

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Stresová odpověď na srdeční katetrizaci.
Koncentrace stresových markerů hypothalamo-hypofyzární-adrenální osy

Mgr. Hana Skarlandtová (roz. Kotalová)

2014

Doktorské studijní programy v biomedicín

Univerzita Karlova v Praze a Akademie v d České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie lov ka

P edseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

TMkolicí pracovi-t : Fyziologický ústav 1. LF UK v Praze

TMkolitel: Prof. MUDr. Otomar Kittnar CSc., MBA

Diserta ní práce bude nejmén p t pracovních dn p ed konáním obhajoby zve ejn na k nahlífení ve ejnosti v ti-t né podob na Odd lení pro v deckou innost a zahrani ní styky D kanátu 1. léka ské fakulty.

Obsah

Abstrakt.....	1
Abstract.....	2
1. Literární úvod.....	3
1.1 Obecná charakteristika stresu a stresové reakce.....	3
1.2 Charakteristika glukokortikoidů, mechanismy jejich působení a způsoby regulace ..	3
1.2.1 Cyklické změny glukokortikoidů	4
1.3 Dehydroepiandrosteron (DHEA), dehydroepiandrosteronsulfát (DHEAS).....	5
1.4 Vliv operativního výkonu a anestezie na hladinu stresových hormonů u prasat domácích	6
2. Cíle a hypotézy.....	7
3. Metodika experimentu	8
3.1 Pokusná zvířata.....	8
3.2 Experimenty.....	8
3.2.1 Anestezie a použitá medikace.....	8
3.2.2 Srdeční katetrizace	9
3.2.3 Odběr krve	9
3.2.4 Popis experimentu a statistické zpracování výsledků	10
4. Výsledky	11
4.1 Experiment 1.....	11
4.2 Experiment 2.....	11
4.2.1 Kortizol.....	11
4.2.2 Kortizon.....	11
4.2.3 DHEA.....	11
4.2.4 DHEAS.....	12
4.3 Experiment 3.....	12
4.3.1 Kortizol.....	12
4.3.2 Kortizon.....	12
4.3.3 DHEA.....	12
4.3.4 DHEAS.....	12
4.4 Experiment 4: Zjištění poměru kortizol/kortizon	12
5. Diskuze	13
5.1 Experiment 1.....	13
5.2 Experiment 2 a 3.....	14
5.3 Experiment 4: Zjištění poměru kortizol/kortizon	15
6. Závěr	16
6.1 Experiment 1.....	16
6.2 Experiment 2 a 3.....	16
6.3 Experiment 4.....	16
7. Seznam zkratk.....	17
8. Seznam citované literatury.....	17
9. Vlastní publikace autora	23
9.1 Publikace v impaktovaných časopisech zahrnuté do disertační práce.....	23
9.2 Publikace v neimpaktovaných časopisech zahrnuté do disertační práce	23
9.3 Publikace nezahrnuté do disertační práce vztahující se k jejímu tématu	23

Abstrakt

V predkládané práci se ná-tým zabýval stresem p i srde ní katetrizaci, kde byla provád na bu stimulace nebo ablace p evodního srde ního systému v celkové anestezii, na modelovém druhu prasete domácího (*Sus scrofa domestica*).

V pr b hu experimentu byla zji- ována hladina stresových marker - kortizolu, kortizonu, dehydroepiandrosteronu a jeho sulfátu óDHEA(S). Tyto markery byly stanoveny z krevního séra, které bylo odebráno p i p edem ur ených situacích b hem každé katetrizace. První odb r byl odebírán je-t na farm , druhý po uvedení do anestezie, t etí po stimulaci nebo ablaci p evodního systému srde ního a tvrtý po ukon ení experimentu. Kortizol a kortizon byly stanoveny metodou HPLC, DHEA(S) komer ními kity. Výsledky byly statisticky zpracovány neparametrickými testy (data nevykazovala normální rozd lení dle Gausse).

Stru n lze experimenty shrnout takto: 1. Stanovení diurnálního rytmu u marker b hem katetriza ního výkonu, 2. Li-í se hladiny stresových marker nam ených b hem katetrizace s bazální hladinou? 3. Li-í se hladiny stresových marker v pr b hu opera ního výkonu? 4. Zji- ní pom ru kortizol/kortizon.

V prvním experimentu nevy-la statistická závislost na denní dob ($p > 0.05$) pro fládný z marker . U experimentu 2 byl Friedman v test pro sledované markery statisticky významný, pro kortizol a DHEAS na hladin významnosti $p < 0.05$, pro kortizon a DHEA na hladin významnosti $p < 0.001$. Pro experiment 3 byl test statisticky významný na hladin $p < 0.05$ pro kortizol a kortizon, pro DHEA(S) byl zvolený test nevýznamný. U tvrtého experimentu byl Friedman v test statisticky signifikantní na hladin významnosti 0.001 ($p < 0.001$).

Hladiny marker se nelily u odb r provád ných ráno a odpoledne, oproti na-ím p edpoklad m nevykazovaly tedy p edpokládaný diurnální rytmus. Vysv tlujeme si to nízkým v kem prasat, která je-t nem la pevn ustavený diurnální rytmus. U experimentu 2 a 3 byla první hladina u každého markeru vldy nejniší, m fleme jí tedy ozna it za bazální, v pr b hu experimentu se pak hladiny m nily statisticky významn , korespondovaly s uvedením prasat do anestezie (pokles kortizolu, naopak zvý-ení kortizonu a DHEA(S)). Pom r kortizol/kortizon je nejvy-í u prvního odb ru, poté klesá. P edpokládáme, fle je to tak proto, fle vysoká hladina kortizolu náhle klesne a musí být v t le konvertována na kortizon, zvý-uje se tedy aktivita enzymu 11 -HSD2.

Abstract

In our study, we analyzed four stress markers (cortisol, cortisone, DHEA and DHEAS) in blood serum in young sows using minimally invasive heart catheterisation as the stress factor.

The marker levels were assessed in four defined periods of the experiment, beginning with the baseline level on the day before intervention (1), the second period was after the introduction of anaesthesia (2), the third was after conducting tissue stimulation or ablation (3), and the final period was after the end of the catheterisation (4). Cortisol and cortisone were detected using HPLC method, DHEA(S) by commercial kits. For statistical analyses non-parametric tests were used (due to non standard Gaussian data distribution).

In our study we arranged these experiments: 1. Diurnal variability in these markers concentration during heart catheterisation was tested. 2. Are there differences between stress markers concentration the day before experiment (sampling 1) and in the day of the catheterisation (samplings 2, 3, 4)? 3. Are there differences between these markers concentration during operation (the first sampling was excluded)? 4. The cortisol/cortisone ratio was calculated.

We found only minimal statistical differences in studied markers between the morning and afternoon group ($p > 0.05$) in experiment 1. For tested markers was Friedman test statistically significant for cortisol and DHEAS ($p < 0.05$), for cortisone and DHEA $p < 0.001$. Experiment 3: For cortisol and cortisone was $p < 0.05$, for DHEA(S) there were statistical differences only minimal ($p > 0.05$) in experiment 2 and 3. Friedman test was statistically significant, $p < 0.001$ in experiment 4.

Conclusions: Experiment 1: The absence of circadian variation in GCs levels could originate either at an early age of our experimental pigs or in stressful conditions on the experiment day or most likely the day before (e.g. social isolation, fasting, transport, and catheterisation), respectively. We can conclude there is no difference in the stress load between morning and afternoon experiments. Experiment 2 and 3: The first stress markers level was the lowest; therefore we could conclude this concentration is the basal level. Then levels of all markers increased and statistically significant changed. After anaesthesia induction cortisol decreased, cortisone, DHEA(S) increased, it corresponds to anaesthesia effect. Cortisone, DHEA and DHEAS acted as balanced system against the stress injurious effect Experiment 4: Cortisol/cortisone ratio was the highest the day before experiment, then decreased. We suppose cortisol concentration suddenly decreased, 11 β -HSD2 activity increased and changed cortisol to cortisone.

