

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



Mgr. Hana Skarlandtová

(roz. Kotalová)

Stresová odpověď na srdeční katetrizaci.

Koncentrace stresových markerů hypothalamo-hypofyzárně-adrenální osy

The stress response to cardiac catheterisation.

The concentration of stress markers of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Otomar Kittnar CSc. MBA

Praha, 2014

Identifikační záznam:

SKARLANDTOVÁ, Hana. *Stresová odpověď na srdeční katetrizaci. Koncentrace stresových markerů hypothalamo-hypofyzárně-adrenální osy [The stress response to cardiac catheterisation. The concentration of stress markers of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis]*. Praha, 2014. Počet stran 110, Příloha 1. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Fyziologický ústav. Školitel Kittnar, Otomar.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 11.06.2014

Mgr. Hana Skarlandtová
(rozená Kutalová)

Poděkování:

Tato práce vznikla v rámci doktorského studijního programu v biomedicíně na Fyziologickém ústavu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli Prof. MUDr. Otomaru Kittnarovi CSc. MBA za odborné vedení mého doktorského studia, za cenné rady a pomoc při vzniku této práce. Dále bych ráda poděkovala členům Experimentální laboratoře srdeční elektrofyzologie Nemocnice na Homolce a 1.LF UK, Ing. Aleně Dohnalové za statistické zpracování výsledků a všem pracovníkům Fyziologického ústavu 1.LF UK za pomoc a podporu při vzniku této práce.

Ráda bych poděkovala také týmu RNDr. Marie Bičíkové (Endokrinologický ústav, oddělení steroidů a proteofaktorů) za laboratorní stanovení koncentrací testovaných markerů.

Velký dík patří i celé mé rodině, bez jejíž podpory a pomoci by tato práce vznikala jen velmi těžko.

Tento projekt byl umožněn díky finančním prostředkům Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze (GA UK) (č. grantu: 259223 118209).

Obsah

Abstrakt	1
Abstract	2
Úvod k disertační práci	3
1. Literární úvod	5
1.1 Obecná charakteristika stresu a stresové reakce	5
1.1.1 Stres	5
1.1.2 Stresová reakce	5
1.2 Charakteristika glukokortikoidů, mechanismy jejich působení a způsoby regulace	8
1.2.1 Cyklické změny glukokortikoidů	11
1.2.2 Vliv ustájení a transportu na hladiny GC	11
1.3. Dehydroepiandrosteron (DHEA), dehydroepiandrosteronsulfát (DHEAS).....	12
1.4. Vliv operačního výkonu a anestezie na hladinu stresových hormonů u prasat domácích	14
1.5 Shrnutí	15
2. Cíle a hypotézy	16
3. Metodika pokusů	18
3.1 Pokusná zvířata:	18
3.2. Experimenty	18
3.2.1 Anestezie a použitá medikace	19
3.2.2 Srdeční katetrizace	19
3.2.3 Odběr krve	19
3.2.4 Laboratorní analýza	20
3.2.5 Popis experimentů a statistické zpracování výsledků	20
4. Výsledky.....	22
4.1. Experiment 1: Stanovení diurnálního rytmu u prasat domácích podstupujících katetrizační výkon	22
4.1.1 Kortizol.....	22
4.1.2 Kortizon.....	24
4.1.3 DHEA	25
4.1.4 DHEAS.....	26
4.2. Experiment 2: Liší se hladiny stresových markerů naměřených během katetrizace s bazální hladinou?.....	27
4.2.1 Kortizol.....	27
4.2.2 Kortizon.....	28
4.2.3 DHEA	29
4.2.4 DHEAS.....	30
4.3 Experiment 3: Liší se hladiny stresových markerů v průběhu operačního výkonu?	31
4.3.1 Kortizol.....	31
4.3.2 Kortizon.....	31
4.3.3 DHEA	31
4.3.4 DHEAS.....	31
4.4 Experiment 4: Zjištění poměru kortizol/kortizon	32
5. Diskuze.....	33
5.1. Experiment 1: Stanovení diurnálního rytmu u prasat domácích podstupujících katetrizační výkon	33
5.2 Experiment 2 a 3: Liší se hladiny stresových markerů naměřených během katetrizace s bazální hladinou; liší se hladiny během samotného operačního výkonu?	35
5.3 Experiment 4: Zjištění poměru kortizol/kortizon	37

6. Závěr.....	38
6.1. Experiment 1: Stanovení diurnálního rytmu u prasat domácích podstupujících katetrizační výkon	38
6.2 Experiment 2 a 3: Liší se hladiny stresových markerů naměřených během katetrizace s bazální hladinou; liší se hladiny během samotného operačního výkonu?	38
6.3 Experiment 4: Zjištění poměru kortizol/kortizon.....	39
7. Seznam zkratek:	40
8. Seznam citované literatury	41
9. Publikace v impaktovaných časopisech zahrnuté do disertační práce	51
9.1 Are there any differences between stress hormone levels in non-stress conditions and in potential stress overload (heart catheterisation) in sows?	51
9.2 Might Cardiac Catheterization Influence Diurnal Rhythm of the Steroid Stress Hormones Secretion?	69
10. Publikace v neimpaktovaných časopisech zahrnuté do disertační práce	80
10.1 Is there Circadian Variation in Cortisol Levels in Young Sows in Heart Catheterization?.....	80
10.2. Stres a stresové hormony u savců	90
11. Příloha k disertační práci.....	96
11.1 A new apparatus for the collection of fecal samples in undisturbed spiny mice living in a complex social group.....	96
11.2 The effects of sex, age and commensal way of life on levels of fecal glucocorticoid metabolites in spiny mice (<i>Acomys cahirinus</i>)	103

Abstrakt

V předkládané práci se náš tým zabýval stresem při srdeční katetrizaci, kde byla prováděna buď stimulace nebo ablace převodního srdečního systému v celkové anestezii, na modelovém druhu prasete domácího (*Sus scrofa domestica*).

V průběhu experimentu byla zjišťována hladina stresových markerů - kortizolu, kortizonu, dehydroepiandrosteronu a jeho sulfátu –DHEA(S). Tyto markery byly stanoveny z krevního séra, které bylo odebráno při předem určených situacích během každé katetrizace. První odběr byl odebrán ještě na farmě, druhý po uvedení do anestezie, třetí po stimulaci nebo ablaci převodního systému srdečního a čtvrtý po ukončení experimentu. Kortizol a kortizon byly stanoveny metodou HPLC, DHEA(S) komerčními kity. Výsledky byly statisticky zpracovány neparametrickými testy (data nevykazovala normální rozdělení dle Gausse).

Stručně lze experimenty shrnout takto: 1. Stanovení diurnálního rytmu u markerů během katetrizačního výkonu, 2. Liší se hladiny stresových markerů naměřených během katetrizace s bazální hladinou? 3. Liší se hladiny stresových markerů v průběhu operačního výkonu? 4. Zjištění poměru kortizol/kortizon.

V prvním experimentu nevyšla statistická závislost na denní době ($p > 0.05$) pro žádný z markerů. U experimentu 2 byl Friedmanův test pro sledované markery statisticky významný, pro kortizol a DHEAS na hladině významnosti $p < 0.05$, pro kortizon a DHEA na hladině významnosti $p < 0.001$. Pro experiment 3 byl test statisticky významný na hladině $p < 0.05$ pro kortizol a kortizon, pro DHEA(S) byl zvolený test nevýznamný. U čtvrtého experimentu byl Friedmanův test statisticky signifikantní na hladině významnosti 0.001 ($p < 0.001$).

Hladiny markerů se nelišily u odběrů prováděných ráno a odpoledne, oproti našim předpokladům nevykazovaly tedy předpokládaný diurnální rytmus. Vysvětlujeme si to nízkým věkem prasat, která ještě neměla pevně ustavený diurnální rytmus. U experimentu 2 a 3 byla první hladina u každého markeru vždy nejnižší, můžeme jí tedy označit za bazální, v průběhu experimentu se pak hladiny měnily statisticky významně, korespondovaly s uvedením prasat do anestezie (pokles kortizolu, naopak zvýšení kortizonu a DHEA(S)). Poměr kortizol/kortizon je nejvyšší u prvního odběru, poté klesá. Předpokládáme, že je to tak proto, že vysoká hladina kortizolu náhle klesne a musí být v těle konvertována na kortizon, zvyšuje se tedy aktivita enzymu 11 β -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, 11β -HSD2 activity increased and changed cortisol to cortisone.

Úvod k disertační práci

Stres, jeho funkce, pozitivní i negativní účinky na organismus, je dnes velmi studované téma ve všech přírodovědných a medicínských oborech. Stejně tak kvantifikace stresových hormonů a dalších markerů, které napoví o stresové zátěži daného jedince. Díky tomuto studiu jsme schopni odhadnout míru stresu, jak u zvířat, tak u lidí a zlepšit tak péči o ně. U zvířat jde především o zajištění jejich welfare, zlepšením podmínek jejich chovu, například ubytováním ve vhodných podmínkách (optimální velikost a členitost ubytování, které poskytuje dostatek úkrytů, optimální místo na odpočinek i aktivitu, obohacení prostředí herními prvky, typ podestýlky, apod.), zda je zvířeti lépe samotnému, v páru, sociálních skupinách apod. (u tohoto je pak důležité zajistit vhodnou skladbu sociální skupiny a zajišťovat její funkčnost tak, jak je to pro tato zvířata přirozené - např. odběrem subadultních mláďat v době, kdy je pro ně přirozené skupinu opustit a pokusit se o samostatný život, apod.).

Díky studiu stresu a jeho působení na organismus je možné také zlepšit průběh léčebného postupu ve veterinární i humánní medicíně. Může se jednat například o vhodnou volbu kombinace anestezie a analgezie tak, aby stresová zátěž byla pro pacienta co nejnižší, vhodné naplánování výkonu na dobu, kdy se očekává nižší přirozená koncentrace glukokortikoidů, nebo volba pooperační péče a medikace.

V naší práci jsme se zabývali právě studiu stresové zátěže během operačního výkonu (srdeční katetrizaci) na modelovém druhu prasete domácího (*Sus scrofa domestica*), který je v medicíně hojně využívaným zvířecím modelem pro svou fyziologii podobnou člověku. Pokusy byly prováděny ve společné Experimentální laboratoři srdeční elektrofyziologie Nemocnice na Homolce a 1.LF UK v Praze, která je umístěna v budově Fyziologického ústavu 1.LF UK v Praze. Náš experiment byl součástí rozsáhlejšího a komplexnějšího experimentu a byl zaměřen na kvantifikaci stresových markerů z krevního séra, testován byl kortizol, kortizon, dehydroepiandrosteron (DHEA) a jeho sulfát -DHEAS při námi předem definovaných momentech experimentu, které jsme pokládali za klíčové pro testování stresové reakce, a tudíž pro změny v koncentracích těchto markerů.

Naše práce byly publikovány v impaktovaném časopise (*Physiological Research*) a dvou recenzovaných časopisech (*Prague Medical Report*, *Československá fyziologie*). V příloze disertační práce jsou dále uvedeny dva články, které nejsou jejím podkladem ani součástí, ale tématicky se k ní vztahují. Tyto články vznikly během mého magisterského studia na Přírodovědecké fakultě UK v Praze, pod vedením Doc. RNDr. Daniela Frynty, Dr. Zabývali jsme se studiem stresu u sociálního druhu hlodavce - myši bodlinaté (*Acomys*

cahirinus) pomocí neinvazivních metod odběru vzorku a následným hodnocením koncentrací glukokortikoidů pomocí imunologického stanovení.

