 20S/26S v odpovědi na vystavení nízké hladiny ROS (Ding *et al.*, 2003). Další enzym s potenciální opravnou kapacitou je peroxiredoxin 6, který kromě peroxidázové aktivity odstraňující H_2O_2 má i aktivitu fosfolipázy schopné odstranit poškozené fosfolipidy. Byla prokázána nadměrná syntéza tohoto enzymu indukovaná oxidativním stresem (Manevich *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2000). Zvýšenou koncentraci jeho mRNA a syntézu enzymu bylo možno sledovat i po

opakované aplikaci dexamethasonu potkanům v prvním týdnu postnatálního života v mozkové kůře a hipokampu. Mimoto jeho hladina se postupně zvyšuje po narození (Shim *et al.*, 2012). Oxidativní stres může vést i k aktivaci transkripčního faktoru Nrf2, který spustí syntézu enzymů důležitých pro tvorbu GSH (Steele *et al.*, 2013). Zmíněné zesílení opravných mechanismů poskytuje další možné vysvětlení, proč jsme neviděli rozdíly mezi skupinami.

Metody používané v našich pokusech neprokázaly žádné signifikantní změny v koncentracích sledovaných markerů. Z toho však nemusí nezbytně vyplývat, že maternální separace v tomto pokusu neměla vliv na redoxní stav a nedošlo k žádným změnám v buňkách. Zkoumání dalších zmíněných potenciálních faktorů by mohlo ještě lépe vyjasnit vliv časného stresu na oxidativní poškození dospívajícího mozku.

7.Závěr

V této práci byl studován vliv maternální separace na markery oxidativního stresu ve vybraných strukturách mozku potkanů a rovněž vliv separace na jejich chování. Dále byl zkoumán účinek NAC na chování zvířat po aplikaci této látky paralelně se separací.

Markery oxidativního stresu byly sledovány u dospívajících potkanů ve věku PND22. Nebyla potvrzena předpokládaná schopnost časného chronického stresu vyvolat poškození buněk vybraných struktur mozku. Výsledky biochemických pokusů naznačily, že v kůře, hipokampu a mozečku nedošlo ke změně hladiny GSH, proteinových karbonylů a oxidativních produktů lipidů. Nelze však vyloučit, že separace vyvolala oxidativní stres, který ale byl vyrovnán obranným systémem a kompenzačními mechanismy buněk. Dopady separace a NAC na chování byly sledovány pomocí light/dark box testu u potkanů ve věku PND22 a PND90. Ve skupině mladých zvířat byly zaznamenány poněkud nečekané výsledky s nejvyšší úzkostí v kontrolní skupině. U dospělců separace způsobila zvýšení úzkostného chování. Aplikace NAC u dospělých samců tento efekt částečně obrátila.

Jen málo prací se zabývá výzkumem oxidativního stresu ve vyvíjejícím se mozku po časném stresu. Z výsledků naší práce by bylo možné usuzovat, že na počátku dospívání ještě není patrné poškození buněk způsobené chronickým stresem. Je možné, že k vyvolání oxidativního stresu dochází jen přechodně při akutním behaviorálním stresu, a že opakovaná separace mláďat od matky v postnatální období navodí adaptivní změny v mozku, které mohou souviset s jeho vyšší odolností vůči oxidativnímu stresu. Pro vyjasnění těchto pozorování a spekulací by bylo potřebné provést další studie. Mohlo by být užitečné monitorovat i některé jiné markery a analyzovat vzorky mozkové tkáně v jiných časových intervalech v průběhu maternální separace a ne pouze po jejím ukončení. Výsledky našich behaviorálních pokusů naznačují, že anxiogenní účinek časného chronického stresu se projevuje teprve až v dospělosti. Pokusy s NAC potvrdily, že tato látka má potenciální anxiolytický účinek. Pro přesnější posouzení získaných dat by bylo možné v dalších pokusech paralelně používat i kontrolní potkany s krátkou každodenní separací. Nicméně na základě našich pozorování lze konstatovat, že NAC je oprávněně testován jako potenciálně užitečná látka v boji proti úzkostným poruchám.