1. Literární úvod

1.1 Obecná charakteristika stresu a stresové reakce

Problematice stresu a jeho působení na organismus je v současné době v nově značně pozornost jak v humánní a veterinární medicíně, tak i v zoologických oborech.

U medicínských odborníků mohou znalosti pomoci při snižování stresu například při běžných operacích, pooperační péči a pod.

Pokud je organismus vystaven působení stresoru (–kodlivému nebo nepředvídatelnému podnětu), spustí se stresová odpověď. Jde o komplex nespecifických fyziologických, hormonálních a behaviorálních odpovědí, který má za úkol ochránit jedince před vlivy stresoru (Fleshner et al. 1995, Orchinik 1998, Möstl a Palme 2002, Romero 2004, Young et al. 2004). Odpověď na stres obvykle vede ke změnám endokrinních a metabolických pochodů v organismu a probíhá jak na úrovni jednotlivých buněk, tak i na úrovni organismu jako celku. Tyto reakce jsou vysoce konzervativní a probíhají u většiny taxonů obratlovců včetně lidí jednotně.

U savců aktivuje působení stresoru dvě osy: sympato-adreno-medulární (SAM) a hypothalamo-hypofyzární-adrenální (HPA). SAM osa stimuluje produkci katecholaminů (adrenalinu a noradrenalinu) z dřeně nadledvin a je řízena hlavně sympatickým nervovým systémem. Je tedy velmi rychlá, adrenalin (resp. noradrenalin) je vyloučen během vteřin nebo minut. Druhou stresovou osou je HPA osa, která má dva různé spouštěcí mechanismy. Paraventriculární jádro hypothalamu vylučuje kortikoliberin (CRF - corticotropin releasing factor, někdy označován jako CRH - corticotropin releasing hormone), který putuje do předního laloku hypofýzy. Hypofýza vylučuje ACTH (adrenokortikotropní hormon), který krevním řečištěm putuje k nadledvinám a stimuluje jejich produkci glukokortikoidů (GC).

1.2 Charakteristika glukokortikoidů, mechanismy jejich působení a způsoby regulace

Glukokortikoidy (kortizol, kortikosteron) jsou steroidní hormony produkované krou nadledvin, mají důležitou úlohu v kontrole metabolismu téměř všech tkání v organismu, patří mezi stresové hormony.

Glukokortikoidy jsou biologicky aktivní pouze pokud mají na svém jedenáctém uhlíku navázanou hydroxylovou skupinu (kortizol, kortikosteron). Kortizon je také vytvářen krou nadledvin, místo hydroxylové skupiny na C-11 obsahuje keto-skupinu, která změní charakter molekuly na hydrofilní a zneomolní tak pro nízkou buněčnou membránou.

Kortizon vytváří zásobní pool kortizolu pro případy, kdy je potřeba zvýšená koncentrace kortizolu (např. při stresové reakci nebo diurnálním rytmem). Volné GC jako malé lipofilní molekuly prochází buněčnou membránou a váže se na intracelulární receptory. V buňkách se nacházejí dva typy receptorů schopných vázat GC, mineralokortikoidní (MR) a glukokortikoidní (GR). MR má velkou afinitu jak pro mineralokortikoidy (aldosteron), tak pro glukokortikoidy. GR má velkou afinitu jen pro GC. MR dokáže rozpoznat GC od aldosteronu a v nich kterých tkáních váže především aldosteron, například v distálním tubulu, slinných žlázách, potních žlázách a v kolonu. To je možné díky dalším regulačním faktorům, enzymu 11 β -HSD (11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza). Tato rozdílná afinita vede k hypotéze, že MR jsou optimalizovány pro odpověď při bazálních hladinách GC, kdežto GR pro hladiny GC v jejich zvýšené koncentraci, tedy když jsou MR plně saturovány (např. diurnální rytmus nebo stres) (Orchinik 1998, Perreau et al. 1999, Romero 2004). Komplex GC-receptor vstupuje do buněčného jádra, kde působí jako transkripční faktor.

Dalším regulačním faktorem, který kontroluje množství GC dostupné pro buněčné receptory, je enzym 11 β -HSD, který se objevuje ve dvou izoformách: 11 β -HSD1, která působí jako reduktáza a 11 β -HSD2, která má dehydrogenázovou aktivitu. 11 β -HSD1 se vyskytuje hlavně ve strukturách mozku (v mozečku, hippokampu, hypofýze, hypotalamu nebo kůře), 11 β -HSD2 se v mozku dospělého jedince téměř nevyskytuje, ale svou dalším rolí má v mozku vyvíjejícího se plodu (Seckl 1997). 11 β -HSD1 katalyzuje redukci GC na 11. uhlíku a mění tak inaktivní keto-deriváty GC na jejich aktivní formu. Naopak působí 11 β -HSD2, která mění aktivní GC na jejich inaktivní formy. Exprese 11 β -HSD1 je regulována během stresu a zvýšené koncentrace GC, kdy má mozek ochránit před nepříznivými vlivy působením GC. 11 β -HSD2 ochraňuje MR před navázáním GC v místech, kde má být především navázán aldosteron, například v ledvinách (Brown et al. 1996, Seckl 1997), nebo v jiných orgánech, které by mohlo nadměrné množství GC poškodit, například ovaria nebo Leydigovy buňky v testech (Seckl 1997, Michael et al. 2003, Sharp et al. 2007, Honda et al. 2008). Tato izoforma se vyskytuje také v placentě, kde má za úkol ochránit plod před vysokou koncentrací GC a zabránit tak přenosu mateřských GC k plodu (Brown et al. 1996, Seckl 1997, Yang 1997, Klemcke et al. 2003).

1.2.1 Cyklické změny glukokortikoid

Hladiny GC podléhají cyklickým změnám, a to jak sezónním, tak diurnálním. Sezónní výkyvy mohou být dány zvýšenou kompeticí (např. o zdroje potravy, úkryty nebo sexuální partnery) (Romero 2002, Huber et al. 2003, Boonstra 2004). Diurnální variabilita pak souvisí především

s aktivitou jedince - nejvyšší hladiny GC jsou přítomny v období těsně před počátkem aktivity, nejnižší ve spánku. Druhy s denní aktivitou mají tedy vyšší hladiny GC za svítání, druhy s noční aktivitou naopak za soumraku, nejnižší hladiny jsou pak před usnutím (Barnett et al. 1981 a,b, Becker et al. 1985 a, b, Horký 1985, Bradbury et al. 1994, Kramer a Sothorn 2001, Young et al. 2004).

Prasata domácí patří k živočišům s denní aktivitou, proto mají nejvyšší hladinu glukokortikoidů ráno. Cirkadiální rytmy se utvářejí v průběhu ontogeneze; u mladých jedinců nebyl diurnální rytmus zaznamenán, objevuje se až během puberty, u prasat je to ve věku 15 týdnů (von Borell a Ladewig 1992, deJong et al. 2000). Dospělá zvířata mají rytmus již plně stabilní, u prasat toto nastává ve věku okolo 20 týdnů (Ruis et al. 1997). Cirkadiální rytmus může být ovlivněn stresem a může být v období zvýšeného stresu potlačen nebo může dokonce úplně vymizet.

S diurnální variabilitou je třeba počítat i při plánování pokusů, protože ke zvýšení hladin GC nemusí dojít vlivem stresu, ale jen jejich přirozeným diurnálním rytmem.