1. Literární úvod

1.1 Obecná charakteristika stresu a stresové reakce

1.1.1 Stres

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

U medicínských oborů nám mohou znalosti pomoci při snižování stresu například při běžných operačních výkonech, pooperační péči apod. V zoologických oborech (např. v behaviorálních studiích) můžeme zjištěním, jestli jsou zvířata stresovaná, lépe porozumět jejich životu ve volné přírodě nebo upravit jejich životní podmínky v zajetí. Informace o hladinách stresových hormonů nám také dovolují nahlédnout do sociální struktury skupin zvířat.

Termín stres je velmi obtížné definovat. Pohled na stresovou reakci se v průběhu let měnil. První se stresovou reakcí zabýval Selye (1936), který ji definoval jako reakci na podnět, kterému byl organismus vystaven a mohl ho poškodit. Předpokládalo se, že toto vede k nespecifické fyziologické a behaviorální odpovědi, nazývané obecný adaptační syndrom. V dnešní době je na stres nahlíženo jako na soubor odpovědí, kterými organismus reaguje na zátěž a na faktory poškozující jeho homeostázu.

Stimuly, které homeostázu narušují, se nazývají stresory. Jde o potenciaálně škodlivé nebo nepředvídatelné podněty, které vyvolávají stresovou reakci a aktivují stresové osy. Tyto podněty mohou mít nejen různý původ (mohou pocházet jak z vnitřního, tak i vnějšího prostředí organismu), ale i povahu. Může jimi být například horečka, strach, náhlá změna environmentálních podmínek, nedostatek potravy, úkrytů, nerovnováha v sociálním systému skupiny, apod. (např. Grandin 1997, DeVries et al. 2003, Weingrill et al. 2004, Young et al. 2004, Monclús et al. 2006).

1.1.2 Stresová reakce

Pokud je organismus vystaven působení stresoru, spustí se stresová odpověď. Jde o komplex nespecifických fyziologických, hormonálních a behaviorálních odpovědí, který má za úkol ochránit jedince před nežádoucími 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.

Původně se předpokládalo, že je stresová odpověď nespecifická a organismus tak reaguje na všechny stresory stejně (Selye 1936). V dnešní době je ale zastáván názor, že

některé typy stresorů vyvolávají specifickou kombinaci fyziologických a behaviorálních reakcí (Greenberg et al. 2002). Na akutní působení stresoru se snaží organismus reagovat tak, aby jeho působení zrušil, nebo alespoň omezil. Reakce na silnější nebo dlouhodobější působení stresoru vede k dlouhodobější odpovědi a k jeho potlačení dochází pomaleji (Dallman 2003). Z pohledu organismu je okamžitá a rychlá odpověď na akutní stres (útok predátora, náhlá environmentální změna) pro přežití organismu důležitější než dlouhodobá odpověď na chronický stres (Orchinik 1998).

U savců aktivuje působení stresoru dvě osy: sympato-adreno-medulární (SAM) a hypothalamo-hypofyzárně-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 vylučován během vteřin nebo minut. Adrenalin je syntetizován především v dřeni nadledvin, noradrenalin může být tvořen i v centrálním a periferním nervovém systému. Prekurzor noradrenalinu a adrenalinu - dopamin je možné nalézt jak v dřeni nadledvin, tak v noradrenergických neuronech. Přeměnu noradrenalinu na adrenalin fenylethanolamin-N-metyltransferázou (FNMT) indukuje kortizol. Katecholaminy jsou ve vyšší míře syntetizovány a secernovány při stresových situacích a mají za úkol tělo rychle připravit na působení stresoru. Noradrenalin a adrenalin se vážou na dvě skupiny adrenergických receptorů, α a β .

Metabolickými účinky zvyšují dostupnou zásobu energie potřebnou pro mozek a ostatní životně důležité orgány, i pro kosterní svaly, tyto účinky zahrnují například glykogenolýzu v játrech a kosterních svalech, zvyšují koncentrace volných mastných kyselin, zvyšují obsah laktátu v plazmě. Zvýšený metabolismus také způsobí kalorigenní účinek katecholaminů. Katecholaminy zvyšují bdělost a zlepšují kognitivní funkce. Všechny tyto účinky připravují tělo na zátěžovou situaci a pomáhají tak překonat působení stresoru.

Druhou stresovou osou je HPA osa, která má dva různé spouštěcí mechanismy. Buď může přímo navazovat na SAM osu (v tomto případě působí na hypothalamus adrenalin), pokud tomu tak není, dostává hypothalamus neuronální signál z mozkové kůry, kam přichází informace vyvolávající stres přímo ze smyslových drah. 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 kůru k produkci glukokortikoidů (GC). Reakce HPA osy je pomalejší, glukokortikoidy jsou vyloučeny a vyplaveny do krve během několika minut. GC pak působí

na cílové tkáni a spouští tak různé reakce (např. mobilizaci energie, zpomalení trávení a růstu, inhibici reprodukce, snížení funkce imunity), které vedou k obnově homeostázy.

Regulace HPA osy je řízena hlavně z hypothalamu a její aktivitu regulují samotné GC pomocí negativní zpětné vazby. GC nasedají na receptory v mozku a ty vysílají odpověď, která vypíná reakce HPA osy na jakékoliv úrovni jejího působení, tedy na úrovni potlačení produkce CRF, ACTH i GC.

Stresovou osu lze regulovat i vnějším podáním ACTH (vede k větší aktivaci nadledvin a zvýšené koncentraci GC) nebo dexametazonu (dex), který naopak snižuje koncentraci ACTH v krevní plazmě, čímž se sníží i koncentrace GC v krvi (např. Bradbury et al. 1994).

Stresová odpověď vede k manifestaci fyziologických a behaviorálních změn vedoucích k záchraně jedince (emergency life-history) (Orchinik 1998, Breuner a Orchinik 2002, Boonstra 2004), naopak ostatní funkce, které organismus zatím ke své bezprostřední záchraně nepotřebuje, jsou potlačeny (např. ztráta ovulace u samic a erekce u samců) (Orchinik 1998, Sapolsky et al. 2000).

Při stresové reakci dochází také ke změnám metabolismu cukrů, při krátkodobém stresu vedou tyto změny především k mobilizaci energie. GC zvyšují hladinu glukagonu, čímž dojde ke zvýšení hladiny glukózy v krvi. Ta je hlavním zdrojem energie pro mozek a svaly. Pro efektivnější dopravení energie k cílovým tkáním se zvýší krevní tlak a tepová frekvence, zlepší se průtok krve mozkiem a díky tomu se zlepšují kognitivní funkce. Pokud podnět působí déle a stresová reakce přejde z akutní v chronickou, dojde naopak ke zvýšení hladiny inzulínu. Jedinec dává přednost vysokokalorické dietě a nespotebovaná energie se ukládá ve formě zásob. Trvale zvýšený kalorický příjem může vést k obezitě, popřípadě až k inzulínové rezistenci, což může vyústit až v tzv. steroidní diabetes (Rosen et al. 1963).

Míra stresové odpovědi může být rozdílná na různých úrovních - jak mezi různými taxony, tak i mezi různými jedinci uvnitř jednoho taxonu. Modulace stresové odpovědi může být způsobena například aktuálním stavem jedince, sociálními nebo environmentálními podmínkami (Orchinik 1998, Boonstra 2004). Individuální variabilita stresové odpovědi se odráží především v temperamentu jedince - jedinci s klidnější povahou inklinují spíše k pomalejší reakci (tzv. „freeze-hide“) a jsou více ovlivňováni HPA osou. Naopak jedinci temperamentnější preferují rychlejší reakci (tzv. „fight-flight“) a více aktivují SAM osu (Grandin 1997, Korte et al. 2005). Rozdíly jsou také mezi divokými zvířaty a zvířaty stejného druhu chovanými v zajetí, divoká zvířata reagují intenzivněji reakcí „fight-flight“ (Grandin 1997, Künzl a Sachser 1999, Künzl et al. 2003). Stresová odpověď může být mírnější, pokud

jedinec stresor očekává, nebo je na jeho přítomnost již habituován (Greenberg et al. 2002, Boonstra 2004, Romero 2004, Keay et al. 2006).

1.2 Charakteristika glukokortikoidů, mechanismy jejich působení a způsoby regulace

Glukokortikoidy (kortizol, kortikosteron) jsou steroidní hormony produkované kůrou nadledvin. Vznikají z cholesterolu jako deriváty progesteronu, cholesterolový základ s 27 atomy uhlíku je u kortikoidů zkrácen na 21 uhlíků. Mají důležitou úlohu v kontrole metabolismu téměř všech tkání v organismu. GC ovlivňují metabolismus cukrů a patří mezi stresové hormony.

Je překvapivé, že kortizol a kortikosteron není vylučován stejnou měrou u všech živočišných taxonů. Ryby, obojživelníci, plazi a ptáci produkují více kortikosteronu, savci včetně lidí více kortizolu. Mezi savci tvoří zvláštní skupinu hlodavci (viz review Breuner a Orchinik 2002), u kterých mají některé druhy jako hlavní GC kortikosteron – např. potkani, myši domácí (Touma et al. 2003), některé kortizol – např. křečci (Castro a Matt 1997) nebo myš bodlinatá (Lamers et al. 1986).

Glukokortikoidy jsou biologicky aktivní pouze pokud mají na svém jedenáctém uhlíku navázanou hydroxylovou skupinu (kortizol, kortikosteron). Pokud se zde vyskytuje jiná funkční skupina (např. keto- skupina u kortizonu nebo 11-dehydrokortikosteronu), jsou inaktivní. Kortizon je také vytvářen kůrou nadledvin, místo hydroxylové skupiny na C-11 obsahuje keto- skupinu, která změní charakter molekuly na hydrofilní a znemožní tak průnik buněčnou membránou a navázání na cytoplazmatické receptory. Kortizon vytváří zásobní pool kortizolu pro případy, kdy je potřeba zvýšená koncentrace kortizolu (např. při stresové reakci nebo diurnálním rytmu). Konverze kortizolu v kortizon (a naopak) je prováděna dvěma izoenzymy 11 β -HSD 1 a 11 β -HSD 2 (11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza 1, 2), o kterých se zmíním v následujícím textu.

Kortikoidy se mohou v plazmě vyskytovat buď nevázané (5-10 %) nebo vázané (90-95%) na globulin transkortin (CBG, corticoid binding globulin), případně v menší míře na albumin. Volné GC jsou malé lipofilní molekuly, které mohou díky hydrofobnímu charakteru vstupovat přes buněčnou membránu dovnitř buněk a aktivovat tak membránové i cytoplazmatické receptory (Bamberger et al. 1996, Orchinik 1998, Bertram a Hanson 2002, Breuner a Orchinik 2002). Vazbou na globulin se mění charakter GC na hydrofilní, a proto nemohou prostupovat buněčnou membránou. Globuliny mění tímto mechanismem dostupnost GC pro cílové buňky (Challis et al. 1995, Breuner a Orchinik 2002, Romero 2002).