8. Literatura

- Aguilera, G., Harwood, J.P., Wilson, J.X., Morell, J., Brown, J.H., & Catt, K.J. (1983) Mechanisms of action of corticotropin-releasing factor and other regulators of corticotropin release in rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.*, **258**, 8039–8045.
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., & Ramírez, M.J. (2007) Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, **32**, 256–266.
- Alpár, A., Zahola, P., Hanics, J., Hevesi, Z., Korchynska, S., Benevento, M., Piffl, C., Zachar, G., Perugini, J., Severi, I., Leitgeb, P., Bakker, J., Miklosi, A.G., Tretiakov, E., Keimpema, E., Arque, G., Tasan, R.O., Sperk, G., Malenczyk, K., Máté, Z., Erdélyi, F., Szabó, G., Lubec, G., Palkovits, M., Giordano, A., Hökfelt, T.G., Romanov, R.A., Horvath, T.L., & Harkany, T. (2018) Hypothalamic CNTF volume transmission shapes cortical noradrenergic excitability upon acute stress. *EMBO J.*, **37**, e100087.
- Arnér, E.S.J. & Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase: Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6102–6109.
- Bachi, A., Dalle-Donne, I., & Scaloni, A. (2013) Redox Proteomics: Chemical Principles, Methodological Approaches and Biological/Biomedical Promises. *Chem. Rev.*, **113**, 596–698.
- Bains, J.S., Cusulin, J.I.W., & Inoue, W. (2015) Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus. *Nat. Rev. Neurosci.*, **16**, 377–388.
- Barbazanges, A., Piazza, P.V., Le Moal, M., & Maccari, S. (1996) Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J. Neurosci.*, **16**, 3943–3949.
- Bedard, K. & Krause, K.-H. (2007) The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.*, **87**, 245–313.
- Bedrosian, T.A., Quayle, C., Novaresi, N., & Gage, F.H. (2018) Early life experience drives structural variation of neural genomes in mice. *Science*, **359**, 1395–1399.
- Behl, C., Lezoualc'H, F., Trapp, T., Widmann, M., Skutella, T., & Holsboer, F. (1997) Glucocorticoids Enhance Oxidative Stress-Induced Cell Death in Hippocampal Neurons in Vitro. *Endocrinology*, **138**, 101–106.
- Berk, M., Dean, O., Cotton, S.M., Gama, C.S., Kapczynski, F., Fernandes, B.S., Kohlmann, K., Jeavons, S., Hewitt, K., Allwang, C., Cobb, H., Bush, A.I., Schapkaitz, I., Dodd, S., &

- Malhi, G.S. (2011) The efficacy of N-acetylcysteine as an adjunctive treatment in bipolar depression: An open label trial. *J. Affect. Disord.*, **135**, 389–394.
- Berk, M., Malhi, G.S., Gray, L.J., & Dean, O.M. (2013) The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends Pharmacol. Sci.*, **34**, 167–177.
- Blanco, R.A., Ziegler, T.R., Carlson, B.A., Cheng, P.-Y., Park, Y., Cotsonis, G.A., Accardi, C.J., & Jones, D.P. (2007) Diurnal variation in glutathione and cysteine redox states in human plasmas. *Am. J. Clin. Nutr.*, **86**, 1016–1023.
- Caldji, C., Diorio, J., & Meaney, M.J. (2003) Variations in Maternal Care Alter GABAA Receptor Subunit Expression in Brain Regions Associated with Fear. *Neuropsychopharmacology*, **28**, 1950–1959.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., & Meaney, M.J. (1998a) Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 5335–5340.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., & Meaney, M.J. (1998b) Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 5335–5340.
- Cawley, N.X., Li, Z., & Loh, Y.P. (2016) 60 YEARS OF POMC: Biosynthesis, trafficking, and secretion of pro-opiomelanocortin-derived peptides. *J. Mol. Endocrinol.*, **56**, T77–T97.
- Chakraborti, A., Gulati, K., Banerjee, B.D., & Ray, A. (2007) Possible involvement of free radicals in the differential neurobehavioral responses to stress in male and female rats. *Behav. Brain Res.*, **179**, 321–325.
- Champagne, D.L., Bagot, R.C., van Hasselt, F., Ramakers, G., Meaney, M.J., de Kloet, E.R., Joels, M., & Krugers, H. (2008) Maternal Care and Hippocampal Plasticity: Evidence for Experience-Dependent Structural Plasticity, Altered Synaptic Functioning, and Differential Responsiveness to Glucocorticoids and Stress. *J. Neurosci.*, **28**, 6037–6045.
- Charmandari, E., Tsigos, C., & Chrousos, G. (2005) Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, **67**, 259–284.
- Chen, J.-W., Dodia, C., Feinstein, S.I., Jain, M.K., & Fisher, A.B. (2000) 1-Cys Peroxiredoxin, a Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A2 Activities. *J. Biol. Chem.*, **275**, 28421–28427.
- Chocyk, A., Bobula, B., Dudys, D., Przyborowska, A., Majcher-Maślanka, I., Hess, G., & Wędzony, K. (2013) Early-life stress affects the structural and functional plasticity of the medial prefrontal cortex in adolescent rats. *Eur. J. Neurosci.*, **38**, 2089–2107.