1.3 Dehydroepiandrosteron (DHEA), dehydroepiandrosteronsulfát (DHEAS)

Tyto steroidní hormony jsou tvořeny buď v nadledvinách, gonádách, placentě nebo v centrální nervové soustavě jako neurosteroidy. DHEA je konvertován na DHEAS působením sulfotransferázy v kůži nadledvin, játrech a tenkém střevě. DHEAS je hlavní cirkulující formou a působí jako zásobní pool DHEA. DHEAS patří k hojně zastoupeným cirkulujícím steroidům v plazmě. DHEA má široké spektrum účinku, je to slabý androgen a působí jako prekurzor androgenů i estrogenů. DHEA i DHEAS mají pozitivní efekt na učení a paměť.

DHEA(S) může působit jak přes intracelulární, tak i membránové receptory. Mezi membránové receptory, na které DHEA(S) působí patří například GABA_A (receptory kyseliny -aminomáselné), NMDA (*N*-methyl *D*-aspartát receptory), β_1 , apod.

DHEA(S) je produkován také placentou a působí tak na plod. Koncentrace těchto steroidů jsou závislé na věku, po narození je hladina vysoká, pak klesá do pěti let věku, kdy koncentrace opět začíná růst. Nejvyšší hladiny jsou mezi 20.-30. rokem věku, poté se koncentrace snižuje (u mužů i u žen) (Baulieu a kol. 2000, Goodyer et al. 2001, Gartside et al. 2010). DHEA(S) je, stejně jako kortizol, vyplavován i zvýšeným množstvím CRH a ACHT, tedy při akutním stresu (např. Nieschlag et al. 1973). Na rozdíl od kortizolu ale vyšší hladiny DHEA(S) přetrvávají i při dlouhodobém působení stresoru (tedy i při chronickém stresu).

Stejně jako hladiny kortizolu je hladina DHEA(S) ukazatelem aktivity HPA osy (např. Goodyer et al. 2001, Maninger et al. 2010).

DHEA(S) má antiglukokortikoidní účinky, působí tedy jako protiváha negativních vlivů stresu (Kimonides et al. 1998, 1999, Morgan et al. 2004, Maninger et al. 2009, 2010).

Podobně jako kortizol vykazuje DHEA(S) také diurnální variabilitu. Nejvyšší hladiny jsou zaznamenávány ráno, v průběhu dne potom klesají. U mladších jedinců byl zaznamenán výrazný cirkadiánní rytmus, u starších osob s poklesem hladin DHEA(S) pak klesala i intenzita cirkadiánní variability, ať vymizela úplně (Ceresini et al. 2000, Whetzel et al. 2010, Maninger et al. 2010).

1.4. Vliv operačního výkonu a anestezie na hladinu stresových hormonů u prasat domácích

V našem experimentu byl použit minimálně invazivní operační výkon, srdeční katetrizace. Mnoho studií porovnávalo použití otevřeného chirurgického výkonu s jeho minimálně invazivní variantou u prasat domácích, autoi ne zaznamenali statisticky významný rozdíl v hladinách glukokortikoidů (např. Mansour et al. 1992, Bessler et al. 1994, Burpee et al. 2002, Margulis et al. 2005, Matsumoto et al. 2005, Duchene et al. 2008). To znamená, že i neinvazivní zákrok vede ke zvýšení GC.

Anestezie se používá ke zmírnění dopadu operačního výkonu na pacienta, obecně dochází ke snížení vyplavení stresových hormonů a tím pádem potlačení negativních účinků stresové reakce na stres během chirurgického výkonu. V našem případě jsme používali kombinaci Propofolu a Morfinu.

Propofol se používá spolu s opiátem (např. Sufentanil, Remifentanil, Morfin, apod.) k nitrofilní anestezii (total intravenous anesthesia, TIVA). Kombinace Propofolu a opiátu snižovala vyplavení katecholaminů i glukokortikoidů do krevního řečiště a naměřené hladiny tak byly dokonce nižší než před operací (Fragen et al. 1987, Schricker et al. 1999, 2000, Ihn et al. 2009) než u inhalační anestezie (např. Schricker et al. 2000, Ledowski et al. 2005, Ihn et al. 2009, Kostopanagiotou et al. 2010), přičemž opiáty mají tyto účinky výrazněji než propofol (Schricker et al. 2000). Propofol snižuje aktivitu HPA osy, dochází tedy nejen ke snížení produkce a sekrece kortizolu, ale i ACTH a CRH.

2. Cíle a hypotézy

V této práci jsme si stanovili následující cíle:

1. Stanovit hladiny stresových marker (kortizolu, kortizonu, DHEA a DHEAS) u modelového druhu prasete domácího z krevního séra.
2. Optimalizovat nařazování odběr krve pro detekci marker a určit situace, které by mohly mít na hladinu stresových marker vliv a stanovit tak protokol pro odběr krevních vzorků během stresové zátěže.
3. Porovnat hladiny stresových marker u katetrizačních výkonů prováděných v dopoledních a odpoledních hodinách a zjistit tak, zda není narušen cirkadiánní rytmus vyplavování těchto markerů.
4. Porovnat hladinu studovaných markerů během srdeční katetrizace s hodnotami odebranými na domácí farmě v nestresových podmínkách.
5. Porovnat stresové markery v průběhu srdeční katetrizace, v předem stanovených situacích, které by mohly mít vliv na hladinu stresových hormonů.
6. Zjistit hodnotu poměru kortizol/ kortizon v průběhu katetrizačního experimentu a zjistit tak aktivitu enzymu 11 β -HSD.
7. Zjistit, zda plánovaná, minimálně invazivní, srdeční katetrizace má vliv na HPA osu a následné vyčerpání vyplavení GC krou nadledvin. Tato změna by mohla pomoci zlepšit plánovaný kardiologický výkon ve veterinární i lidské medicíně (například správným nařazením experimentu).

Hypotézy:

Při naší práci jsme očekávali tyto hypotézy:

1. Prase domácí patří mezi druhy s aktivitou během dne, předpokládali jsme, že se bude hladina GC lišit u operací prováděných během dopoledne a odpoledne. Předpokládali jsme vyšší hladinu u dopoledních odběrů, což by korespondovalo s nálezy u zvířat s denní aktivitou.
2. Odběr, který jsme odebírali v nestresových podmínkách domácího prostředí, by měl být nejnižší. U dalších odběrů jsme předpokládali nárůst těchto koncentrací oproti bazálním hladinám prvního odběru.
3. Srdeční katetrizace patří mezi minimálně invazivní operační výkony, ale i tyto vedou ke spuštění stresové reakce. Předpokládali jsme, že dojde k předpokládanému růstu hladiny stresových markerů během katetrizace.

4. Zjistíme poměr kortizol/kortizon jsme chtěli stanovit míru steroidogeneze v kůře nadledvin a zároveň aktivitu 11 β -HSD, která má nízkou poměr mezi těmito dvěma steroidy. Předpokládali jsme zvýšenou tvorbu kortizolu oproti kortizonu (v porovnání s nestresovými hladinami, ne absolutní koncentrace) v průběhu stresové reakce.

3. Metodika experiment

3.1 Pokusná zvířata

Jako modelový druh jsme použili samice prasete domácího (*Sus scrofa domestica*) v prepubertálním věku, konkrétně křížence plemen Landrace a Velké bílé. Prasata pocházela z farmy Agro Jesenice a.s., chovné stanice Radějovice (RH CZ-21045103), kde byla chována podle standardních chovných norem.

3.2. Experimenty

Všechny experimenty prováděné na prasatech domácích na našem pracovišti byly prováděny v souladu se zákony a nařízeními platnými v ČR i EU spojenými s prací a výzkumem na zvířecích modelech. Experimenty byly posouzeny etickou komisí I.LF UK a byly jí schváleny jako vyhovující všem platným předpisům.

Délka trvání experimentu byla přibližně shodná pro všechna experimentální zvířata. Zvířata byla na chovné farmě před experimentem oddělena do samostatného kotce, a nebylo jim podáváno krmění. V den experimentu byla převezena do naší laboratoře, kde byla hodinu ponechána v klidu, poté premedikována, uspána a zaintubována (přibližně půl hodiny po premedikaci), poté byl prováděn vlastní operační výkon. Od začátku premedikace ke skončení operace proběhlo průměrně 2,5 hodiny na jedno zvíře. Experiment skončil usmrcením zvířete. Možné odchylky jsou samozřejmě možné, kvůli komplikacím při zákroku, nebyly však žádné.