Transkortin je syntetizován v játrech (Berdusco et al. 1993, Fleshner et al. 1995, Challis et al. 1995), chemicky patří k nadrodině serpinů. Molekula CBG se skládá z několika skládaných β -listů (A, B, C) a deseti α helixů. Protein obsahuje také strukturu označovanou jako RCL (reactive centre loop), která prochází strukturní změnou, když CBG vytvoří s GC komplex. Pokud je vytvořen komplex GC-CBG (tzv. aktivní konformace globulinu), podílí se RCL struktura na rozpadu vazby GC-CBG. Vazba GC-CBG je založena na vysoké komplementaritě povrchů obou molekul díky vodíkovým můstkům. I když má molekula GC pět polárních atomů uhlíku, vazby na CBG jsou schopny pouze uhlíky C-11 a C-20 (Klieber et al. 2007). Za fyziologických podmínek je navázání a disociace steroidu a CBG reverzibilní a je tím tedy kontrolován podíl biologicky aktivních steroidů kolujících v krevním řečišti. Je zajímavé, že afinita CBG ke GC není závislá na tom, zda jedinec je nebo není stresován (Fleshner et al. 1995). Testy ukázaly, že se v různých fázích vývoje jedince secernuje různé množství CBG - během intrauterinního života a krátce po porodu je koncentrace CBG vysoká, během několika dní po porodu klesne na hodnoty, které jsou již podobné těm u dospělých jedinců. To může znamenat, že po porodu dojde ke změně preference přenosu GC - nejdříve je preferován přenos volných GC, později navázaných na albumin a poté vázaných na CBG (tato preference pak trvá po zbytek života). Toto bylo pozorováno u ovcí i u prasat domácích (Berdusco et al. 1993, Challis et al. 1995, Kattesh et al. 1996, Heo et al. 2003).

Volné GC jako malé lipofilní molekuly prochází buněčnou membránou a vážou se na intracelulární receptory. V buňkách se nacházejí dva typy receptorů schopných vázat GC, mineralokortikoidní (MR) a glukokortikoidní (GR) (Lombes et al. 1994, Bamberger et al. 1996, Seckl 1997). Tyto proteiny patří do nadrodiny transkripčních faktorů aktivovaných ligandem, podobně jako receptory pro tyreoidální hormony, vitamin D₃, progesteron, estrogény, androgeny a jiné steroidní hormony (Seckl 1997). Oba receptory mají velmi podobné vazebné domény (Lombes et al. 1994, Seckl 1997, Davies a MacKenzie 2003), ale liší se svou afinitou k ligandům. MR má velkou afinitu jak pro mineralokortikoidy (aldosteron), tak pro glukokortikoidy. GR má velkou afinitu jen pro glukokortikoidy. MR dokáže rozpoznat GC od aldosteronu a v některých tkáních váže přednostně aldosteron, například v distálním tubulu, slinných žlázách, potních žlázách a v kolonu. To je možné díky dalšímu regulačnímu faktoru, enzymu 11 β -HSD. Tato rozdílná afinita vede k hypotéze, že MR jsou optimalizovány pro odpověď při bazálních hladinách glukokortikoidů, kdežto GR pro hladiny glukokortikoidů v jejich zvýšené koncentraci, tedy když jsou MR plně saturovány (např. diurnální rytmus nebo stres) (Orchinik 1998, Perreau et al. 1999, Romero 2004). GR a MR se nacházejí například ve strukturách mozku, kde ovlivňují regulaci HPA osy (např. v

hippokampu, paraventriculárním jádru hypothalamu, předním laloku hypofýzy), v ledvinách, játrech a dalších tkáních (Brown et al. 1996, Seckl 1997, Perreau et al. 1999, Davies a MacKenzie 2003). Oba receptory jsou v tkáních rozloženy nestejně, proto může stejný podnět vyvolat v různých místech rozdílné odpovědi (podle toho, jestli se GC naváže na GR nebo na MR) (Young et al. 2004). Komplex GC-receptor vstupuje do buněčného jádra, kde působí jako transkripční faktor. Rozpoznává sekvence DNA, které se nazývají GREs (glucocorticoid response elements), tyto sekvence jsou nejčastěji palindromické (Seckl 1997).

Dalším regulačním faktorem, který kontroluje množství GC dostupné pro buněčné receptory, je enzym 11 β -HSD, který patří do nadrodiny SCAD (short chain alcohol dehydrogenasis). Objevuje se ve dvou izoformách: 11 β -HSD1, která působí jako reduktáza a 11 β -HSD2, která má dehydrogenázovou aktivitu. 11 β -HSD1 je NADP(H) dependentní enzym, 11 β -HSD2 NAD dependentní. Obě izoformy se liší také svým složením (například počtem aminokyselin) a výskytem. 11 β -HSD1 se vyskytuje hlavně ve strukturách mozku (v mozečku, hipokampu, hypofýze, hypothalamu nebo kůře), 11 β -HSD2 se v mozku dospělého jedince téměř nevyskytuje, ale svou důležitou roli 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 (Seckl 1997, Bertram a Hanson 2002). 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 přednostně navázán aldosteron, např. v ledvinách (Brown et al. 1996, Seckl 1997), nebo v jiných orgánech, které by mohlo nadměrné množství GC poškodit, např. ovária nebo Leydigovy buňky v testes (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).

GC jsou metabolizovány především v játrech a v menší míře i v jiných tkáních. Metabolity GC (GCM) jsou hydrofilní a mohou tak být z těla vyloučeny močí nebo trusem. Na těchto krocích se podílí hlavně 5 α -, 5 β -reduktázy a 3 α - a 3 β hydroxysteroiddehydrogenázy (Tomlinson a Stewart 2001, Michael et al. 2003). Metabolismus GC se u různých druhů živočichů liší a složení vyloučených metabolitů jednotlivých druhů je různé. Spektrum vyloučených metabolitů je pro každý druh specifické a navíc se mohou metabolity lišit i intraspecificky v závislosti na pohlaví, například u myši domácí (Touma et al. 2003) a potkana (Lepschy et al. 2007).

1.2.1 Cyklické změny glukokortikoidů

Hladiny GC podléhají cyklickým změnám, a to jak sezónním, tak diurnálním. Je zajímavé, že CBG tento rytmus nevykazuje (Fleshner et al. 1995). 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. 1981a, Becker et al. 1985a, b, Horký 1985, Bradbury et al. 1994, Kramer a Sothorn 2001, Young et al. 2004).

Prasata domácí patří k živočichům s denní aktivitou, proto mají nejvyšší hladinu glukokortikoidů ráno. V některých studiích byly nalezeny peaky dva, jeden ráno a další odpoledne, což korespondovalo s časy, kdy byla prasata v zajetí krmena (Geverink et al. 2003, Hillmann et al. 2008). Podobný výsledek byl také pozorován u potkanů (Krieger a Hauser 1978).

Ciradiální 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 ve věku okolo 20 týdnů (Ruis et al. 1997). Cirkadiální rytmus může být ovlivněn stresem a může být v období zvýšeného stresu potlačen nebo dokonce může 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.

1.2.2 Vliv ustájení a transportu na hladiny GC

U zvířat žijících v zajetí má také na hladiny GC vliv typ ustájení. Jedinci v prázdném stání vykazují vyšší míru stresu a sníženého welfare než ti v ustájení více vybaveném (deJong et al. 2000, Waiblinger a König 2004). Pokud jsou jedinci vystaveni novému prostředí, zvyšuje to také míru stresu (Dantzer a Morméde 1983, Grandin 1997, Désautés et al. 1999). Také během transportu se hladiny GC a jiných stresových markerů zvyšují (Becker et al. 1985 b, Dalin et al. 1993), u prasat domácích pak více u samic než u samců, vyšší hladiny GC byly nalezeny při přepravě v zimních měsících a u delších tras (Averos 2007).

1.3. Dehydroepiandrosteron (DHEA), dehydroepiandrosteronsulfát (DHEAS)

Tyto steroidní hormony jsou tvořeny buď v nadledvinách, gonádách, placentě nebo v centrální nervové soustavě jako neurosteroidy. DHEA(S) syntetizované v různých tkáních mají také různé mechanismy účinku. Zatímco steroidy syntetizované v gonádách nebo nadledvinách mají endokrinní účinek (tedy jsou secernovány do krevního oběhu, putují ke vzdáleným cílovým tkáním a jejich koncentrace je relativně nízká), neurosteroidy mají lokální autokrinní nebo parakrinní účinek (viz review Schumacher et al. 2000). Produkce neurosteroidů byla prokázána dvojím způsobem: (1) byly hladiny DHEA(S) stejné nezávisle na provedení challenge testů (dex i ACTH), které působí stejně jako u GC, tedy dex tvorbu snižuje, ACTH zvyšuje; (2) nadledviny krys nejsou schopné tvořit DHEA(S), i přesto byly v jejich mozku nalezeny oba tyto steroidy (viz Baulieu a Robel 1998). Sulfoestery neurosteroidů nemohou procházet hematoencefalickou bariérou, na rozdíl od nesulfatovaných. DHEA a DHEAS mají odlišné působení při modulaci nervového růstu – zatímco DHEA selektivně zvyšuje růst axonu, DHEAS zase růst dendritů (viz např. reviews Baulieu a Robel 1998, Schumacher et al. 2000).

DHEA je konvertován na DHEAS působením sulfotransferázy v kůře nadledvin, játrech a tenkém střevě. DHEAS je hlavní cirkulující formou a působí jako zásobní pool DHEA. Kromě cholesterolu patří DHEAS k nejvíce 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.

Plazmatické hladiny DHEA(S) se mění v průběhu stárnutí, nejvyšší hladiny jsou v mládí, poté stále pomalu klesají. Předpokládá se, že nedostatek DHEA může způsobit degenerativní změny na mozku u starších lidí (Baulieu et al. 2000).

DHEA(S) může působit jak přes intracelulární, tak i membránové receptory. Mezi membránové receptory, na které DHEA(S) působí patří např. GABA_A (receptory kyseliny γ -aminomáselné), NMDA (*N*-methyl *D*-aspartát receptory), σ 1, apod.

NMDA receptory patří mezi glutamátové ionotopní kanály, jsou přítomné v mnoha strukturách centrální nervové soustavy a jsou nezbytné pro synaptickou plasticitu, učení a paměť. NMDA kanály ovlivňují vtok vápenatých iontů dovnitř buňky. Pozitivní modulace NMDA receptorů zvyšuje jeho průnik do buněk a následné zvýšení aktivace enzymů závislých na vápenatých iontech - například fosfolipázy A₂ (PLA₂) – může vést k oxidativnímu stresu (pokud nejsou přítomny kontraregulační mechanismy). Tato pozitivní modulace

zvyšuje excitabilitu cílových buněk a zlepšuje paměťové mechanismy (Bičíková et al. 2000). DHEA(S) patří mezi pozitivní modulační faktory NMDA receptorů.

Oproti NMDA receptorům má působení přes GABA_A inhibiční efekt a převažuje tedy negativní modulace (Baulieu a Robel 1998, Bičíková et al. 2000, Schumacher et al. 2000, Goodyer et al. 2001, Morgan et al. 2004, Gartside et al. 2010), všechny tyto receptory modulují proces paměti (Bičíková et al. 2000).

DHEA(S) je produkován také placentou a působí tak na plod. Plazmatické 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 et al. 2000, Goodyer et al. 2001, Gartside et al. 2010). Ačkoliv se v pubertě začíná objevovat vyšší hladiny DHEA(S), „adrenarché“ je od ní odlišná, není závislá ani na produkci estrogenu, testosteronu nebo gonadotropinů (Goodyer et al. 2001). Nižší hladina DHEA(S) může způsobit degenerativní změny mozku a může být spojena se snížením kognitivních funkcí u starších osob (Baulieu et al. 2000, Gartside et al. 2010). S poklesem hladin je také spojeno např. zvýšené vysoušení pokožky, odbourávání kostní hmoty osteoklasty nebo snížení libida, všechny tyto funkce se zlepšují po podání 50mg DHEA v podobě potravinového doplňku (pod lékařským dohledem) (Baulieu et al. 2000, Morgan et al. 2004).