- Choi, J., Rees, H.D., Weintraub, S.T., Levey, A.I., Chin, L.-S., & Li, L. (2005) Oxidative Modifications and Aggregation of Cu,Zn-Superoxide Dismutase Associated with Alzheimer and Parkinson Diseases. *J. Biol. Chem.*, **280**, 11648–11655.
- Chrousos, G.P. (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, **267**, 1244–1252.
- Davies, M.J. (2016) Protein oxidation and peroxidation. *Biochem. J.*, **473**, 805–825.
- Dayas, C.V., Buller, K.M., Crane, J.W., Xu, Y., & Day, T.A. (2001) Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 1143–1152.
- De Bosscher, K., Schmitz, M.L., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Fiers, W., & Haegeman, G. (1997) Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor- κ B dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 13504–13509.
- Dedic, N., Chen, A., & Deussing, J.M. (2018) The CRF Family of Neuropeptides and their Receptors - Mediators of the Central Stress Response. *Curr. Mol. Pharmacol.*, **11**, 4–31.
- Deoliveira, M., Silvestrin, R., Melloesouza, T., & Moreira, J. (2007) Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: Effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. *NeuroToxicology*, **28**, 1191–1199.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Halmos, K.C., & Tasker, J.G. (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J. Neurosci.*, **23**, 4850–4857.
- Ding, Q., Reinacker, K., Dimayuga, E., Nukala, V., Drake, J., Butterfield, D.A., Dunn, J.C., Martin, S., Bruce-Keller, A.J., & Keller, J.N. (2003) Role of the proteasome in protein oxidation and neural viability following low-level oxidative stress. *FEBS Lett.*, **546**, 228–232.
- Do, K.Q., Trabesinger, A.H., Kirste-Krüger, M., Lauer, C.J., Dydak, U., Hell, D., Holsboer, F., Boesiger, P., & Cuénod, M. (2000) Schizophrenia: glutathione deficit in cerebrospinal fluid and prefrontal cortex in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 3721–3728.
- do Prado, C.H., Narahari, T., Holland, F.H., Lee, H.-N., Murthy, S.K., & Brenhouse, H.C. (2016) Effects of early adolescent environmental enrichment on cognitive dysfunction, prefrontal cortex development, and inflammatory cytokines after early life stress:

- Prefrontal Cortex Effects of Enrichment After Maternal Separation. *Dev. Psychobiol.*, **58**, 482–491.
- Droste, S.K., de Groote, L., Atkinson, H.C., Lightman, S.L., Reul, J.M.H.M., & Linthorst, A.C.E. (2008) Corticosterone Levels in the Brain Show a Distinct Ultradian Rhythm but a Delayed Response to Forced Swim Stress. *Endocrinology*, **149**, 3244–3253.
- Du, J., Wang, Y., Hunter, R., Wei, Y., Blumenthal, R., Falke, C., Khairova, R., Zhou, R., Yuan, P., & Machado-Vieira, R. (2009) Dynamic regulation of mitochondrial function by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **106**, 3543–3548.
- Duncan, P.J., Tabak, J., Ruth, P., Bertram, R., & Shipston, M.J. (2016) Glucocorticoids Inhibit CRH/AVP-Evoked Bursting Activity of Male Murine Anterior Pituitary Corticotrophs. *Endocrinology*, **157**, 3108–3121.
- Eiland, L. & Romeo, R.D. (2013) Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience*, **249**, 162–171.
- Evanson, N.K., Tasker, J.G., Hill, M.N., Hillard, C.J., & Herman, J.P. (2010) Fast Feedback Inhibition of the HPA Axis by Glucocorticoids Is Mediated by Endocannabinoid Signaling. *Endocrinology*, **151**, 4811–4819.
- Fleshner, M., Deak, T., Spencer, R.L., Laudenslager, M.L., Watkins, L.R., & Maier, S.F. (1995) A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. *Endocrinology*, **136**, 5336–5342.
- Francis, D. (1999) Nongenomic Transmission Across Generations of Maternal Behavior and Stress Responses in the Rat. *Science*, **286**, 1155–1158.
- Gawryluk, J.W., Wang, J.-F., Andreatza, A.C., Shao, L., & Young, L.T. (2011) Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **14**, 123–130.
- Glorieux, C. & Calderon, P.B. (2017) Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol. Chem.*, **398**, 1095–1108.
- Góth, L. & Nagy, T. (2013) Inherited catalase deficiency: Is it benign or a factor in various age related disorders? *Mutat. Res. Mutat. Res.*, **753**, 147–154.
- Griess, B., Tom, E., Domann, F., & Teoh-Fitzgerald, M. (2017) Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer. *Free Radic. Biol. Med.*, **112**, 464–479.
- Gummow, B.M., Scheys, J.O., Cancelli, V.R., & Hammer, G.D. (2006) Reciprocal Regulation of a Glucocorticoid Receptor-Steroidogenic Factor-1 Transcription Complex on the