3.2.1 Anestezie a použitá medikace

K premedikaci a sedaci byl použit Stresnil (azaperon) v dávce 5mg/kg, Atropin (atropin sulfát) v dávce 0,05 mg/kg a Narcetan (ketaminhydrochlorid) v dávce 14 mg/kg s intramuskulárním podáním (IM).

Pro zajištění intravenózního (IV) přístupu byla použita 18G nebo 20G IV kanyla do hlavní ušní žíly.

Pro uvedení do anestezie byl použit jako bolus 1% Propofol v dávce 2mg/kg a Morfin (1% morfini hydrochloridum trihydricum) v dávce 2mg/kg.

Poté bylo prase zaintubováno pod přímou laryngoskopickou kontrolou. K intubaci byla použita 7 nebo 7.5 mm orotracheální trubice (velikost byla zvolena podle velikosti prasete).

Anestezie byla udržována kontinuálním podáváním Propofolu (v dávce 4mg/kg) IV infuzí. Jako analgetikum byl podáván morfin (v dávce 0,2 mg/kg) jako IV bolus každou hodinu probíhající anestezie.

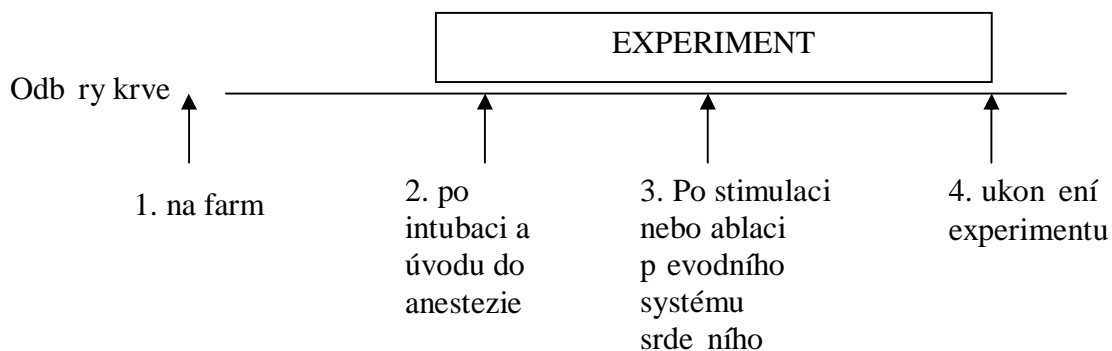
Ventilace byla udržována na průměrném objemu 8-10 ml/kg, počet dechů byl 15/min.

3.2.2 Srdeční katetrizace

Srdeční katetrizace byla bilaterální, pravo a levostranná, prováděná standardním katetrizačním postupem (vstup přes arteria a vena femoralis s použitím 7-9F sheetu). Katetrizace byla prováděna jako součást rozsáhlejších elektrofyziologických pokusů, u kterých byla používána elektrická stimulace a radiofrekvenční ablace plovodního systému srdce.

3.2.3 Odběr krve

Krev jsme odebírali z jugulární žíly ve čtyřech předem stanovených situacích experimentu. První odběr proběhl na domácí farmě (předpokládáme nestresové podmínky), další odběry následovaly vždy 10 minut po úkonu, kde jsme předpokládali výkyv v hladině markerů (druhý odběr po intubaci a uvedení do anestezie, třetí odběr po srdeční stimulaci nebo ablaci tkáně plovodního systému srdce a čtvrtý po ukončení experimentu, těsně před usmrcením zvířete). Pro názornost je vytvořeno schéma (obr. 1)



Obr. 1: Schématické zobrazení odběru testovaných markerů

Pro vyšetření bylo zapotřebí odebrat 10 ml krve, k testování bylo použito krevní sérum. Markery byly stanoveny v Endokrinologickém ústavu v Praze (oddělení steroidů a proteofaktorů), kortizol a kortizon metodou HPLC, DHEA(S) komerčními radiometrickými kity.

3.2.4 Popis experiment a statistické zpracování výsledk

3.2.5.1 Experiment 1

Pokusná zvířata (n=23) byla rozdělena do dvou skupin, podle denní doby, kdy podstupovala experimentální výkon. Do skupiny zvířat katetrizovaných ráno (za úteku pokusu v 9:00), bylo zařazeno 13 prasat, do skupiny odpoledních (za úteku pokusu v 15:00) 10.

Experiment se týká jen, zda se liší ranní a odpolední skupiny katetrizovaných prasat, ne týká dynamiku změny markerů v celkovém průběhu experimentu.

Získané hodnoty testovaných markerů byly rozděleny do dvou skupin, podle denní doby, ve které byla prováděna katetrizace. Pro každou skupinu zvlášť byl proveden nezávislý statistický test, kterým byla zjištěna základní statistická data (medián, maximum, minimum naměřených hodnot) pro každý marker v každém testovacím období (odbor 1-4). Pro statistické zpracování byl použit neparametrický Mann-Whitney test pro dva nezávislé výběry (pro ranní a odpolední testovací skupinu) pro každý marker a pro každý odbor zvlášť.

3.2.5.2 Experiment 2

K tomuto experimentu bylo použito 25 testovaných samic prasat. Díky tomuto experimentu jsme mohli zjistit dynamiku změny testovaných markerů v průběhu experimentu a zhodnotit tak vliv jednotlivých úkonů na hladinu markerů. Ke statistickému zpracování byl použit neparametrický Friedmanův test pro 4 závislé výběry (pro 4 odbory v pět různých situacích, viz metodika odboru krevního vzorku). Odbory během operace (odbor 2-4) byly porovnávány s odborem v předpokládaných nestresových podmínkách (1. odbor).

3.2.5.3 Experiment 3

K tomuto experimentu bylo použito 25 prasat, metodika byla stejná jako u experimentu 2, jen se porovnávaly získané hodnoty jen během katetrizačního výkonu (tedy bez prvního odboru). Získali jsme tím představu, zda se statisticky liší hladiny markerů pouze během operace. Byl použit neparametrický Friedmanův test pro 3 závislé výběry (odbor 2-4), první odbor se tedy do testu nepočítal.

3.2.5.4 Experiment 4

Poměr kortizol/kortizon byl počítán pro každé experimentální zvíře zvlášť, byl zjištěn medián, minimum a maximum z naměřených hodnot. V některých případech byly hladiny kortizonu nulové, a proto tedy neel poměr kortizol/kortizon vypočítat (proto se počet naměřených hodnot u pokusných zvířat liší v jednotlivých odborech; pro 1. odbor n=18, pro 2. a 3. odbor n= 25, pro 4. n= 21). Pro zjištění statistické významnosti byl použit neparametrický Friedmanův test pro každý parametr pro 4 závislé výběry.

4. Výsledky

4.1. Experiment 1

Naměná data vykazovala široké rozpětí hodnot, které měly být pro největší interindividuální rozdíly v hladinách měřených markerů.

Statistické rozdíly Mann-Whitneyova testu mezi ranní a odpolední skupinou zvířat v každé fázi experimentu byly jen minimální ($p > 0.05$) a to pro každý ze sledovaných markerů. Nenalezli jsme tedy u našich zvířat cirkadiální rytmus u žádného z markerů.

4.2 Experiment 2

Stejně jako u předchozího experimentu, vykazují naměřené hodnoty velký rozptyl, což ukazuje na značné interindividuální rozdíly hladin testovaných markerů.