DHEA(S) je, stejně jako kortizol, vyplavován při zvýšeném množství 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 anti-glukokortikoidní účinky, působí tedy jako protiváha negativních vlivů stresu (Kimonides et al. 1998, 1999, Charney 2004, 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 výraznější cirkadiánní rytmus, u starších osob s poklesem hladin DHEA(S) pak klesala i intenzita cirkadiánní variability, až 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, autoři nezaznamenali 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 dopadů operačních výkonů 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 má vlastnosti slabé kyseliny lipofilní povahy, má rychlý nástup účinku a je rychle degradován, proto je vhodný jako anestetikum nejen při krátkodobých operačních výkonech, např. kardioverzích, ale i v intenzivní medicíně pro každodenní použití u pacientů. Působí především jako blokátor napětově řízených L-kalciových kanálů v srdci a snižuje tak sympatickou aktivitu alfa i beta adrenergických receptorů (viz review Krzych et al. 2009). Má také antioxidantní vlastnosti (díky fenol-hydroxylové skupině v chemické struktuře), potlačuje oxidativní vzplanutí neutrofilů (Kelbel a Weiss 2001).

Propofol se používá spolu s opiátem (např. Sufentanil, Remifentanil, Morfin, apod.) k nitrožilní anestezii (total intravenous anesthesia, TIVA). Alternativou k takovéto anestezii je použití inhalační anestezie s použitím anestetických plynů (např. Sevofluran, Isofluran, Enfluran) spolu s opiáty. V mnoha pracích autoři porovnávali účinky obou typů anestézií na produkci stresových markerů. Kombinace Propofolu a opiátu snižovala vyplavení katecholaminů i glukokortikoidů do krevního řečiště a naměřené hladiny tak byly dokonce nižší než před operací, nebo u kontrolní skupiny (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, Marana et al. 2010), přičemž opiáty mají tyto účinky výraznější než Propofol (Schricker et al. 2000). Propofol snižuje aktivitu HPA osy, na rozdíl od Sevofluranu, dochází tedy nejen ke snížení produkce a sekrece kortizolu, ale i ACTH a CRH. Nejspíš se tak děje synergickou reakcí Propofolu a opiátu na hypotalamické receptory, které potlačují aferentní bolestivé stimuly a snižují tak vyplavení CRH (nejspíš prostřednictvím zvýšení koncentrace inhibitorů GABA receptorů).

Propofol má krátký poločas degradace, proto snižuje hladinu stresových markerů jen během operace, po dvou hodinách po operaci jsou již hladiny na úrovni baseline a srovnatelné s inhalační anestézií (Fragen et al. 1987, Schricker et al. 2000, Kostopanagiotou et al. 2010).

1.5 Shrnutí

Stres a vliv stresových hormonů na organismus je dnes velmi diskutovaným jevem. Ve své podstatě stres není negativní reakce, naopak je velmi důležitý, pokud organismu hrozí nebezpečí. Díky stresové reakci tělo nastartuje mechanismy potřebné k jeho záchraně a naopak potlačí ty, které se záchranou bezprostředně nesouvisí. Při této reakci dojde k vyplavení stresových hormonů (katecholaminů, glukokortikoidů), které způsobují např. zvýšení hladiny glukózy v krvi (jako zdroj energie pro mozek a svaly), zvyšuje se krevní tlak a tepová frekvence, a tím dochází k lepšímu prokrvení životně důležitých orgánů.

Nebezpečný je dlouhodobý nebo chronický stres, který má na organismus velmi negativní vliv (např. trvale zvýšený krevní tlak, dlouhodobě zvýšená hladina glukózy v krvi může vést až k tzv. steroidnímu diabetu, poruchám ovulace nebo erekce, apod.).

Různé metody stanovení hladin stresových hormonů nám umožňují detekovat působení akutního i chronického stresoru a stanovit dlouhodobý hormonální profil daného jedince včetně sociálně žijících živočichů. Pro získání validních výsledků je nezbytné správně zvolit typ experimentu a metodu odběru s ohledem na námi zkoumaný problém.

Pokud zjistíme, jaký podnět působí jako stresor, můžeme jeho působení eliminovat, či alespoň minimalizovat. Při operačních výkonech to může být například kombinace anestézie, která nezvyšuje hladinu GC, nebo použití méně invazivní techniky operace. V případě transportu pak je možné volit převoz po nejkratší trase nebo v příznivějších teplotních podmínkách, případně pokud přepravujeme více zvířat volit přepravu tak, aby zvířata na sebe zvyklá byla přepravována společně. U zvířat chovaných v zajetí pak můžeme zlepšit jejich welfare například přidáním obohacujících prvků ustájení/chovných zařízení, zlepšením fyzikálních podmínek (vhodná teplota, intenzita světla, vlhkost, apod.) nebo vhodným sestavením skupiny (u sociálních zvířat). Stanovení hladin stresových hormonů má proto velký význam.

2. Cíle a hypotézy

V této práci jsme si stanovili následující cíle:

1. Stanovit hladiny stresových markerů (kortizolu, kortizonu, DHEA a DHEAS) u modelového druhu prasete domácího z krevního séra.
2. Optimalizovat načasování odběrů krve pro detekci markerů a určit situace, které by mohly mít na hladinu stresových markerů vliv a stanovit tak protokol pro odběr krevních vzorků během stresové zátěže.
3. Porovnat hladiny stresových markerů 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 11 β -HSD.
7. Zjistit, zda minimálně invazivní plánovaná srdeční katetrizace má vliv na HPA osu a následné vyšší vyplavení GC kůrou nadledvin. Tato měření by mohla pomoci zlepšit plánovaný kardiologický výkon ve veterinární i humánní medicíně (například správným načasováním experimentu).

Hypotézy:

Při naší práci jsme řešili 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 růstu hladiny stresových markerů během katetrizace.

4. Zjištěním poměru kortizol/kortizon jsme chtěli stanovit aktivitu steroidogeneze v kůře nadledvin a zároveň aktivitu 11 β -HSD, která mění 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 pokusů

3.1 Pokusná zvířata:

V našich experimentech jsme použili jako modelový druh prase domácí (*Sus scrofa domestica*), konkrétně křížence plemen Landrace a Velké bílé. Pracovali jsme se samicemi dvanáct týdnů starými, s váhou 40-50 kg. Zvířata byla volena tak, aby ještě nebyla v pubertě a výsledky nebyly případně ovlivněny cyklickými změnami hormonů během estrálního cyklu. Prasata pocházela z farmy Agro Jesenice a.s., chovné stanice Radějovice (RČH CZ-21045103).

Na farmě byla prasata chována podle konvenčních chovných norem (teplota prostředí 20 °C, vlhkost vzduchu mezi 40 a 70 %, přírodní světelný cyklus, regulované odvětrávání). Krmena byla vyváženou stravou, schválenou pro standardní výživu prasat (Čos II, Velaz, ČR). Pitná voda byla podávána *ad libitum*.

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 1. LF UK a byly jí schváleny jako vyhovující všem platným předpisům.

Průběh jednotlivých experimentů byl stejný, byla použita stejná metodika chovu pokusných zvířat, jejich transportu, medikace, anestezie, katetrizace i odběrů krve a zpracování krevního vzorku. Liší se jen počtem pokusných zvířat (data získaná ode všech zvířat nebyla vhodná ke zpracování pro všechny experimenty), která byla k pokusům použita a metodikou statistického zpracování získaných dat.

Délka trvání experimentu byla přibližně shodná pro všechna experimentální zvířata. Zvířata byla v domovské farmě den před experimentem oddělena do samostatného kotce, a nebylo jim podáváno krmení. 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. Časové odchylky jsou samozřejmě možné, kvůli komplikacím při zákroku, nebyly však časté.

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.

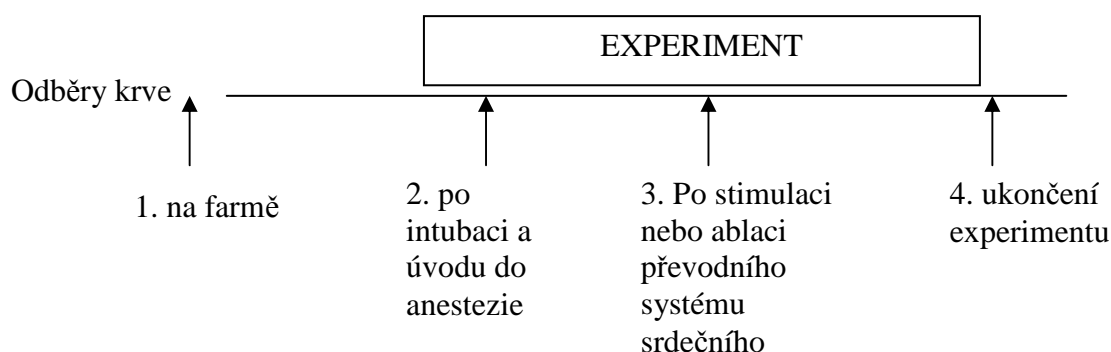
Ventilace byla udržována na průměrném objemu 8-10 ml/kg, počet dechů byl 15/min. Během IV anestezie byl zvířeti kontinuálně měřen střední arteriální tlak (MAP), srdeční frekvence (HR), saturace kyslíkem (SO₂) a výdechová kapnometrie (PCO₂) s využitím multiparametrálního bed-side monitoru.

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 převodního systému srdečního.

3.2.3 Odběr krve

Krev jsme odebírali z jugulární žíly ve čtyřech přesně stanovených situacích experimentu. První odběr byl volen tak, abychom měli představu o hladině měřených markerů u pokusného zvířete v nestresových podmínkách, ještě na domácí farmě, druhý odběr následoval 10 minut po intubaci a uvedení do anestezie, třetí 10 minut po srdeční stimulaci nebo ablaci tkáně převodního systému srdečního a čtvrtý po ukončení experimentu, těsně před usmrcením zvířete. Pro názornost je vytvořeno schéma (obr. 1)



Obr. 1: Schématické zobrazení odběrů testovaných markerů

Testované markery jsme vyšetřovali z krevního séra. K tomuto vyšetření bylo zapotřebí odebrat 10 ml krve. K odběru byly použity zkumavky odběrového systému Vacutainer (BD Vacutainer, SSt II Advance). Po 30 minutové inkubaci v pokojové teplotě byly zkumavky centrifugovány (2000 x g) 15 minut, poté bylo sérum odsáto do mikrozkuvek a uchováno do dalších analýz při -20°C.

3.2.4 Laboratorní analýza

Laboratorní analýzy byly prováděny v laboratořích Endokrinologického ústavu v Praze (oddělení steroidů a proteofaktorů). Pro kvantifikaci kortizolu a kortizonu byla použita metoda HPLC (High performance chromatography) podle protokolu, který byl použit a publikován již dříve (Šimůnková et al. 2008). DHEA(S) pak byly stanoveny komerčními radiometrickými kity.