- Dax-1* Promoter by Glucocorticoids and Adrenocorticotrophic Hormone in the Adrenal Cortex. *Mol. Endocrinol.*, **20**, 2711–2723.
- Gutteridge, J.M.C. & Halliwell, B. (2018) Mini-Review: Oxidative stress, redox stress or redox success? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **502**, 183–186.
- Gysin, R., Kraftsik, R., Sandell, J., Bovet, P., Chappuis, C., Conus, P., Deppen, P., Preisig, M., Ruiz, V., Steullet, P., Tomic, M., Werge, T., Cuenod, M., & Do, K.Q. (2007) Impaired glutathione synthesis in schizophrenia: Convergent genetic and functional evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 16621–16626.
- Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine. 5th ed. Oxford: Oxford University Press; 2015.
- Headlam, H.A. & Davies, M.J. (2004) Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. *Free Radic. Biol. Med.*, **36**, 1175–1184.
- 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. *Front. Neuroendocrinol.*, **24**, 151–180.
- Ho, Y.-S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A., & Ho, D.S. (2004) Mice Lacking Catalase Develop Normally but Show Differential Sensitivity to Oxidant Tissue Injury. *J. Biol. Chem.*, **279**, 32804–32812.
- Holzerova, E., Danhauser, K., Haack, T.B., Kremer, L.S., Melcher, M., Ingold, I., Kobayashi, S., Terrile, C., Wolf, P., Schaper, J., Mayatepek, E., Baertling, F., Friedmann Angeli, J.P., Conrad, M., Strom, T.M., Meitinger, T., Prokisch, H., & Distelmaier, F. (2016) Human thioredoxin 2 deficiency impairs mitochondrial redox homeostasis and causes early-onset neurodegeneration. *Brain*, **139**, 346–354.
- Huot, R. (2004) Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology*, **29**, 279–289.
- Huot, R., K., T., Meaney, M., & Plotsky, P. (2001) Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl.)*, **158**, 366–373.
- Huot, R.L., Plotsky, P.M., Lenox, R.H., & McNamara, R.K. (2002) Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res.*, **950**, 52–63.

- Ishida, A., Mutoh, T., Ueyama, T., Bando, H., Masubuchi, S., Nakahara, D., Tsujimoto, G., & Okamura, H. (2005) Light activates the adrenal gland: Timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab.*, **2**, 297–307.
- Jeanneteau, F.D., Lambert, W.M., Ismaili, N., Bath, K.G., Lee, F.S., Garabedian, M.J., & Chao, M.V. (2012) BDNF and glucocorticoids regulate corticotrophin-releasing hormone (CRH) homeostasis in the hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **109**, 1305–1310.
- Jensen Peña, C., Monk, C., & Champagne, F.A. (2012) Epigenetic Effects of Prenatal Stress on 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 in the Placenta and Fetal Brain. *PLoS ONE*, **7**, e39791.
- Juszczak, G.R. & Stankiewicz, A.M. (2018) Glucocorticoids, genes and brain function. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **82**, 136–168.
- Kalinichev, M., Easterling, K.W., Plotsky, P.M., & Holtzman, S.G. (2002) Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long–Evans rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **73**, 131–140.
- Kalsbeek, A., Van Heerikhuizen, 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 Vasopressin V1Antagonist. *J. Neurosci.*, **16**, 5555–5565.
- Kaltschmidt, B., Uherek, M., Wellmann, H., Volk, B., & Kaltschmidt, C. (1999) Inhibition of NF- κ B potentiates amyloid beta-mediated neuronal apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 9409–9414.
- Kokoszka, J.E., Coskun, P., Esposito, L.A., & Wallace, D.C. (2001) Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 2278–2283.
- Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S.F., Flügge, G., Korte, S.M., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M., & Fuchs, E. (2011) Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **35**, 1291–1301.
- Kovalovsky, D., Refojo, D., Liberman, A.C., Hochbaum, D., Pereda, M.P., Coso, O.A., Stalla, G.K., Holsboer, F., & Arzt, E. (2002) Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol. Endocrinol.*, **16**, 1638–1651.