4.2.1 Kortizol

Hladiny kortizolu v séru byly nejnižší při prvním odběru, tedy na domácí farmě, v nestresových podmínkách (148.35 nmol/l), výsledek potvrdil naše očekávání a tuto hodnotu můžeme považovat opravdu za nestresovou, bazální. V druhé fázi experimentu, po uvedení do anestezie, jsme zaznamenali nejvyšší hodnoty mediánu (246.41 nmol/l), poté již hodnoty kortizolu klesaly a šly ke svým nejnižším hodnotám u tvrdého odběru, a šly k hodnotám velmi blízkým hodnotám bazálním. Friedmanův test byl pro tyto 4 odběry statisticky významný ($p < 0.05$).

4.2.2 Kortizon

Stejně jako u kortizolu, byla nejnižší koncentrace kortizonu zaznamenána u prvního odběru, provedeného ještě na domácí farmě (6.19 nmol/l). U druhého a třetího odběru hladiny rostly a šly ke svému maximum během třetí fáze experimentu (66.12 nmol/l), poté hladiny klesaly, ale ne k bazálním hodnotám, naměřené hodnoty byly přibližně sedmkrát vyšší než bazální. Friedmanův test byl statisticky významný ($p < 0.001$).

4.2.3 DHEA

Nejnižší hladiny DHEA v krevním séru jsme zaznamenali na začátku experimentu (0.15 nmol/l), poté hladiny prudce stoupaly a šly ke svému maximum ve tvrdé části katetrizačního výkonu, těsně před ukončením experimentu (0.76 nmol/l). Friedmanův test byl statisticky významný ($p < 0.001$).

4.2.4 DHEAS

Mediány koncentrace DHEAS byly pibližně stejné po celou dobu experimentu, nejnižší hladiny byly zaznamenány při prvním odběru, pak lehce stouply a v dalším průběhu experimentu zůstaly neměnné (0.09 nmol/l). Friedmanův test vyšel statisticky signifikantní ($p < 0.05$).

4.3 Experiment 3

4.3.1 Kortizol

Nejvyšší hodnoty byly naměřeny ve druhé fázi experimentu, poté hodnoty klesaly. Předpokládáme, že se tak dělo díky vlivu anestézie, která tlumí stresovou reakci. Friedmanův test byl statisticky významný ($p < 0.05$). Samotný katetrizační výkon má tedy statisticky významný vliv na hladinu kortizolu.

4.3.2 Kortizon

Od druhého odběru hladina kortizonu vzrostla a u třetího odběru dosáhla maxima (66.12 nmol/l), poté hladiny klesaly až k nejnižší hodnotě (v rámci odběru 2-4) u odběru na závěr experimentu. Friedmanův test byl na hladině významnosti 0.05 statisticky signifikantní.

4.3.3 DHEA

V rámci druhé a čtvrté fáze experimentu byly mediány koncentrace DHEA velmi podobné, vzrůstaly od druhé části experimentu až ke svému maximu v závěrečné fázi experimentu. Friedmanův test neprokázal statistickou významnost na dané hladině signifikance ($p > 0.05$). Operační výkon tedy nemá statisticky významný vliv na hladinu DHEA v krevním séru naměřených experimentálních zvířat.

4.3.4 DHEAS

U tohoto markeru byly mediány v průběhu operačního výkonu téměř stejné, ani statisticky se nelišily ($p > 0.05$). Katetrizační výkon tedy nemá statisticky významný vliv na hladinu DHEAS.

4.4 Experiment 4: Zjištění poměru kortizol/kortizon

Stejně jako u předchozích experimentů byl hodnocen medián. Medián poměru byl nejvyšší u prvního odběru experimentu, tedy v nestresových podmínkách (15.95), poté prudce klesal a nejnižší hodnoty byly zaznamenány na konci experimentu (2.51). Friedmanův test byl statisticky významný ($p < 0.001$)

5. Diskuze

5.1. Experiment 1

Je dobře známo, že prasata domácí vykazují cirkadiální rytmus v koncentracích kortizolu (např. Barnett et al. 1981 a, b, Becker et al. 1985 a, b, Griffith a Minton 1991). Patí mezi zvířata, která jsou aktivní přes den, tedy mají vyšší hladinu GC v ranních hodinách, pak během dne postupně klesá, až ke svému minimu před usnutím; proto jsme očekávali vyšší hladiny GC během ranního experimentu v porovnání s odpoledním. Podobně jako kortizol vyazuje diurnální rytmus i DHEA(S), s nejvyššími hladinami ráno, v průběhu dne potom klesají (např. Ceresini et al. 2000, Whetzel et al. 2010, Maninger et al. 2010). V našem experimentu jsme ale žádný takový trend nezaznamenali.

Moffné zvířata jsme rozdělili do dvou skupin: první (1) nespojené se stresem a (2) spojené se stresovým zatížením. Druhou skupinu pak je moffné ještě rozdělili do několika podskupin: (2.1) stáhnutí do neznámého prostředí a následná sociální izolace, (2.2) hladovění, (2.3) transport z farmy do experimentální laboratoře, (2.4) katetrizace srdce.

Moffnou nestresovou příčinou absence cirkadiálního rytmu ve sledovaných markerech, může být nízký, prepubertální, věk prasnic. To je podpořeno i jinými studiemi, které u mláďat prasat domácích (15 týdnů starých) nezaznamenali cirkadiální rytmus (např. von Borell a Ladewig 1992, Ruis et al. 1997, deJong et al. 2000). Stejně tak, našli stabilní cirkadiální rytmus s maximem v ranních hodinách a minimem večer, u prasat starších nejméně 20 týdnů (Ruis et al. 1997, deJong et al. 2000).

V druhé skupině (důvodem absence cirkadiálního rytmu spojené se stresovou reakcí) je moffných zvířat několik. Předpokládá se, že zvýšená hladina GC při stresové reakci, může narušit nebo úplně zrušit diurnální rytmus.

Na chovné farmě byla den před experimentem prasata separována do samostatného kotce, byla tedy vystavena stresu ze stáhnutí do nového prostředí (Dantzer a Morméde 1983, Becker et al. 1985a, Grandin 1997, Désautés et al. 1999) i z izolace od domácí skupiny (Janssens et al. 1994, Ekkel et al. 1997, Ruis et al. 1997) a byla jim odebrána potrava (Geverink et al. 2003), všechno toto jsou situace, které zvyšují stres a mohou narušit cirkadiální rytmus. V den experimentu jsou prasata transportována do laboratoře, to patí mezi další stresové situace (Becker et al. 1985b).

Dalším z moffných stresorů je samozřejmě srdeční katetrizace, kterou zvířata podstoupila. Ta bude diskutována v následujícím oddíle diskuze (5.2), který se srdeční katetrizací zabývá podrobněji.

Po zvážení všech zmíněných skutečností se kloníme k závěru, že absence cirkadiálního rytmu je způsobena především nevyzrálostí HPA osy u našich prepubertálních experimentálních zvířat. Cirkadiální rytmus může být také ovlivněn procedurami, kterými zvířata prošlo den před experimentem, ale nezaznamenali jsme významné statistické rozdíly mezi hladinami GC u zvířat podstupujících katetrizaci ráno a odpoledne v průběhu operačního výkonu ani u bazálních hladin získaných den před experimentem. Samotná srdeční katetrizace teoreticky může mít negativní vliv na diurnální rytmus, ale doba, po kterou katetrizace probíhá je příliš krátká na vyvolání nestability celého cirkadiálního rytmu.

5.2 Experiment 2 a 3

Experimenty 2 a 3 bych ráda diskutovala zároveň, vzhledem k povaze obou experimentů, kdy se liší jen nezázámením jednoho odběru do statistického hodnocení.