3.2.5 Popis experimentů a statistické zpracování výsledků

Experimenty (přehled):

1. Stanovení diurnálního rytmu u prasat domácích podstupujících katetrizační výkon
2. Liší se hladiny stresových markerů naměřených během katetrizace s bazální hladinou?
3. Liší se hladiny stresových markerů v průběhu operačního výkonu?
4. Zjištění poměru kortizol/kortizon

3.2.5.1 Experiment 1: Stanovení diurnálního rytmu u prasat domácích podstupujících katetrizační výkon

K tomuto experimentu bylo použito 23 pokusných zvířat, která byla rozdělena do dvou skupin, podle denní doby, kdy podstupovala experimentální výkon. Do skupiny zvířat katetrizovaných ráno (začátek pokusu v 9:00), bylo zařazeno 13 prasat, do skupiny odpoledních (začátek pokusu v 15:00) 10.

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

Získané hodnoty testovaných markerů byly rozděleny do dvou skupin (ranní a odpolední), 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 a minimum naměřených hodnot) pro každý marker v každém testovacím období (odběr 1-4, viz metodika krevního odběru).

Naměřené hodnoty nevykazovaly normální rozdělení dle Gausse, proto byl pro statistické hodnocení použit neparametrický Mann-Whitney test. Ten byl navržen pro dva nezávislé výběry (pro ranní a odpolední testovací skupinu) pro každý marker a pro každý odběr zvlášť.

3.2.5.2 Experiment 2: Liší se hladiny stresových markerů naměřených během katetrizace s bazální hladinou?

K tomuto experimentu bylo použito 25 testovaných samic prasat. U tohoto pokusu bylo možné zanedbat dobu, kdy byla prováděna katetrizace (dle výsledků předchozího pokusu to bylo možné).

Díky tomuto experimentu jsme mohli zjistit dynamiku změny testovaných markerů v průběhu experimentu a zhodnotit tak vliv jednotlivých úkonů na hladinu markerů.

Vzhledem k tomu, že data nevykazovala standardní Gaussovské rozdělení, byl pro testování hladin stresových markerů použit neparametrický Friedmannův test pro 4 závislé výběry (pro 4 odběry v předem stanovených situacích, viz metodika odběru krevního vzorku). Odběry během operace (odběry 2-4) byly porovnávány s odběrem v předpokládaných nestresových podmínkách (1. odběr).

3.2.5.3 Experiment 3: Liší se hladiny stresových markerů v průběhu operačního výkonu?

K tomuto experimentu bylo použito stejných 25 prasat, metodika byla stejná, jen se porovnávaly získané hodnoty jen během katetrizačního výkonu (tedy bez prvního odběru). Získali jsme tím představu, zda se statisticky liší hladiny markerů pouze během operace. Byl použit neparametrický Friedmannův test pro 3 závislé výběry (pro odběr 2-4).

3.2.5.4 Experiment 4: Zjištění poměru kortizol/kortizon

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 rovny nule a proto nešel poměr kortizol/kortizon vypočítat (proto se počet naměřených hodnot u pokusných zvířat liší v jednotlivých odběrech; pro 1. odběr $n=18$, pro 2. a 3. odběr $n=25$, pro 4. $n=21$). Pro zjištění statistické významnosti byl použit neparametrický Friedmannův test pro každý parametr pro 4 závislé výběry.

4. Výsledky

4.1. Experiment 1: Stanovení diurnálního rytmu u prasat domácích podstupujících katetrizační výkon

Pro všechny markery (kortizol, kortizon, DHEA(S)) byla vypočítána základní statistická data (minimum, maximum, medián) pro každou sledovanou část experimentu (viz kapitola Metodika, část 3.2.3, Odběr krve). Zvířata byla rozdělena do dvou skupin, podle toho, zda byla katetrizace prováděna v ranních nebo odpoledních hodinách. Naměřená data vykazovala široké rozpětí hodnot, které můžeme přičíst velkým interindividuálním rozdílům v hladinách měřených markerů.

Výsledky budou prezentovány pro každý marker zvlášť. Komentovány budou jen mediány, v tabulkách jsou kromě mediánu zapsána i minima a maxima pro ukázkou velkého rozptylu naměřených hodnot.

4.1.1 Kortizol

V první části experimentu (odběr ještě na domácí farmě, tedy v nestresových podmínkách) byl vypočítán medián 145.15 nmol/l pro ranní skupinu a 154.90 nmol/l pro odpolední skupinu. Medián pro druhý odběr (prováděný po zavedení anestezie) byl 272.61 nmol/l pro ranní skupinu a 327.75 nmol/l pro odpolední. V další, třetí, fázi experimentu (teda po stimulaci nebo ablaci převodního systému srdečního) byly stanovené hodnoty mediánu, minima a maxima velmi podobné. Mediány byly 231.00 nmol/l pro ranní skupinu a 241.00 nmol/l pro odpolední; minima 82.00 nmol/l pro ranní a 105.00 nmol/l pro odpolední skupinu; maxima 365.00 nmol/l pro ranní a 374.68 nmol/l pro odpolední skupinu. Pro čtvrtou část experimentu (po ukončení experimentu), byl medián 143.95 nmol/l pro ranní a 224.00 nmol/l pro odpolední katetrizační skupinu. Ve všech částech experimentu byly hodnoty Mann-Whitney testu neprůkazné na hladině statistické významnosti 0.05 ($p > 0.05$), proto můžeme konstatovat, že naše experimentální zvířata u tohoto testovaného markeru nevykazovala cirkadiánní rytmus.

Tab. 1: Medián, minimum, maximum a Mann-Whitney test pro 2 závislé výběry (ranní a odpolední skupina) koncentrace kortizolu

Pořadí odběru	Skupina	Medián (nmol/l)	Minimum (nmol/l)	Maximum (nmol/l)	p
1	ráno	145.15	58.11	716.71	0.55
	odpoledne	154.90	121.00	445.53	
2	ráno	272.61	58.00	394.22	0.14
	odpoledne	327.75	118.00	435.34	
3	ráno	231.00	82.00	365.00	0.58
	odpoledne	241.82	105.00	374.68	
4	ráno	143.95	50.34	405.69	0.20
	odpoledne	224.00	122.11	396.00	

4.1.2 Kortizon

Pro první část experimentu byl medián pro ranní skupinu naměřen 2.93 nmol/l, pro odpolední pak 8.16 nmol/l. Po uvedení do anestezie byl medián 28.36 nmol/l pro ranní a 76.50 nmol/l pro odpolední skupinu. Pro třetí část experimentu byl u ranní skupiny naměřen medián 35.67 nmol/l, pro odpolední 127.79 nmol/l. Na konci experimentu byly mediány naměřeny 19.00 nmol/l u ranní skupiny, 124.62 nmol/l u odpolední. Ve všech částech experimentu byl námi zvolený neparametrický statistický test neprůkazný ($p > 0.05$), proto můžeme tvrdit, že ani u koncentrace kortizonu nevykazovala experimentální zvířata diurnální variabilitu.

Tab. 2: Medián, minimum, maximum a Mann-Whitney test pro 2 závislé výběry (ranní a odpolední skupina) koncentrace kortizonu

Pořadí odběru	Skupina	Medián (nmol/l)	Minimum (nmol/l)	Maximum (nmol/l)	p
1	ráno	2.93	0.00	52.00	0.32
	odpoledne	8.16	0.00	55.53	
2	ráno	28.36	16.68	94.56	0.52
	odpoledne	76.50	13.00	151.31	
3	ráno	35.67	15.25	204.00	0.15
	odpoledne	127.79	20.93	290.00	
4	ráno	19.00	0.00	363.77	0.15
	odpoledne	124.62	9.08	231.00	

4.1.3 DHEA

Pro první odběr byl medián 0.19 nmol/l pro ranní skupinu a 0.12 nmol/l pro odpolední skupinu. U druhé části experimentu byl medián 0.58 nmol/l pro ranní a 0.57 nmol/l pro odpolední skupinu. U třetí části 0.69 nmol/l u ranní a 0.74 nmol/l u odpolední skupiny. V konečné části experimentu byl medián naměřen 0.90 nmol/l pro ranní a 0.61 nmol/l pro odpolední skupinu. Jako u předešlých odběrů byl test statistické významnosti neprůkazný pro všechny části experimentu ($p > 0.05$). Stejně jako u kortizolu a kortizonu, nebyl prokázán statisticky významný rozdíl a u našich experimentálních zvířat se tedy ani u tohoto markeru nepotvrdil cirkadiánní rytmus.

Tab. 3: Medián, minimum, maximum a Mann-Whitney test pro 2 závislé výběry (ranní a odpolední skupina) koncentrace DHEA

Pořadí odběru	Skupina	Medián (nmol/l)	Minimum (nmol/l)	Maximum (nmol/l)	p
1	ráno	0.19	0.00	0.76	0.59
	odpoledne	0.12	0.00	0.53	
2	ráno	0.58	0.44	1.40	0.47
	odpoledne	0.57	0.33	0.93	
3	ráno	0.69	0.52	1.40	0.54
	odpoledne	0.74	0.22	2.12	
4	ráno	0.90	0.37	1.49	0.31
	odpoledne	0.61	0.37	1.04	

4.1.4 DHEAS

Pro první část experimentu byl naměřen pro ranní skupinu medián 0.01 nmol/l, pro odpolední 0.11 nmol/l. Po uvedení do anestezie byl medián 0.83 nmol/l pro ranní a 0.10 nmol/l pro odpolední skupinu. U třetí části experimentu byl ranní medián 0.65 nmol/l, odpolední 0.10 nmol/l. U čtvrtého odběru byl medián 0.11 nmol/l u ranní, 0.13 nmol/l u odpolední skupiny. Také pro tento marker jsme tedy Mann-Whitney testem neprokázali cirkadiánní rytmus u DHEAS pro všechny části experimentu ($p > 0.05$) u našeho experimentálního modelu.

Tab. 4: Medián, minimum, maximum a Mann-Whitney test pro 2 závislé výběry (ranní a odpolední skupina) koncentrace DHEAS

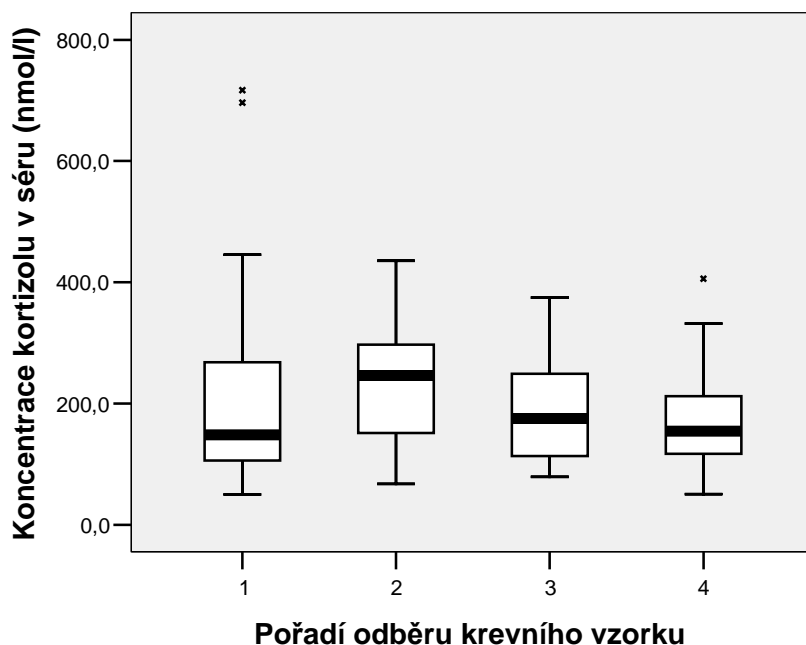
Pořadí odběru	Skupina	Medián (nmol/l)	Minimum (nmol/l)	Maximum (nmol/l)	P
1	ráno	0.01	0.00	0.14	0.31
	odpoledne	0.11	0.00	0.14	
2	ráno	0.83	0.02	0.18	0.38
	odpoledne	0.10	0.00	0.26	
3	ráno	0.65	0.00	0.23	0.32
	odpoledne	0.10	0.07	0.20	
4	ráno	0.11	0.07	0.19	0.40
	odpoledne	0.13	0.07	0.25	

4.2. Experiment 2: Liší se hladiny stresových markerů naměřených během katetrizace s bazální hladinou?

Stejně jako u předchozího experimentu, vykazují naměřené hodnoty velký rozptyl, což ukazuje na značné interindividuální rozdíly hladin testovaných markerů. Hodnotili jsme mediány, aby se eliminoval vliv odlehlých naměřených hodnot. Pro názornost jsme výsledky zpracovali graficky v krabicových grafech (obr. 2-5). Výsledky jsou hodnoceny pro každý marker samostatně.

