

Mgr Lenka ŘEZÁČOVÁ

**Vliv kortikoliberinu a kortikosteronu
na poškození hipokampu
a jejich vztah ke kognici**

Disertační práce

Univerzita Karlova v Praze

II. lékařská fakulta

Fyziologie a patofyziologie

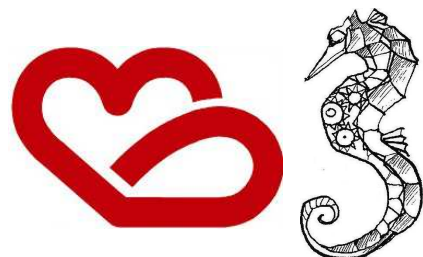
člověka



Akademie věd České republiky

Fyziologický ústav

Neurofyziologie paměti



Praha 2012

Autor práce: **Mgr Lenka Řezáčová**

Vedoucí práce: **Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc**

Oponenti práce: **Prof. RNDr. Jiří Mejsnar, DrSc.**

MUDr. Marek Šusta, Ph.D., MBA

Datum obhajoby: 20. září 2012

Bibliografický záznam

Řezáčová, Lenka. *Vliv kortikoliberinu a kortikosteronu na poškození hipokampu a jejich vztah ke kognici*. Praha: Univerzita Karlova, II. lékařská fakulta, Fyziologie a patofyziologie člověka, 2012. 62 stran (+ přílohy 31 stran). Vedoucí disertační práce Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Anotace

Disertační práce „Vliv kortikoliberinu a kortikosteronu na poškození hipokampu a jejich vztah ke kognici“ pojednává o kognitivních, behaviorálních a histologických změnách u pokusných potkanů kmene long-evans, které blíže osvětlují důsledky dlouhodobé kontinuální aplikace kortikoliberinu a/nebo kortikosteronu. Testování behaviorálních změn bylo rozloženo do dvou fází. První - během tří resp. čtyřtýdenního podávání hormonů a tedy do doby jejich časných účinků a do druhé fáze následující po čtyřech týdnech od ukončení fáze první v době možných pozdních účinků. Ve dvanáctém týdnu byla pokusná zvířata usmrcena a u skupiny, která měla exogenně zvýšený kortikosteronem, byly sledovány a měřeny morfologické změny hipokampu. U všech experimentálních skupin byla zjištěna alterace chování. Byly nalezeny histologické i morfologické změny mozku. Rozvržení experimentů do dvou testovacích fází umožnilo odlišení časných změn a změn pozdních a přetrvávajících. Uspořádání i volba testů dovolily porovnat samostatný vliv jednotlivých podávaných látek (kortikoliberinu a kortikosteronu) a také jejich soupůsobení a biologické odezvy na ně. Použití širší palety behaviorálních testů usnadnilo odhalení i subtilních změn, které by některé samostatné testy neodhalily.

Annotation

Dissertation "The influence of corticosterone and corticoliberin on damage of the hippocampus and their relation to cognition" deals with the cognitive, behavioral and histological changes in experimental rat strain long-evans that closer describe the consequences of long-term continuous application of corticoliberin and/or corticosterone. Testing of the behavioral changes was divided into two phases. The first one - within three or four-weeks respectively administration of these hormones, therefore until their early effects - and the second phase – after four weeks of completion of the first phase at the time of the possible late effects. In the twelfth week the experimental animals were killed and in the group which had exogenously elevated corticosterone, the morphological changes in the hippocampus were monitored and measured. In all experimental groups alteration of behavior was observed. Histological and morphological changes in the brain we have found. Layout of experiments in two testing phases allowed differentiation of the early changes and the late and persistent changes. The arrangement of experiments allowed the choice of tests to compare not only individual effects of both hormones (corticoliberin and corticosterone) but also their coactioning and biological responses to them. Using a wider range of behavioral tests facilitate the detection of subtle changes, that some individual tests not reveal.

Klíčová slova

Kortikoliberin, CRH, kortikosteron, hipokampus, chování, behaviorální testy, kognice, morfologie, mozek, potkan

Keywords

Corticoliberin, CRH, corticosterone, hippocampus, behavior, behavioral tests, cognition, morphology, brain, rat

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracovala samostatně a použila jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato disertační práce byla umístěna v Ústřední knihovně UK a používána ke studijním účelům. Z této práce je možno čerpat jen s uvedením citace.