Nejnižší hodnotu u všech parametrů jsme předpokládali u prvního odběru, protože zvířata byla umístěna v podmínkách, na které jsou běžně zvyklá. Výsledky náš předpoklad potvrdily, proto máme hodnotu odběru na farmě považovat za bazální, tedy nezatíženou zvýšeným akutním stresem zvířat. Očekávali jsme, že poté bude hladina stresových markerů (především kortizolu) stoupat a bude vyšší v průběhu celého katetrizačního pokusu. Vzhledem k tomu, že nejvyšší hladina byla u druhého odběru (po uvedení do anestezie a následné intubaci) a poté hladina kortizolu klesala až k hodnotám blízkým bazálním, je pravděpodobné, že do procesu regulace HPA osy zasáhly úkony, které modulují (případně narušují) její činnost (například anestezie a medikace tlumící bolest při výkonu). Naměřené hladiny GC byly v některých případech dokonce nižší než ty, naměřené před operací (Fragen et al. 1987, Schricker et al. 1999, 2000, Ihn et al. 2009). Také v našem případě hladiny GC klesaly po podání anestezie až k hodnotám blízkým prvnímu odběru (který tedy považujeme za bazální), výsledek je tedy v souladu se zmíněnými pracemi. Naopak koncentrace kortizonu a DHEA(S) také vzrostly po druhé fázi experimentu, ale ke svým bazálním hladinám se nevrátily. Proto předpokládáme, že tyto steroidy mají za úkol chránit organismus před zvýšenou hladinou kortizolu, a tak před neřádnými vlivy akutního stresu (Kimonides et al. 1998, 1999, Morgan et al. 2004, Maninger et al. 2009, 2010).

Prasata podstupovala experimentální srdeční katetrizaci. Je to zákrok, který patří mezi méně invazivní, což by mohlo vést k závěru, že hladiny GC vzrostou jen minimálně. Když byly porovnány zákroky (prováděné na prasatech domácích), kde byl použit klasický přístup a přístup laparoskopický (či jiný méně invazivní), nenalezly se žádné statisticky významné rozdíly v hladině GC (Mansour et al. 1992, Bessler et al. 1994, Burpee et al. 2002, Margulis et

al. 2005, Matsumoto et al. 2005, Duchene et al. 2008). To znamená, že i minimálně zatížení způsobí záchvat je pro zvířata stresující a znamená zvýšení hladiny kortizolu v krvi, která může mít za následek nestabilitu cirkadiálního rytmu. Zde je ale důležité zmínit, že hladiny GC mohou být během operace modulovány dalšími parametry (např. zvolenou anestezií, medikací zmírňující bolest, apod.) (Marana et al. 2008).

Koncentrace DHEA(S) je, stejně jako u kortizolu, zvýšená při stresové zátěži a reaguje tedy také na zvýšenou koncentraci CRH a ACTH, proto jsou také považovány za markery aktivity HPA osy (Goodyer et al. 2001, Maninger et al. 2010). Kortizon funguje jako rezervní pool kortizolu v případě jeho zvýšené potřeby (např. při změnách koncentrace kortizolu provázející cirkadiální rytmus, nebo jako v našem případě při stresové zátěži organismu) (Vogeser et al. 2003). Koncentrace kortizonu v tomto pokusu byla nejnižší při prvním odběru a poté rostla, až dosáhla svého maxima u této části pokusu, pak se hodnoty snížily, ale byly mnohonásobně vyšší než hodnoty bazální. Pokud hodnotíme dynamiku změny koncentrací kortizolu a kortizonu, lze předpokládat, že díky zvýšené aktivitě isoenzymu 11 β -HSD2 (důležitým regulačním faktorem přeměny kortizolu v kortizon a naopak), je vyšší hladina kortizonu (oproti bazálním hladinám na počátku experimentu) způsobena nejspíše rapidním snížením koncentrace kortizolu v průběhu samotného operačního výkonu po podání anestezie. Kortizol, který byl ve zvýšené míře vyplaven v této praseťce před začátkem experimentu a je nyní v jejich organismu tedy špičkový je enzymaticky přeměněn na kortizon, který není biologicky aktivní. Tím je vlivem anestezie zabráněno neřádným vlivům působení kortizolu a tím i akutního stresu.

5.3 Experiment 4: Zjištění poměru kortizol/kortizon

Poměr kortizol/kortizon reguluje isoenzym 11 β -HSD, který přeměňuje pomocí redukce kortizon v kortizol (11 β -HSD1) a naopak oxidací mění kortizol v kortizon (11 β -HSD2).

V případě tohoto experimentu byl poměr hormonů kortizol/kortizon nejvyšší v nestresových podmínkách prvního odběru, poté poměr klesal až k závěru experimentu, kdy byl tento poměr nejnižší. Předpokládáme, že nejdůležitějším vlivem je podání anestezie a analgezie, které minimalizuje bolest a tím i stresovou reakci organismu. Koresponduje to s náhlým snížením hladiny kortizolu a tím pádem zvýšené hladiny kortizonu během našeho experimentu. Předpokládáme, že zvýšená hladina kortizonu je způsobena zvýšenou aktivitou 11 β -HSD2 a kortizol, který byl secernován ve zvýšené míře musí být najednou inaktivován, tím pádem přeměněn na kortizon (Vogeser et al. 2003).

6. Závěr

6.1. Experiment 1

Koncentrace měřených markerů mezi skupinami, které podstupovaly srdeční katetrizaci ráno a odpoledne, se neližily statisticky významně ($p > 0.05$), a to v řádné části experimentu; nenalezli jsme tedy předpokládaný cirkadiánní rytmus u těchto starých samic prasat domácích. Předpokládáme, že největší podíl na absenci cirkadiánního rytmu má nevyzrállost HPA osy a že tedy cirkadiánní rytmus neměla na ně zvířata ještě pevně stabilní a funkční. Výsledky ale mohou naznačovat také skutečnost, že stresová zátěž není vyvíjena u ranních nebo odpoledních katetrizací a nařazování operace není tedy limitujícím faktorem u plánovaných srdečních katetrizačních výkonů.

6.2 Experiment 2 a 3

Pro všechny markery byla naměřena nejnižší hladina u prvního odběru, který byl odebrán ještě na domácí chovné farmě; mohli jsme je tedy označit za bazální, prasata nejsou tedy v domácích podmínkách vystavena stresu. Po tomto odběru hodnoty všech markerů rostou až k jejich maximu. Můžeme předpokládat, že adrenální sekrece kortizolu reaguje na úkony, které předcházejí vlastní katetrizaci a jsou pro zvířete stresující. Proto jsme naměřili největší hladinu kortizolu po uvedení zvířete do anestezie. Poté anestezie zmírnila stresovou reakci a hladina kortizolu klesala až k bazálním hladinám v závěru experimentu. Předpokládáme, že ostatní měřené markery (kortizon, DHEA(S)) působí jako protiváha zvýšené hladiny kortizolu a zmírňují tak jeho účinky na organismus, jako protiváha akutnímu stresu, kterému je zvířete během experimentu vystaveno.

6.3 Experiment 4

Poměr kortizol/kortizon byl největší během prvního odběru (koncentrace kortizolu a kortizonu byly v tomto odběru nejnižší), poté poměr klesal až do svého minima u posledního testovaného odběru (koncentrace kortizolu byla blízká hladině bazální, koncentrace kortizonu byla 7x větší než bazální hladina). Předpokládáme, že poměr koresponduje s naším závěrem, který jsme provedli již u předchozích experimentů (2 a 3), totiž, že hladina kortizolu, která prudce stoupla během druhé části experimentu a po podání anestezie a analgezie klesala, musí být zvýšenou aktivitou enzymu 11 β -HSD2 konvertována na inaktivní kortizon.