- Kwon, J., Lee, S.-R., Yang, K.-S., Ahn, Y., Kim, Y.J., Stadtman, E.R., & Rhee, S.G. (2004) Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 16419–16424.
- Lavoie, S., Murray, M.M., Deppen, P., Knyazeva, M.G., Berk, M., Boulat, O., Bovet, P., Bush, A.I., Conus, P., Copolov, D., Fornari, E., Meuli, R., Solida, A., Vianin, P., Cuénod, M., Buclin, T., & Do, K.Q. (2008) Glutathione Precursor, N-Acetyl-Cysteine, Improves Mismatch Negativity in Schizophrenia Patients. *Neuropsychopharmacology*, **33**, 2187–2199.
- Lee, E.E., Eyler, L.T., Wolkowitz, O.M., Martin, A.S., Reuter, C., Kraemer, H., & Jeste, D.V. (2016) Elevated plasma F2-isoprostane levels in schizophrenia. *Schizophr. Res.*, **176**, 320–326.
- Levine, S. (1994) The Ontogeny of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. The Influence of Maternal Factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **746**, 275–288.
- Lezoualc'h, F., Sagara, Y., Holsboer, F., & Behl, C. (1998) High Constitutive NF- κ B Activity Mediates Resistance to Oxidative Stress in Neuronal Cells. *J. Neurosci.*, **18**, 3224–3232.
- Liu, D. (1997) Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. *Science*, **277**, 1659–1662.
- Liu, D., Diorio, J., Day, J.C., Francis, D.D., & Meaney, M.J. (2000) Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat. Neurosci.*, **3**, 799–806.
- Lu, S.C. (2013) Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, **1830**, 3143–3153.
- Lucca, G., Comim, C.M., Valvassori, S.S., Réus, G.Z., Vuolo, F., Petronilho, F., Dal-Pizzol, F., Gavioli, E.C., & Quevedo, J. (2009) Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochem. Int.*, **54**, 358–362.
- Ma, M.W., Wang, J., Zhang, Q., Wang, R., Dhandapani, K.M., Vadlamudi, R.K., & Brann, D.W. (2017) NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders. *Mol. Neurodegener.*, **12**, 7.
- Macrì, S., Chiarotti, F., & Würbel, H. (2008) Maternal separation and maternal care act independently on the development of HPA responses in male rats. *Behav. Brain Res.*, **191**, 227–234.
- Mairesse, J., Lesage, J., Breton, C., Bréant, B., Hahn, T., Darnaudéry, M., Dickson, S.L., Seckl, J., Blondeau, B., Vieau, D., Maccari, S., & Viltart, O. (2007) Maternal stress alters endocrine function of the fetoplacental unit in rats. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.*, **292**, E1526–E1533.

- Manevich, Y., Sweitzer, T., Pak, J.H., Feinstein, S.I., Muzykantov, V., & Fisher, A.B. (2002) 1-Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxidation-mediated membrane damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 11599–11604.
- Marrocco, I., Altieri, F., & Peluso, I. (2017) Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 1–32.
- McCormick, C.M. & Mathews, I.Z. (2007) HPA function in adolescence: Role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **86**, 220–233.
- McEwen, B.S. (1998) Stress, Adaptation, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **840**, 33–44.
- McEwen, B.S., Eiland, L., Hunter, R.G., & Miller, M.M. (2012) Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. *Neuropharmacology*, **62**, 3–12.
- McEwen, B.S., Gray, J.D., & Nasca, C. (2015) 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: Redefining neuroendocrinology: stress, sex and cognitive and emotional regulation. *J. Endocrinol.*, **226**, T67–T83.
- McIntosh, J., Anisman, H., & Merali, Z. (1999) Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Dev. Brain Res.*, **113**, 97–106.
- McIntosh, L.J., Hong, K.E., & Sapolsky, R.M. (1998) Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Res.*, **791**, 209–214.
- McMaster, A., Jangani, M., Sommer, P., Han, N., Brass, A., Beesley, S., Lu, W., Berry, A., Loudon, A., Donn, R., & Ray, D.W. (2011) Ultradian Cortisol Pulsatility Encodes a Distinct, Biologically Important Signal. *PLoS ONE*, **6**, e15766.
- McQueen, G., Lally, J., Collier, T., Zelaya, F., Lythgoe, D.J., Barker, G.J., Stone, J.M., McGuire, P., MacCabe, J.H., & Egerton, A. (2018) Effects of N-acetylcysteine on brain glutamate levels and resting perfusion in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl.)*, **235**, 3045–3054.
- Milne, G.L., Dai, Q., & Roberts, L.J. (2015) The isoprostanes—25 years later. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, **1851**, 433–445.
- Mocelin, R., Herrmann, A.P., Marcon, M., Rambo, C.L., Rohden, A., Bevilaqua, F., de Abreu, M.S., Zanatta, L., Elisabetsky, E., Barcellos, L.J.G., Lara, D.R., & Piato, A.L. (2015) N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **139**, 121–126.