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 až ke svým nejnižším hodnotám u čtvrtého odběru, až k hodnotám velmi blízkým hodnotám bazálním. Friedmanův test byl pro tyto 4 odběry staticky významný, na hladině významnosti 0.05 ($p < 0.05$).

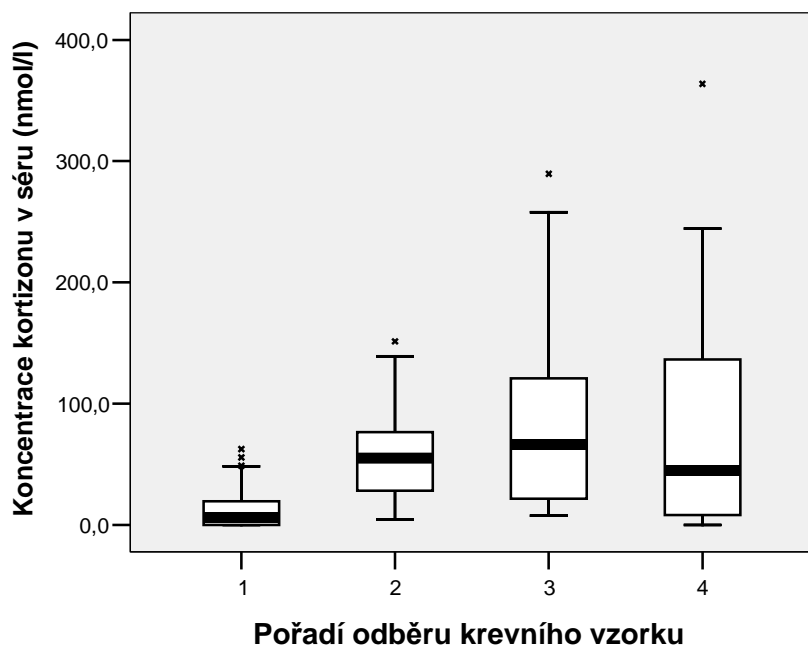


Obr. 2: Grafické znázornění koncentrace kortizolu v séru ve 4 testovaných částech experimentu. Hranice boxu ukazují 50% naměřených hodnot markeru, medián je vyznačen tlustou linkou uvnitř boxu, tykadla ukazují 25% naměřených hodnot, odlehlé hodnoty jsou znázorněny hvězdičkou.

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 až ke svému maximu během třetí fáze experimentu (66.12 nmol/l), poté hladiny klesaly, ale ne k bazálním hodnotám, naměřené hodnoty byly přibližně sedmkrát vyšší než bazální.

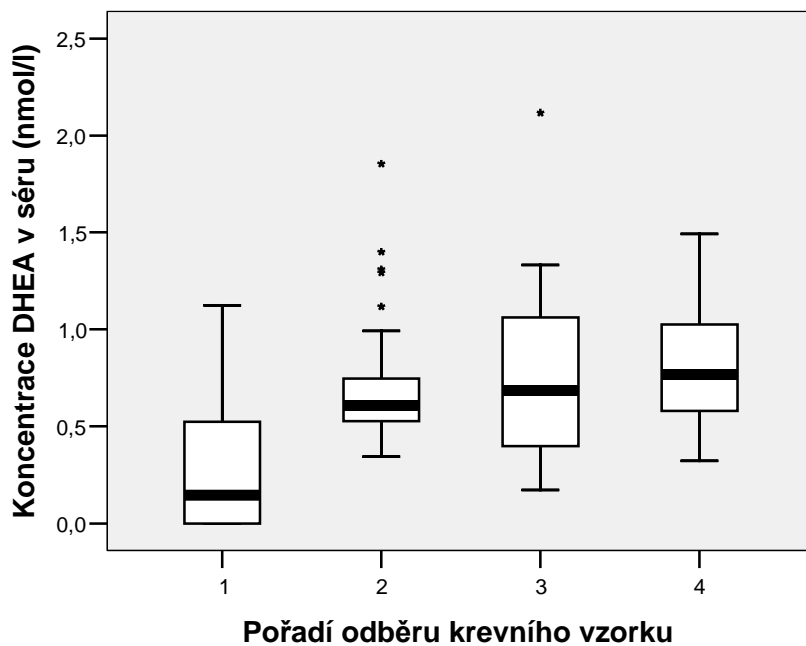
Friedmanův test byl statisticky významný na hladině významnosti 0.001 ($p < 0.001$).



Obr. 3: Grafické znázornění koncentrace kortizonu v séru ve 4 testovaných částech experimentu. Hranice boxu ukazují 50% naměřených hodnot markeru, medián je vyznačen tlustou linkou uvnitř boxu, tykadla ukazují 25% naměřených hodnot, odlehlé hodnoty jsou znázorněny hvězdičkou.

4.2.3 DHEA

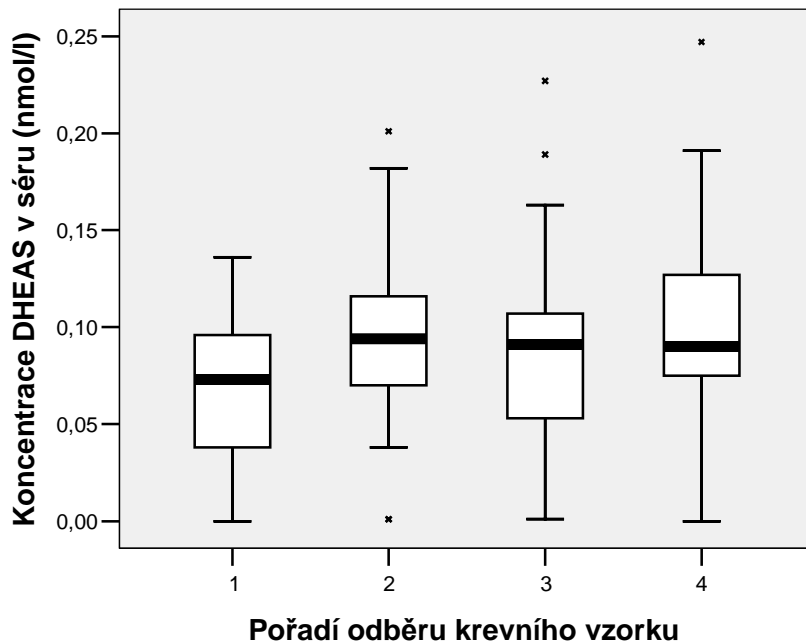
Nejnižší hladiny DHEA v krevním séru jsme zaznamenali na začátku experimentu (0.15 nmol/l), poté hladiny prudce stoupaly až ke svému maximu ve čtvrté části katetrizačního výkonu, těsně před ukončením experimentu (0.76 nmol/l). Friedmanův test byl statisticky významný na hladině významnosti $p < 0.001$.



Obr. 4: Grafické znázornění koncentrace DHEA v séru ve 4 testovaných částech experimentu. Hranice boxu ukazují 50% naměřených hodnot markeru, medián je vyznačen tlustou linkou uvnitř boxu, tykadla ukazují 25% naměřených hodnot, odlehle hodnoty jsou znázorněny hvězdičkou.

4.2.4 DHEAS

Mediány koncentrace DHEAS byly přibližně 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 ($p < 0.05$).



Obr. 5: Grafické znázornění koncentrace DHEAS v séru ve 4 testovaných částech experimentu. Hranice boxu ukazují 50% naměřených hodnot markeru, medián je vyznačen tlustou linkou uvnitř boxu, tykadla ukazují 25% naměřených hodnot, odlehlé hodnoty jsou znázorněny hvězdičkou.

4.3 Experiment 3: Liší se hladiny stresových markerů v průběhu operačního výkonu?

Tento experiment je ve své podstatě jen rozšířením předešlého experimentu. Jak je naznačeno v metodické části, statisticky se hodnotily jen odběry během katetrizačního výkonu (první odběr se tedy do testu nepočítal). Chtěli jsme tak zjistit vliv úkonů prováděných během samotné katetrizace. Friedmanův test byl tedy počítán ze stejných hodnot jako u předešlého experimentu.

4.3.1 Kortizol

Nejvyšší hodnoty byly naměřeny ve druhé fázi experimentu, poté hodnoty klesaly.

Předpokládáme, že se tak dělo díky vlivu anestezie, 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 ($p < 0.05$).

4.3.3 DHEA

V rámci druhé až 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 našich experimentálních zvířat.

4.3.4 DHEAS

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

4.4 Experiment 4: Zjištění poměru kortizol/kortizon

Stejně jako u předchozích experimentů byl hodnocen medián (pro eliminaci vlivu odlehlých hodnot a následnému zkruslení výsledku). 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 signifikantní na hladině významnosti 0.001 ($p < 0.001$).

Tab. 5: Medián, počet měření (n), minimum a maximum poměru koncentrací kortizol/kortizon u všech odběrů v průběhu experimentu.

Pořadí odběru	n	Medián	Minimum	Maximum	p
1	18	15.95	1.71	144.75	0.001
2	25	4.48	1.17	32.65	
3	25	2.61	0.44	17.37	
4	21	2.51	0.73	20.38	

5. Diskuze

5.1. Experiment 1: Stanovení diurnálního rytmu u prasat domácích podstupujících katetrizační výkon

V tomto experimentu jsme se snažili zjistit, zda námi testované markery u experimentálních zvířat, prasat domácích, vykazují cirkadiánní variabilitu a mění se jejich hladiny v průběhu dne. Prasata podstupovala srdeční katetrizaci, šlo tedy o měření během stresové zátěže. Jak je psáno v části Metodika (část 3.1, Experimentální zvířata), jednalo se o mladé, 12 týdnů staré, samice prasete domácího. Věk byl schválně stanoven prepubertální, aby se zamezilo vlivu estrálního cyklu a cyklické změně pohlavních hormonů na hladiny sledovaných markerů.

Je dobře známo, že prasata domácí vykazují cirkadiánní rytmus v koncentracích kortizolu (např. Barnett et al. 1981a, Becker et al. 1985a, b, Griffith a Minton 1991). Patří 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 vykazuje 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, hladiny markerů naměřených během ranních a odpoledních experimentů se statisticky významně nelišily, a to v žádné fázi experimentu (viz Metodika, část 3.2.3).