7. Seznam zkratek

11 -HSD - 11 -hydroxysteroid dehydrogenáza

ACTH - adrenokortikotropní hormon

CRF, CRH ó kortikoliberin (corticotrophin releasing factor/hormone)

DHEA - dehydroepiandrosteron

DHEAS ó dehydroepiandrosteron sulfát

GABA_A receptor - receptor kyseliny -aminomáselné

GC ó glukokortikoidy

GR - glukokortikoidní receptor

HPA ó hypothlamo- hypofyzární- adrenální systém

HPLC ó High performace liquid chromatography

IM ó intramuskulární

IV ó intravenózní

MR ó mineralokortikoidní receptor

NMDA receptor - *N*-methyl *D*-aspartát receptor

SAM ó sympato-adreno.medulární systém

TIVA ó nitrofilní anestezie (total intravenous anesthesia)

8. Seznam citované literatury

- Barnett, J .L., Winfield, C. G., Cronin, G. M., Makin, A. W. (1981a) Effects of photoperiod and feeding on plasma corticosteroid concentrations and maximum corticosteroid-binding capacity in pigs. *Aust. J. Biol. Sci.* **34**, 577-85.
- Barnett, J.L., Cronin, G.M., Winfield, C.G. (1981b) The effects of individual and group penning of pigs on total and free plasma corticosteroids and the maximum corticosteroid binding capacity. *Gen. Comp. Endocrinol.* **44**, 19-25.
- Baulieu, E.E., Thomas, G., Legrain, S., Lahlou, N., Roger, M., Debuire, B., Fauconneau, V., Girard, L., Hervy, M.P., Latour, F., Leaud, M.C., Mokrane, A., Pitti-Ferrandi, H., Trivalle, C., De Lacharriere, O., Nouveau, S., Rakoto-Arison, B., Souberbielle, J.C., Riaon, J., Le Bouc, Y., Raynaud, A., Girered, X., Forette, F.(2000) Dehydroepiandrosterone (DHEA), DHEA sulfate, and aging: contribution of the DHEAge Study to a sociobiomedical issue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4279-4284.
- Becker, B. A., Ford, J. J., Christenson, R. K., Manak, R. C., Hahn, G. L., DeShazer, J. A. (1985a) Cortisol response of gilts in tether stalls. *J. Anim. Sci.* **60**, 264-270.

- Becker, B. A., Nienaber, J. A., DeShazer, J. A., Hahn, G. L. (1985b) Effect of transportation on cortisol concentrations and on the circadian rhythm of cortisol in gilts. *Am. J. Vet. Res.* **46**, 1457-1459.
- Bessler, M., Whelan, R. L., Halverson, A., Treat, M. R., Nowygrad, R. (1994) Is immune function better preserved after laparoscopic versus open colon resection? *Surg. Endosc.* **8**, 881-883.
- Boonstra, R. (2004) Coping with changing northern environments: The role of the stress axis in birds and mammals. *Integr. Comp. Biol.* **44**, 956-1008.
- Bradbury, M. J., Akana, S. F., Dallman, M. F. (1994) Roles of type I and II corticosteroid receptors in regulation of basal activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during the diurnal trough and the peak: evidence for a nonadditive effect of combined receptor occupation. *Endocrinology* **134**, 1286-1296.
- Brown, R.W., Diaz, R., Robson, A.C., Kotelevtsev, Y.V., Mullins, J.J., Kaufman, M.H., Seckl, J.R. (1996) The ontogeny of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action in development. *Endocrinology* **137**, 794-797.
- Burpee, S. E., Kurian, M., Murakame, Y., Benevides, S., Gagner, M. (2002) The metabolic and immune response to laparoscopic versus open liver resection. *Surg. Endosc.* **16**, 899-904.
- Ceresini, G., Morganti, S., Rebecchi, I., Freddi, M., Ceda, G.P., Banchini, A., Solerte, S.B., Ferrari, E., Ablondi, F., Valenti, G. (2000) Evaluation of the circadian profiles of serum dehydroepiandrosterone (DHEA), cortisol, and cortisol/DHEA molar ratio after a single oral administration of DHEA in elderly subjects. *Metabolism*. **49**, 548-551.
- Dantzer, R., Mormède, P. (1983) Stress in farm animals: a need for re-evaluation. *J. Anim. Sci.* **57**, 6-18.
- de Jong, I. C., Prella, I. T., van de Burgwal, J. A., Lambooi, E., Korte, S. M., Blokhuis, H. J., Koolhaas, J. M. (2000) Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs. *Physiol. Behav.* **68**, 571-578.
- Désautés, C., Sarrieau, A., Caritez, J. C., Mormède, P. (1999) Behavior and pituitary-adrenal function in large white and Meishan pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* **16**, 193-205.

- Duchene, D. A., Gallagher, B. L., Ratliff, T. L., Winfield, H. N. (2008) Systemic and cell-specific immune response to laparoscopic and open nephrectomy in porcine model. *J. Endourol.* **22**, 113-120.
- Ekkel, E. D., Savenije, B., Schouten, W. G. P., Wiegant, V. M., Tielen, M. J. M. (1997) The effects of mixing on behavior and circadian parameters of salivary cortisol in pigs. *Physiol. Behav.* **62**, 181-184.
- 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.
- Fragen, R.J., Weiss, H.W., Molteni, A. (1987) The effect of propofol on adrenocortical steroidogenesis: a comparative study with etomidate and thiopental. *Anesthesiology* **66**, 839-42.
- Gartside, S.E., Griffith, N.C., Kaura, V., Ingram, C.D. (2010) The neurosteroid dehydroepiandrosterone (DHEA) and its metabolites alter 5-HT neuronal activity via modulation of GABAA receptors. *J. Psychopharmacol.* **24**, 1717-1724.
- Geverink, N. A., Schouten, W. G. P., Gort, G., Wiegant, V. M. (2003) Individual differences in behaviour, physiology and pathology in breeding gilts housed in groups or stalls. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **81**, 29641.
- Goodyer, I.M., Park, R.J., Netherton, C.M., Herbert, J. (2001) Possible role of cortisol and dehydroepiandrosterone in human development and psychopathology. *Br. J. Psychiatry* **179**, 243-9.
- Grandin, T. (1997) Assessment of stress during handling and transport. *J. Anim. Sci.* **75**, 2496257.
- Griffith, M. K., Minton, J. E. (1991) Free-running rhythms of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol and melatonin in pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* **8**, 201-208.
- Honda, Y., Ohno, S., Nakajin, S. (2008) Leydig cells from neonatal pig testis abundantly express 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD) type 2 and effectively inactivate cortisol to cortisone. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **108**, 91-101.
- Horký K (1985) K ra nadledvin. In: *Stres. Patofyziologie ó endokrinologie ó klinika.* Schreiber V (ed), Avicenum, Praha, 49- 56.

- Huber, S., Palme, R., Arnolda, W. (2003) Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **130**, 486-54.
- Ihn, C.H., Joo, J.D., Choi, J.W., Kim, D.W., Jeon, Y.S., Kim, Y.S., Jung, H.S., Kwon, S.Y. (2009) Comparison of stress hormone response, interleukin-6 and anaesthetic characteristics of two anaesthetic techniques: volatile induction and maintenance of anaesthesia using sevoflurane versus total intravenous anaesthesia using propofol and remifentanyl. *J. Int. Med. Res.* **7**, 1760-71.
- Janssens, C. J. J. G., Helmond, F. A., Wiegant, V. M. (1994) Increased cortisol response to exogenous adrenocorticotrophic hormone in chronically stressed Pigs: influence of housing conditions. *J. Anim. Sci.* **72**, 1771-1777.
- Kimonides, V.G., Khatibi, N.H., Svendsen, C.N., Sofroniew, M.V., Herbert, J. (1998) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **17**, 1852-7.
- Kimonides, V.G., Spillantini, M.G., Sofroniew, M.V., Fawcett, J.W., Herbert, J. (1999) Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures. *Neuroscience* **89**, 429-36.
- Klemcke, H.G., Sampath Kumar, R., Yang, K., Vallet, J.L., Christenson, R.K. (2003) 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and glucocorticoid receptor messenger RNA expression in porcine placentae: effects of stage of gestation, breed, and uterine environment. *Biol. Reprod.* **69**, 1945-1950.
- Kostopanagiotou, G., Kalimeris, K., Christodoulaki, K., Nastos, C., Papoutsidakis, N., Dima, C., Chrelias, C., Pandazi, A., Mourouzis, I., Pantos, C. (2010) The differential impact of volatile and intravenous anaesthetics on stress response in the swine. *Hormones* **9**, 67-75
- Kramer, K. M., Sothorn, R. B. (2001) Circadian characteristics of corticosterone secretion in red-backed voles (*Clethrionomys gapperi*). *Chronobiol. Int.* **18**, 933-945.
- Ledowski, T., Bein, B., Hanss, R., Paris, A., Fudickar, W., Scholz, J., Tonner, P. H. (2005) Neuroendocrine stress response and heart rate variability: a comparison of total intravenous versus balanced anesthesia. *Anesth. Analg.* **101**, 1700-1705.