- Morris, G., Anderson, G., Dean, O., Berk, M., Galecki, P., Martin-Subero, M., & Maes, M. (2014) The Glutathione System: A New Drug Target in Neuroimmune Disorders. *Mol. Neurobiol.*, **50**, 1059–1084.
- Morrow, J.D., Hill, K.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F., & Roberts, L.J. (1990) A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**, 9383–9387.
- Muller, F.L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004) Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *J. Biol. Chem.*, **279**, 49064–49073.
- Murakami, K., Murata, N., Noda, Y., Tahara, S., Kaneko, T., Kinoshita, N., Hatsuta, H., Murayama, S., Barnham, K.J., Irie, K., Shirasawa, T., & Shimizu, T. (2011) SOD1 (Copper/Zinc Superoxide Dismutase) Deficiency Drives Amyloid β Protein Oligomerization and Memory Loss in Mouse Model of Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.*, **286**, 44557–44568.
- Murgatroyd, C., Patchev, A.V., Wu, Y., Micale, V., Bockmühl, Y., Fischer, D., Holsboer, F., Wotjak, C.T., Almeida, O.F.X., & Spengler, D. (2009) Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat. Neurosci.*, **12**, 1559–1566.
- Myers, B., McKlveen, J.M., & Herman, J.P. (2012) Neural Regulation of the Stress Response: The Many Faces of Feedback. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **32**, 683–694.
- Nader, N., Chrousos, G.P., & Kino, T. (2009) Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. *FASEB J.*, **23**, 1572–1583.
- Nakamura, K., Fujiwara, Y., Mizutani, R., Sanbe, A., Miyauchi, N., Hiroyama, M., Yamauchi, J., Yamashita, T., Nakamura, S., Mori, T., Tsujimoto, G., & Tanoue, A. (2008) Effects of Vasopressin V1b Receptor Deficiency on Adrenocorticotropin Release from Anterior Pituitary Cells in Response to Oxytocin Stimulation. *Endocrinology*, **149**, 4883–4891.
- Nylander, I. & Roman, E. (2013) Is the rodent maternal separation model a valid and effective model for studies on the early-life impact on ethanol consumption? *Psychopharmacology (Berl.)*, **229**, 555–569.
- Pacak, K. & Palkovits, M. (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.*, **22**, 502–548.

- Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I.J., & Goldstein, D.S. (1998) Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **275**, R1247–R1255.
- Pajovic, S.B., Peji, S., Stojiljkovi, V., Gavrilovi, L., Dronjak, S., & Kanazir, D.T. (2006) Alterations in Hippocampal Antioxidant Enzyme Activities and Sympatho-Adrenomedullary System of Rats in Response to Different Stress Models **55**, 8.
- Parvin, R., Saito-Hakoda, A., Shimada, H., Shimizu, K., Noro, E., Iwasaki, Y., Fujiwara, K., Yokoyama, A., & Sugawara, A. (2017) Role of NeuroD1 on the negative regulation of Pomc expression by glucocorticoid. *PloS One*, **12**, e0175435.
- Patki, G., Solanki, N., Atrooz, F., Allam, F., & Salim, S. (2013) Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Res.*, **1539**, 73–86.
- Prevatto, J.P., Torres, R.C., Diaz, B.L., Silva, P.M.R. e, Martins, M.A., & Carvalho, V.F. (2017) Antioxidant Treatment Induces Hyperactivation of the HPA Axis by Upregulating ACTH Receptor in the Adrenal and Downregulating Glucocorticoid Receptors in the Pituitary. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 1–10.
- Putnam, C.D., Arvai, A.S., Bourne, Y., & Tainer, J.A. (2000) Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism. *J. Mol. Biol.*, **296**, 295–309.
- Qian, X., Droste, S.K., Lightman, S.L., Reul, J.M.H.M., & Linthorst, A.C.E. (2012) Circadian and Ultradian Rhythms of Free Glucocorticoid Hormone Are Highly Synchronized between the Blood, the Subcutaneous Tissue, and the Brain. *Endocrinology*, **153**, 4346–4353.
- Radley, J.J., Arias, C.M., & Sawchenko, P.E. (2006) Regional Differentiation of the Medial Prefrontal Cortex in Regulating Adaptive Responses to Acute Emotional Stress. *J. Neurosci.*, **26**, 12967–12976.
- Rau, V., DeCola, J.P., & Fanselow, M.S. (2005) Stress-induced enhancement of fear learning: An animal model of posttraumatic stress disorder. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **29**, 1207–1223.
- Ritter, S., Watts, A.G., Dinh, T.T., Sanchez-Watts, G., & Pedrow, C. (2003) Immunotoxin Lesion of Hypothalamically Projecting Norepinephrine and Epinephrine Neurons Differentially Affects Circadian and Stressor-Stimulated Corticosterone Secretion. *Endocrinology*, **144**, 1357–1367.