Možné příčiny tohoto jevu můžeme rozdělit do dvou skupin: příčiny (1) nespojené se stresem a (2) spojené se stresovým zatížením. Druhou skupinu pak je možné ještě rozdělit do několika podskupin: (2.1) stěhování do neznámého prostředí a následná sociální izolace; (2.2) hladovění; (2.3) transport z farmy do experimentální laboratoře; (2.4) katetrizace srdce. Nyní se budu zabývat každou z nastíněných možností.

Možnou nestresovou příčinou absence cirkadiánního 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 cirkadiánní rytmus (např. von Borell a Ladewig 1992, Ruis et al. 1997, deJong et al. 2000). Stejně tak, našli stabilní cirkadiánní rytmus s maximem v ranních hodinách a minimem večer, u prasat starých nejméně 20 týdnů (Ruis et al. 1997, deJong et al. 2000). Oproti těmto zjištěním, našel Ekkel et al. (1996) cirkadiánní rytmus u prasat starých osm týdnů.

V druhé skupině (důvody absence cirkadiánního rytmu spojené se stresovou reakcí) je možných příčin několik. Předpokládá se, že zvýšená hladina GC při stresové reakci, může

narušit nebo úplně zrušit diurnální rytmus. Stresovou reakci způsobují stimuly, které se nazývají souhrnně stresory – těmi může být vše, co aktivuje SAM a HPA osu a narušuje tím homeostázu organismu nebo welfare jedince (např. Janssens et al. 1994, Pol et al. 2002).

Experimentální zvířata jsou z domácí farmy v den konání experimentu transportována do laboratoře. Již den předtím se ale s prasetem začíná manipulovat a probíhají přípravy na pokus následujícího dne. Během této doby je prase vystaveno mnohým stresovým situacím, které mohou narušit diurnální rytmus (např. stres způsobený stěhováním do neznámého prostředí jiného kotce; sociální izolací; hladověním; transportem do laboratoře; atd.).

Na chovné farmě žila prasata ve skupině. Den před transportem do naší laboratoře bylo ale odděleno od ostatních a izolováno v samostatném kotci, který předem neznalo. Najednou se tedy ocitlo v pro něj neznámém prostředí, bylo vystaveno nezvyklému pachu, necítilo pach své skupiny a navíc bylo i bez ostatních zvířat, na která bylo zvyklé. Bylo tedy vystaveno velkému sociálnímu stresu. Obojí – tedy vystavení novému, neznámému prostředí (Dantzer a Morméde 1983, Becker et al. 1985a, Grandin 1997, Désautés et al. 1999) i sociální nestabilita s minimem sociálních kontaktů (Janssens et al. 1994, Ekkel et al. 1997, Ruis et al. 1997) může způsobit značný stres, tedy zvýšenou hladinu GC, která může narušit diurnální variabilitu GC. Oproti těmto názorům, Geverink et al. (2003) našel vyšší hladinu GC u samic prasat ubytovaných ve skupině, než kontrolní skupiny, ve které bydlely samostatně. Janssens et al. (1995) našel narušený cirkadiánní rytmus po chronickém působení sociálního stresu.

Dalším možným stresorem je transport do experimentální laboratoře. Experimenty s transportem prováděl např. Becker et al. (1985b), při kterých zjistili, že transport může narušit diurnální rytmus u prasat domácích. Navíc jsou při transportu vystavena i sociální frustraci (Barnett et al. 1981b, Ruis et al. 1997), o které jsem se zmínila výše.

Kvůli anestézii následující den, není prase po přestěhování do samostatného kotce krmeno. Příjem jídla může mít vliv na koncentraci GC, zabývali se tím např. Geverink et al. (2003) nebo Hillmann et al. (2008), našli dokonce dva peaky v hladině GC, ráno a odpoledne, přesně v době, kdy byla zvířata zvyklá na podávání krmiva. Oproti těmto studiím, Barnett et al. (1981a) nenalezli odpolední peak ani v době předpokládaného krmení; zaznamenali jen dopolední zvýšenou hladinu GC. Hladovění je zcela jistě stresující prvek, proto může narušit, nebo úplně zrušit cirkadiánní rytmus.

Transport z domovské farmy do experimentální laboratoře je dalším stresovým faktorem, který může zvýšit hladiny GC (např. Becker et al. 1985b, Dalin et al. 1993, Averos 2007). Vyšší hladiny kortizolu měly samice prasat oproti samcům, a koncentrace kortizolu

byla závislá i na ročním období – vyšší hladiny byly v zimních měsících. Samozřejmě čím delší transport, tím vyšší hladiny kortizolu (Averos 2007).

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

U tohoto experimentu se kloníme k závěru, že absence cirkadiánního rytmu je způsobena především nevyzrálostí HPA osy u našich prepubertálních experimentálních zvířat. Cirkadiánní rytmus může být také ovlivněn procedurami, kterými zvíře 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 cirkadiánního rytmu. Při zkoumání vlivu stresu na jedince je důležité nejen sledovat absolutní hodnoty GC, ale také to, jestli je nebo není negativně poznamenán diurnální rytmus testovaných jedinců (deJong et al. 2000).

5.2 Experiment 2 a 3: Liší se hladiny stresových markerů naměřených během katetrizace s bazální hladinou; liší se hladiny během samotného operačního výkonu?

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

U těchto experimentů jsme se zaměřili na porovnání hladin měřených markerů v různých, předem definovaných, fázích pokusu. První hodnota byla měřena den před pokusem, ještě na domácí farmě, před započítím všech procedur, potřebných k přípravě zvířete na experimentální proces. Předpokládali jsme nejnižší hodnotu u všech parametrů, protože zvířata byla měřena v podmínkách, na které jsou běžně zvyklá. Výsledky náš předpoklad potvrdily, jednalo se opravdu o nejnižší hodnoty měřených markerů, proto můžeme hodnotu odběru na farmě považovat za bazální, tedy nezatíženou zvýšeným akutním stresem zvířat. Předpokládali 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 zpět k hodnotám blízkým bazálním, je pravděpodobné, že do procesu regulace HPA osy zasáhly úkony, které modulují (případně narušují) její činnost (například anestezie a medikace tišící bolest při výkonu).

V našem experimentu byla jako anestezie použita kombinace Propofolu a Morfinu, podávaných nitrožilně. Anestezie zmírňuje nežádoucí vlivy operace, tlumí bolest a tím i sekreci katecholaminů, glukokortikoidů a zmírňuje tak stresovou reakci. Propofol je pro svou povahu (viz část Úvod, 1.4) vhodný jako anestetikum pro krátkodobé operační výkony, mezi které srdeční katetrizace bezpochyby patří. Ke zmírnění bolesti byl použit opiát (Morfin). Podle mnoha autorů vede tato kombinace ke snížení vyplavení katecholaminů i glukokortikoidů, nejspíš synergickou reakcí Propofolu a opiátu na hypothalamické receptory, a potlačují tak aferentní bolestivé stimuly a snižují tedy vyplavení CRH a následně snížení aktivity celé HPA osy (tedy i ACTH a GC) (Marana et al. 2010). 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 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 nežádoucími vlivy akutního stresu (Kimonides et al. 1998, 1999, Charney 2004, Morgan et al. 2004, Maninger et al. 2009, 2010).

Prasata podstupovala experimentální srdeční katetrizaci. Je to zákrok, který patří mezi minimálně 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 zatěžující zákrok 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. zvolená anestezie, medikace na 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) (Vogesser et al. 2003). Koncentrace kortizonu v tomto pokusu byla nejnižší při prvním odběru a poté rostla, až dosáhla svého maxima u třetí 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 11β -HSD2 (důležitého regulačního faktoru přeměny kortizolu v kortizon a naopak), je vyšší hladina kortizonu (oproti bazálním hladinám na počátku experimentu) způsobena nejspíš rapidním snížením koncentrace kortizolu v průběhu samotného operačního výkonu po podání anestezie. Kortizol, který byl ve zvýšené míře vyplaven v těle prasete před začátkem experimentu a je nyní v jejich organismu tedy „přebytečný“ je enzymaticky přeměněn na kortizon, který není biologicky aktivní. Tím je vlivem anestezie zabráněno nežádoucím vlivům působení kortizolu a tím i akutního stresu.

5.3 Experiment 4: Zjištění poměru kortizol/kortizon

Na kortizon můžeme nahlížet jako na inaktivní formu kortizolu, ale také, jak již bylo zmíněno dříve, představuje rezervní pool kortizolu v době, kdy je ho v organismu třeba ve zvýšené míře (například u stresové odpovědi, nebo fyziologicky během změn koncentrací GC při diurnálním rytmu). Poměr kortizol/kortizon reguluje isoenzym 11β -HSD, který přeměňuje pomocí redukce kortizon v kortizol (11β -HSD1) a naopak oxidací mění kortizol v kortizon (11β -HSD2). V tomto ohledu je nejspíš nejdůležitější regulace tímto enzymem jednak v ledvinách (izoformou 11β -HSD2), kde svou zvýšenou činností inaktivuje kortizol a zároveň zvýšenou aktivitou 11β -HSD1 v játrech, která naopak působí obnovením kortizonu (Vogeser et al. 2003).

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 způsobená zvýšenou aktivitou 11β -HSD2 a kortizol, který byl secernován ve zvýšené míře musí být najednou inaktivován, tím pádem přeměněn na svou inaktivní formu, kortizon (Vogeser et al. 2003).

6. Závěr

6.1. Experiment 1: Stanovení diurnálního rytmu u prasat domácích podstupujících katetrizační výkon

U tohoto experimentu jsme zjistili, že koncentrace námi měřených markerů mezi skupinami, které podstupovaly srdeční katetrizaci ráno a odpoledne, se neměnily statisticky významně ($p > 0.05$), a to v žádné části experimentu. Z toho můžeme usuzovat, že ranní a odpolední hladiny markerů se statisticky významně nemění; nenalezli jsme tedy předpokládaný cirkadiánní rytmus u takto starých prasat domácích. Předpokládáme, že největší podíl na absenci cirkadiánního rytmu má nevyzrálость HPA osy a že tedy cirkadiánní rytmus neměla naše zvířata ještě pevně stabilní a funkční. Výsledky ale mohou naznačit také skutečnost, že stresová zátěž není vyšší u ranních nebo odpoledních katetrizací a načasování operace není tedy limitujícím faktorem u plánovaných srdečních katetrizačních výkonů.

6.2 Experiment 2 a 3: Liší se hladiny stresových markerů naměřených během katetrizace s bazální hladinou; liší se hladiny během samotného operačního výkonu?

V těchto dvou experimentech jsme testovali ve čtyřech předem stanovených částech pokusu hladinu stresových markerů, kortizolu, kortizonu a DHEA(S). Pro každý marker v každé části experimentu jsme spočítali neparametrický Friedmanův test. Pro všechny markery byla naměřena nejnižší hladina u prvního odběru, který byl odebrán ještě na domácí chovné farmě den před samotným katetrizačním výkonem. Tyto hladiny markerů jsme tedy mohli označit za bazální. Můžeme tedy říct, že prasata na své domácí farmě nejsou vystavena působení akutního stresu. Po tomto odběru hodnoty všech markerů rostou až k jejich maximu (kortizol má maximální hladinu ve druhé části experimentu, kortizon ve třetí, DHEA(S) až v závěru experimentu). Můžeme předpokládat, že adrenální sekrece kortizolu reaguje na úkony, které předcházejí vlastní katetrizaci a jsou pro zvíře stresující. Proto jsme naměřili nejvyšší 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 hladině kortizolu a zmírňují tak jeho účinky na organismus, působí tedy tak jako protiváha akutnímu stresu, kterému je zvíře během experimentu vystaveno.