V Praze, květen 2012

Mgr Lenka Řezáčová

Chci – jaksi před závorkou – vyjádřit vděčnost těm, na které se tak často zapomíná, tedy in memoriam mým experimentálním potkanům.

In vivo bych ráda poděkovala

školiteli **Prof MUDr Pavlu Marešovi DrSc** za vedení mé postgraduální práce i za náměty k zamyšlení.

RNDr Aleši Stuchlíkovi PhD vedoucímu oddělení Neurofyzologie paměti děkuji za možnost vypracovat tuto práci na našem oddělení a za cenné rady a připomínky.

Dále děkuji kolegům z oddělení **RNDr Karlu Valešovi PhD**, **RNDr Janu Svobodovi PhD** i **Mgr Tomáši Petráskovi** za přátelský přístup a za pomoc při vzniku této práce.

V neposlední řadě jsem vděčná schopné, obětavé a svědomité laborantce našeho oddělení **Michaele Fialové** za její precizní práci a za šetrné a milé zacházení se zvířaty.

Doc MUDr Přemyslu Pinskerovi DrSc vděčím za vstřícnost, ochotu a cenné odborné rady.

Nechci opominout ani Endokrinologický ústav, kde probíhalo stanovení hladin hormonů a poděkovat za milé jednání a operativní spolupráci současné ředitelce ústavu - **Doc RNDr Běle Bendlové CSc** a **RNDr Marii Bičíkové**.

A zvláště ráda děkuji **Prof MUDr et RNDr Luboslavu Stárkovi DrSc** za pochopení, přátelský přístup, cenné rady a další profesní nasměrování a podporu v životních cílech.

Přeji si také vyjádřit vděčnost všem svým blízkým a inspirujícím lidským faktorům.

OBSAH	
POJMY A ZKRATKY	4
PROBLEMATIKA	5
Řídicí nadsystém.....	5
HHA osa a její poruchy.....	6
HHA osa, hipokampus, stres a paměť.....	7
CRH, neuronální síť a kognice	8
CRH a experimenty.....	9
Kortikosteron a experimenty.....	10
Kortikosteron, hipokampus – paměť.....	12
Kortikosteron, choroby, hipokampus – volumetrie.....	13
Kortikosteron, hipokampus – histologie a morfologie	14
Kortikosteron, hipokampus – pravolevá asymetrie (lateralita) .	16
CÍLE	17
Cíl.....	17
Hypotéza.....	17
Otázky	18
METODIKA	19
Zvířata	19
Skupiny	19
Aplikované látky	20
Přípravky	20
Anestezie	20
Chirurgické techniky.....	21
Behaviorální metodiky	22
Histologické a morfologické stanovení	24
Stanovení hladin hormonů	25
Užité statistické metody.....	25
Časové schema experimentu.....	25
VÝSLEDKY	26
Skupina [↑CRH].....	26
Skupina [↑CRH ↑CS].....	28
Skupina [↑CS]	32
DISKUSE	36
Model	36
Aplikované hormony.....	37
Behaviorální metodiky	38
Výsledky behaviorálních testů - po skupinách.....	41
Histologie, volumetrie	46
Shrnutí diskuse	47
ZÁVĚRY	49
SOUHRN	51
SUMMARY	53
LITERATURA	55
PŘÍLOHY	62
Seznam příloh	62

POJMY A ZKRATKY

Chování – je soubor všech vnějších projevů organismu

Kognice – souhrn nervových procesů, které se jeví jako schopnost organismu reflektovat objektivní realitu vnějšího i vnitřního prostředí

Orientace – schopnost organismu vnímat a používat prostorovou informaci

alotetická – z vnějšího prostředí (exogenní)

idotetická – z vnitřního prostředí organismu (endogenní)

Paměť – (biotická) je funkce neuronálních sítí a jeví se jako schopnost ukládat, uchovávat a vybavovat nemateriální informace

pracovní – (syn. operační) je schopnost zapamatovat si informaci po několik minut (například přesnou polohu ostrůvku v úloze v MWM). Je realizována funkčními změnami na synapsích dosud bez změn strukturálních. Je podtypem krátkodobé paměti.

krátkodobá paměť – je schopnost zapamatovat si informaci po řádově několik hodin. Není ještě příliš závislá na proteinové strukturální remodelaci synapsí.

dlouhodobá paměť – je schopnost zapamatovat si informaci od řádově několika hodin až ev. do smrti. Je plně závislá na proteosyntéze a tedy na strukturální remodelaci synapsí a neuronálních sítí.