- Rossi, R., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Lusini, L., Colombo, R., & Simplicio, P.D. (2002) Blood Glutathione Disulfide: In Vivo Factor or in Vitro Artifact? *Clin. Chem.*, **48**, 742–753.
- Roth, T.L., Lubin, F.D., Funk, A.J., & Sweatt, J.D. (2009) Lasting Epigenetic Influence of Early-Life Adversity on the BDNF Gene. *Biol. Psychiatry*, **65**, 760–769.
- Russell, J., Anjaneyulu, M., & Berent-Spillson, A. (2008) Metabotropic Glutamate Receptors (mGluRs) and Diabetic Neuropathy. *Curr. Drug Targets*, **9**, 85–93.
- Sakellariou, G.K., Davis, C.S., Shi, Y., Ivannikov, M.V., Zhang, Y., Vasilaki, A., Macleod, G.T., Richardson, A., Van Remmen, H., Jackson, M.J., McArdle, A., & Brooks, S.V. (2014) Neuron-specific expression of CuZnSOD prevents the loss of muscle mass and function that occurs in homozygous CuZnSOD-knockout mice. *FASEB J.*, **28**, 1666–1681.
- Sandi, C. & Haller, J. (2015) Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nat. Rev. Neurosci.*, **16**, 290–304.
- Santos, P., Herrmann, A.P., Benvenutti, R., Noetzold, G., Giongo, F., Gama, C.S., Piato, A.L., & Elisabetsky, E. (2017) Anxiolytic properties of N -acetylcysteine in mice. *Behav. Brain Res.*, **317**, 461–469.
- Sapolsky, R.M. & Meaney, M.J. (1986) Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res. Rev.*, **11**, 65–76.
- Sawchenko, P.E., Swanson, L.W., & Vale, W.W. (1984) Co-expression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, 1883–1887.
- Sayin, V.I., Ibrahim, M.X., Larsson, E., Nilsson, J.A., Lindahl, P., & Bergo, M.O. (2014) Antioxidants Accelerate Lung Cancer Progression in Mice. *Sci. Transl. Med.*, **6**, 221ra15.
- Schiavone, S., Sorce, S., Dubois-Dauphin, M., Jaquet, V., Colaianna, M., Zotti, M., Cuomo, V., Trabace, L., & Krause, K.-H. (2009) Involvement of NOX2 in the Development of Behavioral and Pathologic Alterations in Isolated Rats. *Biol. Psychiatry*, **66**, 384–392.
- Schmidt, M.V., Levine, S., Alam, S., Harbich, D., Sterlemann, V., Ganea, K., de Kloet, E.R., Holsboer, F., & Müller, M.B. (2006) Metabolic Signals Modulate Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activation During Maternal Separation of the Neonatal Mouse. *J. Neuroendocrinol.*, **18**, 865–874.
- Selye, H. (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, **138**, 32.

- Selye, H. (1951) The general-adaptation-syndrome. *Annu. Rev. Med.*, **2**, 327–342.
- Shams, M., Kilby, M.D., Somerset, D.A., Howie, A.J., Gupta, A., Wood, P.J., Afnan, M., & Stewart, P.M. (1998) 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, **13**, 799–804.
- Shim, S.-Y., Kim, H.-S., Kim, E.-K., & Choi, J.-H. (2012) Expression of peroxiredoxin 1, 2, and 6 in the rat brain during perinatal development and in response to dexamethasone. *Free Radic. Res.*, **46**, 231–239.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D.P. (2017) Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 715–748.
- Slotten, H.A., Kalinichev, M., Hagan, J.J., Marsden, C.A., & Fone, K.C.F. (2006) Long-lasting changes in behavioural and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: Gender-dependent effects. *Brain Res.*, **1097**, 123–132.
- Son, G.H., Chung, S., Choe, H.K., Kim, H.-D., Baik, S.-M., Lee, H., Lee, H.-W., Choi, S., Sun, W., Kim, H., Cho, S., Lee, K.H., & Kim, K. (2008) Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **105**, 20970–20975.
- Sousa, B.C., Pitt, A.R., & Spickett, C.M. (2017) Chemistry and analysis of HNE and other prominent carbonyl-containing lipid oxidation compounds. *Free Radic. Biol. Med.*, **111**, 294–308.
- Spiga, F. & Lightman, S.L. (2015) Dynamics of adrenal glucocorticoid steroidogenesis in health and disease. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **408**, 227–234.
- Stavreva, D.A., Wiench, M., John, S., Conway-Campbell, B.L., McKenna, M.A., Pooley, J.R., Johnson, T.A., Voss, T.C., Lightman, S.L., & Hager, G.L. (2009) Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1093–1102.
- Steele, M.L., Fuller, S., Patel, M., Kersaitis, C., Ooi, L., & Münch, G. (2013) Effect of Nrf2 activators on release of glutathione, cysteinylglycine and homocysteine by human U373 astroglial cells. *Redox Biol.*, **1**, 441–445.
- Sterley, T.-L., Baimoukhametova, D., Füzesi, T., Zurek, A.A., Daviu, N., Rasiah, N.P., Rosenegger, D., & Bains, J.S. (2018) Social transmission and buffering of synaptic changes after stress. *Nat. Neurosci.*, **21**, 393–403.
- Sterling, P. & Eyer, J. (1988) Handbook of Life Stress, Cognition and Health Edited by S. Fisher and J. Reason Copyright 1988 John Wiley & Sons.