6.3 Experiment 4: Zjištění poměru kortizol/kortizon

V tomto pokusu jsme testovali poměr koncentrací kortizolu a kortizonu. Tento poměr byl nejvyšší 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 vyšší než bazální hladina). Předpokládáme, že poměr koresponduje s naším závěrem, který jsme provedli již u předešlých experimentů (Experiment 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. Tomu odpovídají i vypočítané hladiny poměru kortizol/kortizon. Tento poměr je užitečným parametrem ke studiu dynamiky stresové osy během stresové zátěže, kterou prodělaná katetrizační operace bezesporu je.

7. Seznam zkratk:

11 β -HSD - 11 β -hydroxysteroid dehydrogenáza

ACTH - adrenokortikotropní hormon

CBG – transkortin (corticoid binding globulin)

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

dex – dexametazon

DHEA - dehydroepiandrosteron

DHEAS – dehydroepiandrosteron sulfát

FNMT - fenylethanolamin-N-metyltransferáza

GABA_A receptor - receptor kyseliny γ -aminomáselné

GC – glukokortikoidy

GR - glukokortikoidní receptor

GREs - glucocorticoid response elements

HPA – hypothalamo- hypofyzární- adrenální systém

HPLC – High performance liquid chromatography

HR – srdeční rytmus

IM – intramuskulární

IV – intravenózní

MAP – střední arteriální tlak

MR – mineralokortikoidní receptor

NAD - Nikotinamid adenin dinukleotid

NADP(H) – Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

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

PCO₂ – výdechová kapnometrie

PLA₂ - fosfolipáza A₂

RCL – reactive centre loop

SAM – sympato- adreno- medulární systém

SCAD - short chain alcohol dehydrogenáza

SO₂ – saturace kyslíkem

TIVA – nitrožilní anestezie (total intravenous anesthesia)

8. Seznam citované literatury

- Averos, X., Herranz, A., Sanchez, R., Comella, J. X., Gosalvez, L. F. (2007) Serum stress parameters in pigs transported to slaughter under commercial conditions in different seasons. *Vet. Med.* **52**, 333–342.
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M., Chrousos, G.P. (1996) Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrinology* **17**, 245-261.
- 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, Robel, P. (1998) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 4089-4091.
- 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.
- Berdusco, E.T.M., Hammond, G.L., Jacobs, R.A., Grolla, A., Akai, K., Langlois, D., Challis, J.R.G. (1993)Glucocorticoid-induced increase in plasma corticosteroid-binding globulin levels in fetal sheep is associated with increased biosynthesis and alterations in glycosylation. *Endocrinology* **132**, 2001-2008.
- Bertram, C.E., Hanson, M.A. (2002) Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. *Reproduction* **124**, 459–467.

- Bessler, M., Whelan, R. L., Halverson, A., Treat, M. R., Nowygrod, R. (1994) Is immune function better preserved after laparoscopic versus open colon resection? *Surg. Endosc.* **8**, 881-883.
- Bičková, M., Tallová, J., Hill, M., Krausová, Z., Hampl, R. (2000) Serum concentrations of some neuroactive steroids in women suffering from mixed anxiety-depressive disorder. *Neurochem. Res.* **25**, 1623-1627.
- Boonstra, R. (2004) Coping with changing northern environments: The role of the stress axis in birds and mammals. *Integr. Comp. Biol.* **44**, 95–108.
- 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.
- Breuner, C.W., Orchinik, M. (2002) Beyond carrier proteins. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *J. Endocrinol.* **175**, 99–112.
- 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.
- Castro, W.L.R., Matt, K.S. (1997) The importance of social condition in the hormonal and behavioral responses to an acute social stressor in the male siberian dwarf hamster (*Phodopus sungorus*). *Horm. Behav.* **32**, 209–216.
- 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.
- Challis, J.R.G., Berdusco, E.T.M., Jeffray, T.M., Yang, I.K., Hammond, G.L. (1995) Corticosteroid-binding globulin (CBG) in fetal development. *Steroid Biochem. Molec. Biol.* **53**, 523-527.

- Charney, D.S. (2004) Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress. *Am J Psychiatry* **161**, 195-216.
- Dalin, A. M., Magnusson, U., Häggendal, J., Nyberg, L. (1993) The effect of transport stress on plasma levels of catecholamines, cortisol, corticosteroid-binding globulin, blood cell count, and lymphocyte proliferation in pigs. *Acta Vet. Scand.* **34**, 59-68.
- Dallman, M.F. (2003) Stress by any other name . . .? *Horm. Behav.* **43**, 18–20.
- Dantzer, R., Mormède, P. (1983) Stress in farm animals: a need for re-evaluation. *J. Anim. Sci.* **57**, 6-18.
- Davies, E., MacKenzie, S.M. (2003) Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **30**, 437-445.
- 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.
- DeVries, A.C., Glasper, E.R., Detillion, C.E. (2003) Social modulation of stress response. *Physiol. Behav.* **79**, 399– 407.
- 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., Dieleman, S. J., Schouten, W. G. P., Portela, A., Cornélissen, G., Tielen, M. J. M., Halberg, F. (1996) The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs. *Physiol. Behav.* **60**, 985-989.
- 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**, 29–41.
- 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**, 249–257.
- Greenberg, N., Carr, J. A., Summers, C. H. (2002) Ethological cause and consequences of the stress response. *Integr. Comp. Biol.* **42**, 508-516.
- 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.
- Heo, J., Kattesh, H.G., Roberts, M.P., Schneider, J.F. (2003) Plasma levels of cortisol and corticosteroid binding globulin (CBG) and hepatic CBG mRNA expression in pre- and postnatal pigs. *Domest. Anim. Endocrinol.* **25**, 263–273.
- Hillmann, E., Schrader, L., Mayer, C., Gyax, L. (2008) Effects of weight, temperature and behaviour on the circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs. *Animal* 2, 405–409.
- 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) Kůra nadledvin. In: *Stres. Patofyziologie – endokrinologie – 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**, 48–54.
- 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.
- Janssens, C.J.J.G., Helmond, F.A., Wiegant, V.M. (1995) The effect of chronic stress on plasma cortisol concentrations in cyclic female pigs depends on the time of day. *Domest. Anim. Endocrinol.* **12**, 167-177.
- Kattesh, H.G., Brown, M.E., Masincupp, F.B., Schneider, J.F. (1996) Protein-bound and unbound forms of plasma cortisol in piglets after castration at seven or 14 days of age. *Res. Vet. Sci.* **61**, 22-25.
- Keay, J.M., Singh, J., Gaunt, M.C., Kaur, T. (2006) Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species: a literature review. *J. Zoo. Wildl. Med.* **37**, 234–244.
- Kelbel, I., Weiss, M. (2001) Anaesthetics and immune function. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **14**, 585-691.
- 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.

- Klieber, M.A., Underhill, C., Hammond, G.L., Muller, Y.A. (2007) Corticosteroid-binding globulin, a structural basis for steroid transport and proteinase-triggered release. *J. Biol. Chem.* **282**, 29594–29603.
- Korte, S.M., Koolhaas, J.M., Wingfield, J.C., McEwen, B.S. (2005) The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **29**, 3–38.
- 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.
- Krieger, D.T., Hauser, H. (1978) Comparison of synchronization of circadian corticosteroid rhythms by photoperiod and food.(temperature/phase shift). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1577-1581.
- Krzych, L.J., Szurlej, D., Bochenek, A. (2009) Rationale for propofol use in cardiac surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **23**, 878-85.
- Künzl, C., Kaiser, S., Meier, E., Sachser, N.(2003) Is a wild mammal kept and reared in captivity still a wild animal? *Horm. Behav.* **43**, 187–196.
- Künzl, C., Sachser, N. (1999) The behavioral endocrinology of domestication: a comparison between the domestic guinea pig (*Cavia aperea* f. *porcellus*) and its wild ancestor, the cavy (*Cavia aperea*). *Horm. Behav.* **35**, 28–37.
- Lamers, W.H., Mooren, P.G., Grep, H., Endert, E., Degenhart, H.J., Charles, R. (1986) Hormones in perinatal rat and spiny mouse: relation to altricial and precocial timing of birth. *Am. J. Physiol.* **14**, E78-E85.
- 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.
- Lepschy, M., Touma, C., Hruby, R., Palme, R. (2007) Non-invasive measurement of adrenocortical activity in male and female rats. *Lab. Anim.* **41**, 372-387.

- Lombes, M., Kenouch, S., Souque, A., Farman, N., Rafestin-Oblin, M.E. (1994) The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* **135**, 834-40.
- 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., Colicci, S., Meo, F., Marana, R., Proietti, R. (2010) Neuroendocrine stress response in gynecological laparoscopy: TIVA with propofol versus sevoflurane anesthesia. *J Clin Anesth* **22(4)**, 250-255.
- 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**, 425-441.
- Monclús, R., Rödel, H.G., Palme, R., Von Holst, D., de Miguel, J. (2006) Non-invasive measurement of the physiological stress response of wild rabbits to the odour of a predator. *Chemoecology*, **16**, 25-29.

- 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**, 67–74.
- 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**, 320–327.
- 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.
- Pol, F., Courboulay, V., Cotte, J.P., Martrenchar, A., Hay, M., Mormède, P. (2002) Urinary cortisol as an additional tool to assess the welfare of pregnant sows kept in two types of housing. *Vet. Res.* **33**, 13-22.
- Romero, L.M. (2002). Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **128**, 1–24.
- Romero, L.M. (2004) Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends. Ecol. Evol.* **19**, 249-255.
- Rosen, F., Harding, H.R., Milholland, R.J., Nichol, C.A. (1963) Glucocorticoids and Transaminase Activity VI. Comparison of the adaptive increases of alanine- and tyrosin- α -ketoglutarate transaminases. *J. Biol. Chem.* **238**, 3725-3729.
- 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.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* **21**, 55-89.
- 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.
- Schumacher, M., Akwa, Y., Guennoun, R., Robert, F., Labombarda, F., Desarnaud, F., Robel, P., De Nicola, A.F., Baulieu, E.E. (2000) Steroid synthesis and metabolism in the nervous system: trophic and protective effects. *J. Neurocytol.* **29**, 307-326.
- Seckl, J. R. (1997) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front. Neuroendocrinol.* **18**, 49-99.
- Selye, H. (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* **138**, 32.
- 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.
- Šimůnková, K., Stárka, L., Hill, M., Kříž, L., Hampl, R., Vondra, K. (2008) Comparison of total and salivary cortisol in a low-dose ACTH (Synacthen) test: influence of three-month oral contraceptives administration to healthy women. *Physiol. Res.* **57**, 193-199.
- Tomlinson, J.W., Stewart, P.M. (2001) Cortisol metabolism and the role of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **15**, 61-78.
- Touma, C., Sachser, N., Möstl, E., Palme, R. (2003) Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* **130**, 267-278.
- 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.
- Waiblinger, E., König, B. (2004) Refinement of gerbil housing and husbandry in the laboratory. *Anim. Welf.* **13**, 229-235.
- Weingrill, T., Gray, D.A., Barrett, L., Henzic, S.P. (2004) Fecal cortisol levels in free-ranging female chacma baboons: relationship to dominance, reproductive state and environmental factors. *Horm. Behav.* **45**, 259- 269.

- 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 β -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**, 69–76.