- Maninger, N., Capitano, J.P., Mason, W.A., Ruys, J.D., Mendoza, S.P. (2010) Acute and chronic stress increase DHEAS concentrations in rhesus monkeys. *Psychoneuroendocrinology*, **35**, 1055-62.
- Maninger, N., Wolkowitz, O.M., Reus, V.I., Epel, E.S., Mellon, S.H. (2009) Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front. Neuroendocrinol.* **30**, 65-91.
- Mansour, M. A., Stiegmann, G. V., Yamamoto, M., Berguer, R. (1992) Neuroendocrine stress response after minimally invasive surgery in pigs. *Surg. Endosc.* **6**, 294-297.
- Marana, E., Scambia, G., Colicci, S., Maviglia, R., Maussier, M. L., Marana, R., Proietti, R. (2008) Leptin and perioperative neuroendocrine stress response with two different anaesthetic techniques. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **52**, 541-546.
- Margulis, V., Matsumoto, E. D., Tunc, L., Taylor, G., Duchenne, D., Cadeddu, J. A. (2005) Effect of warmed, humidified insufflation gas and anti-inflammatory agents on cytokine response to laparoscopic nephrectomy: porcine model. *J. Urol.* **174**, 1452-1456.
- Matsumoto, E. D., Margulis, V., Tunc, L., Taylor, G. D., Duchene, D., Johnson, D. B., Pearle, M. S., Cadeddu, J. A. (2005) Cytokine response to surgical stress: comparison of pure laparoscopic, hand-assisted laparoscopic, and open nephrectomy. *J. Endourol.* **19**, 1140-1145.
- Michael, A.E., Thurston, L.M., Rae, M.T. (2003) Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction*, **126**, 4256441.
- Morgan, C.A. 3rd, Southwick, S., Hazlett, G., Rasmusson, A., Hoyt, G., Zimolo, Z., Charney, D. (2004) Relationships among plasma dehydroepiandrosterone sulfate and cortisol levels, symptoms of dissociation, and objective performance in humans exposed to acute stress. *Arch. Gen. Psychiatry*; **61**, 819-25.
- Möstl, E., Palme, R.(2002) Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* **23**, 67674.
- Nieschlag, E., Loriaux, D.L., Ruder, H.J., Zucker, I.R., Kirschner, M.A., Lipsett, M.B. (1973) The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man. *J. Endocrinol.* **57**, 123-134.
- Orchinik, M. (1998) Glucocorticoids, stress, and behavior: shifting the timeframe. *Horm. Behav.* **34**, 3206327.

- Perreau, V., Sarrieau, A., Mormède, P. (1999) Characterization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in pigs: comparison of Meishan and Large White breeds. *Life Sci.* **64**, 1501-1515.
- Romero, L.M. (2002). Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **128**, 1624.
- Romero, L.M. (2004) Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends. Ecol. Evol.* **19**, 249-255.
- Ruis, M. A. W., Te Brake, J. H. A., Engel, B., Ekkel, E. D., Buist, W. G., Blokhuis, H. J., Koolhaas, J. M. (1997) The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender, and stress. *Physiol. Behav.* **62**, 623-630.
- Schricker, T., Carli, F., Schreiber, M., Wachter, U., Geisser, W., Lattermann, R., Georgieff, M. (2000) Propofol/sufentanil anesthesia suppresses the metabolic and endocrine response during, not after, lower abdominal surgery. *Anesth. Analg.* **9**, 450-455.
- Schricker, T., Klubien, K., Carli, F. (1999) The independent effect of propofol anesthesia on whole body protein metabolism in humans. *Anesthesiology* **90**, 1636-42.
- Seckl, J. R. (1997) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front. Neuroendocrinol.* **18**, 49-99.
- Sharp, V., Thurston, L.M., Fowkes, R.C., Michael, A.E. (2007) 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the testis and male reproductive tract of the boar (*Sus scrofa domestica*) indicate local roles for glucocorticoids in male reproductive physiology. *Reproduction* **134**, 473-482.
- Vogeser, M., Groetzner, J., Küpper, C., Briegel, J. (2003) The serum cortisol:cortisone ratio in the postoperative acute-phase response. *Horm. Res.* **59**, 293-6.
- von Borell, E., Ladewig, J. (1992) Relationship between behaviour and adrenocortical response pattern in domestic pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* **34**, 195-206.
- Whetzel, C.A., Klein, L.C. (2010) Measuring DHEA-S in saliva: time of day differences and positive correlations between two different types of collection methods. *BMC. Res. Notes* **3**, 204.
- Yang, K. (1997) Placental 11 -hydroxysteroid dehydrogenase: barrier to maternal glucocorticoids. *Rev. Reprod.* **2**, 129-132.

- Young, E.A., Abelson, J., Lightman, S.L. (2004) Cortisol pulsatility and its role in stress regulation and health. *Front. Neuroendocrinol.* **25**, 69676.

9. Vlastní publikace autora

9.1 Publikace v impaktovaných časopisech zahrnuté do disertační práce

Skarlandtová H., Bičíková M., Neufil P., Mlček M., Hrachovina V., Svoboda T., Medová E., Kudlíková J., Dohnalová A., Havránek TM, Kazihnítková H., Máčlová L., Kittnar O. Are there any differences between stress hormone levels in non-stress conditions and in potential stress overload (heart catheterisation) in sows? *Physiol. Res.* (in press) (IF: 1,53)

Skarlandtová H., Bičíková M., Neufil P., Mlček M., Hrachovina V., Svoboda T., Medová E., Kudlíková J., Dohnalová A., Havránek TM, Kazihnítková H., Máčlová L., Kittnar O. 2012. Might Cardiac Catheterization Influence Diurnal Rhythm of the Steroid Stress Hormones Secretion? *Physiol. Res.* 61: 25-34 (IF 1,55)

9.2 Publikace v neimpaktovaných časopisech zahrnuté do disertační práce

Skarlandtová H., Bičíková M., Neufil P., Mlček M., Hrachovina V., Svoboda T., Medová E., Kudlíková J., Dohnalová A., Havránek TM, Kazihnítková H., Máčlová L., Kittnar O. 2011. Is there Circadian Variation in Cortisol Levels in Young Sows in Heart Catheterization? *Prague Medical Report*, 112 (3), 1846192.

Skarlandtová H., Fraňková M., Frynta D., Kittnar O. 2010. Stres a stresové hormony u savy. *Československá fyziologie*, 59 (2), 32-36.

9.3 Publikace nezahrnuté do disertační práce vztahující se k jejímu tématu

Frynta D.; Nováková M.; **Kutalová H.**; Palme R.; Sedláček F. 2009. A new apparatus for the collection of fecal samples in undisturbed spiny mice living in a complex social group *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48, 1966201. (IF 0,950)

Nováková M.; Palme R.; **Kutalová H.**; Janský L.; Frynta D. 2008. The effects of sex, age and commensal way of life on levels of fecal glucocorticoid metabolites in spiny mice (*Acomys cahirinus*). *Physiol Behav*, 95, 187-193.