- Steullet, P., Neijt, H.C., Cuénod, M., & Do, K.Q. (2006) Synaptic plasticity impairment and hypofunction of NMDA receptors induced by glutathione deficit: Relevance to schizophrenia. *Neuroscience*, **137**, 807–819.
- Tang, V., Young, A., Tan, H., Beasley, C., & Wang, J.-F. (2013) Glucocorticoids Increase Protein Carbonylation and Mitochondrial Dysfunction. *Horm. Metab. Res.*, **45**, 709–715.
- Tanoue, A., Ito, S., Honda, K., Oshikawa, S., Kitagawa, Y., Koshimizu, T., Mori, T., & Tsujimoto, G. (2004) The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J. Clin. Invest.*, **113**, 302–309.
- Taverne, Y.J., Merkus, D., Bogers, A.J., Halliwell, B., Duncker, D.J., & Lyons, T.W. (2018) Reactive Oxygen Species: Radical Factors in the Evolution of Animal Life: A molecular timescale from Earth’s earliest history to the rise of complex life. *BioEssays*, **40**, 1700158.
- Taylor, S.E., Klein, L.C., Lewis, B.P., Gruenewald, T.L., Gurung, R.A.R., & Updegraff, J.A. (2000) Biobehavioral responses to stress in females: Tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychol. Rev.*, **107**, 411–429.
- Terada, Y., Okura, Y., Kikusui, T., & Takenaka, A. (2011) Dietary Vitamin E Deficiency Increases Anxiety-Like Behavior in Juvenile and Adult Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1894–1899.
- Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Valle, N.R.-D., & Huang, P. (2008) Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxid. Redox Signal.*, **10**, 1343–1374.
- Tractenberg, S.G., Levandowski, M.L., de Azeredo, L.A., Orso, R., Roithmann, L.G., Hoffmann, E.S., Brenhouse, H., & Grassi-Oliveira, R. (2016) An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **68**, 489–503.
- Ulrich-Lai, Y.M. & Herman, J.P. (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**, 397–409.
- Uysal, N., Gonenc, S., Acikgoz, O., Pekçetin, Ç., Kayatekin, B.M., Sonmez, A., & Semin, I. (2005) Age-dependent effects of maternal deprivation on oxidative stress in infant rat brain. *Neurosci. Lett.*, **384**, 98–101.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., & Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 44–84.

- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, **160**, 1–40.
- Van Pett, K., Viau, V., Bittencourt, J.C., Chan, R.K., Li, H.-Y., Arias, C., Prins, G.S., Perrin, M., Vale, W., & Sawchenko, P.E. (2000) Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J. Comp. Neurol.*, **428**, 191–212.
- Waite, E.J., McKenna, M., Kershaw, Y., Walker, J.J., Cho, K., Piggins, H.D., & Lightman, S.L. (2012) Ultradian corticosterone secretion is maintained in the absence of circadian cues: Regulation of ultradian corticosterone secretion. *Eur. J. Neurosci.*, **36**, 3142–3150.
- Walker, C.L., Pomatto, L.C.D., Tripathi, D.N., & Davies, K.J.A. (2018) Redox Regulation of Homeostasis and Proteostasis in Peroxisomes. *Physiol. Rev.*, **98**, 89–115.
- Weaver, I.C.G. (2005) Reversal of Maternal Programming of Stress Responses in Adult Offspring through Methyl Supplementation: Altering Epigenetic Marking Later in Life. *J. Neurosci.*, **25**, 11045–11054.
- Weaver, I.C.G., Cervoni, N., Champagne, F.A., D'Alessio, A.C., Sharma, S., Seckl, J.R., Dymov, S., Szyf, M., & Meaney, M.J. (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.*, **7**, 847–854.
- Winterbourn, C.C. & Stern, A. (1987) Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. *J. Clin. Invest.*, **80**, 1486–1491.
- Wu, Y., Patchev, A.V., Daniel, G., Almeida, O.F.X., & Spengler, D. (2014) Early-Life Stress Reduces DNA Methylation of the Pomc Gene in Male Mice. *Endocrinology*, **155**, 1751–1762.
- Yu, T., Robotham, J.L., & Yoon, Y. (2006) Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**, 2653–2658.
- Zafir, A. & Banu, N. (2009) Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress*, **12**, 167–177.
- Zaidi, S.M.K.R. & Banu, N. (2004) Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin. Chim. Acta*, **340**, 229–233.
- Zhang, X., Wang, B., Jin, J., An, S., Zeng, Q., Duan, Y., Yang, L., Ma, J., & Cao, X. (2014) Early deprivation reduced anxiety and enhanced memory in adult male rats. *Brain Res. Bull.*, **108**, 44–50.

- Zhao, R., Masayasu, H., & Holmgren, A. (2002) Ebselen: A substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 8579–8584.
- Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T., & Kizek, R. (2012) Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncol. Lett.*, **4**, 1247–1253.
- Zucchi, F.C.R., Yao, Y., Ward, I.D., Ilnytsky, Y., Olson, D.M., Benzie, K., Kovalchuk, I., Kovalchuk, O., & Metz, G.A.S. (2013) Maternal Stress Induces Epigenetic Signatures of Psychiatric and Neurological Diseases in the Offspring. *PLoS ONE*, **8**, e56967.