Učení – je schopnost ukládání a používání dříve získaných nemateriálních informací

AAPA (active allothetic place avoidance) – úloha aktivního alotetického vyhýbání se místu

ACTH (adreno-cortico-tropic hormone) – adrenokortikotropní hormon

CS (corticosterone) – kortikosteron (u potkana, u člověka kortizol)

CRH (corticotropin-releasing hormone) – kortikoliberin

CTA (conditioned taste aversion) – podmíněná chuťová averze

HHA osa – hypothalamo-hypofyzo-adrenální osa

i.c.v. – intracerebroventrikulárně

i.p. – intraperitoneálně

MWM (Morris water maze) – úloha v Morrisově vodním bludišti

PROBLEMATIKA

Od prvopočátku vzniku života jsou biologické systémy závislé na schopnosti adekvátně interagovat s vnějším prostředím a přizpůsobovat se v rámci svých možností jeho změnám. U mnohobuněčného organismu musí být buňky nekomunikující přímo s okolním prostředím dostatečně přesně a rychle informovány o vnějším prostředí a jeho změnách, aby organismus mohl reagovat na podnět přicházející z jeho okolí adekvátně, synchronně a rychle. Tato schopnost se ve fylogenezi stává postupně složitější a komplexnější.

V evoluci živočichů se postupně objevily, osvědčily a rozvinuly tři řídicí systémy, které informace z vnějšího i vnitřního prostředí zprostředkují a koordinují i odpovědi na ně. U nejnižších postačuje řízení humorální, brzy po té ve fylogenezi přibýlo řízení nervové (láčkovci a vyšší) a později i systém udržující integritu organismu – imunitní (na rozdíl od rezistence), který se v užším smyslu slova nachází až u obratlovců (např. žab) (ROMER 1962). Tyto tři systémy u obratlovců tvoří vzájemně propojený a komunikující řídicí nadsystém. Tento trojitý nadsystém reguluje relativní dynamickou stálost a integritu vnitřního prostředí – homeostázu. Výkyv mimo normální hranice znamená patický stav. Vybočení za zvládnutelné meze je letální. Studium řídicích systémů a jejich vazeb má význam nejen pro teoretické poznání jejich normální struktury a funkcí, ale i pro pochopení jejich klinicky významných patických stavů.

Řídicí nadsystém

Jednou ze složek regulačního nadsystému je i (kortex-)hypothalamo-hypofyzo-adrenální (HHA) osa. (Viz ŘEZÁČOVÁ 2007.) Tato osa zprostředkuje vybalancování reakcí organismu na změny vnějšího prostředí (krátkodobé i dlouhodobé). Její základní struktura a principy zůstávají ve fylogenezi obratlovců a člověka stálé a rozvíjejí se, protože schopnost organismu adekvátně reagovat na tlak prostředí a stresory může

být klíčovým prostředkem odolání měkkému a především tvrdému přírodnímu výběru. Organismy, které tuto schopnost nemají rozvinutou dostatečně, neobstojí v konkurenci ostatních. Protože tato osa má základní význam v odpovědi organismu na stresové situace, nazývá se někdy též stresovou osou. Ve fylogenezi obratlovců je tato osa pravděpodobně jednou z hlavních, ne-li nejdůležitějších složek podílejících se na řízení vnitřních procesů i na řízení vnějších projevů organismu – chování. Změny v systému se projevují jako změny funkční i strukturní.

V posledních desetiletích se dosti prohloubily vědomosti v oblasti neurobiologie a humorálních systémů a jejich vzájemného propojení. Hlubší porozumění patickým procesům umožňuje hledání nových terapeutických prostředků a postupů. Významný pokrok zaznamenal výzkum poruch na rozhraní neurologie a psychiatrie (psychogenní stres, posttraumatická stresová porucha, některé typy demencí, kognitivní poruchy při léčbě kortikoidy aj.). (HÁJEK 2002)

HHA osa a její poruchy

Hlavními funkcemi HHA osy je (1) ve fetálním období ovlivnění vývoje parenchymatózních orgánů (plíce, játra) a střeva, (2) udržování stálé glykémie, (3) modulace řady imunitních funkcí a (4) udržování srdečního a cévního tonu (MAJZOUB 2006).

Teoreticky může být osa porušena na každé z jejích úrovní nebo na několika úrovních současně. Příčinou může být porucha funkce (např. vstupních signálů, sekrece hormonů, zpětné vazby) nebo struktury (např. neurodegenerace, léze, tumor). Poruchy se mohou projevovat v oblasti behaviorální, morfologické, biochemické a jiných. Tyto poruchy mohou být během života získané, vrozené a dědičné. HHA osu a její patologie lze studovat u lidí (pacienti a dobrovolníci) a na modelech (biotické a umělé). Výzkum normální funkce osy a její experimentální ovlivnění přispívá k poznání a tím i k léčbě patologií – funkcí a eventuálně i struktur – této osy. (KLENEROVÁ, HYNIE 2002)

Stresová situace spouští stresovou neuroendokrinní kaskádu. Stres poprvé definoval a popsal H. SELYE (1936). Stresor působí přes analyzátoři prostřednictvím mozkové kůry na hypotalamus, jehož neurony začnou secernovat kortikoliberin (corticotropin-releasing hormone - CRH) do portálního oběhu hypofýzy. Adenohypofýza přijatý signál z hypotalamu zesiluje a převádí ho prostřednictvím adrenokortikotropního hormonu (adreno-cortico-tropic hormone - ACTH) po dráze velkého krevního oběhu na cílový orgán - nadledviny. Kůra nadledvin přijatý signál znovu zesílí a uvolňuje glukokortikoidy (u člověka dominuje kortizol, u potkanů kortikosteron), které následně negativní zpětnou vazbou – cestou přes různé mozkové struktury (zjm. hipokampus (BROWN et al. 1999, FELDMAN, WEIDENFELD 1995) a amygdalu (SWAAB et al. 2005)) – tlumí tvorbu CRH. Podle jiných (TUVNES et al. 2003) však selektivní hipokampální léze aktivitu kůry nadledvin nezvyšuje. V řízení HHA osy hraje iniciační úlohu CRH. Pokud je stres malý nebo krátkodobý a organizmus je zdravý, nevyvolá působení stresoru patickou reakci. Naproti tomu nadhraniční a/nebo dlouhodobý stres způsobí nejen u nemocných a zesláblých jedinců delibraci (rozkolísání) HHA osy charakterizované zejména zvýšenou hladinou glukokortikoidů.

HHA osa, hipokampus, stres, paměť

Nadměrná expozice kortikoidům nebo ostatním faktorům osy může vést k poškození některých mozkových oblastí, zejména hipokampu. Hipokampus obsahuje nejvyšší koncentraci glukokortikoidových receptorů v mozku a to hraje rozhodující roli při negativní zpětné vazbě v HHA ose. (CHAUVEAU et al. 2010, PARKER, RAINEY 2004) Porušením hipokampu např. vysokými dlouhodobými hladinami kortikoidů se snižuje jeho tlumivý účinek na hypotalamus a hypofýzu. Tato situace vede k hyperaktivitě a k rozkolísání HHA osy. (HÖSCHL, HÁJEK 2001) Naproti tomu TUVNES et al. (2003) zjistil, že hipokampus není nezbytný pro zpětnovazebnou inhibici

kůry nadledvin a upozorňují, že je HHA osa inhibována také z jiných mozkových struktur.

Četné studie prokázaly, že stres v animálních modelech zhoršuje na hipokampu závislou prostorovou paměť testovanou ve vodním bludišti (MCEWEN, SAPOLSKY 1995, SANDI et al. 2005), v T-bludišti (BATS et al. 2001) i v radiálním bludišti (ELHAGE et al. 2006). Stres může také narušit rozhodovací funkce a jejich projevy, jako je flexibilita chování (MIZOGUCHI et al. 2000).

Dysfunkce HHA osy je narušení jejích hierarchických a zpětnovazebních vztahů a může vést kromě somatických změn i k závažným psychickým poruchám (viz dále). Zajímavou otázkou je vztah dysregulace osy a závislosti na tzv. „adrenalinových činnostech“ (VYSKOČIL 2005).

CRH, neuronální síť a kognice

CRH působí nejen specificky v adenohipofýze, ve významném množství se však nachází i v mozkomíšním moku a jiných tkáních, kde má nehipofyzotropní účinky. CRH a rodina příbuzných proteinů modulují kognitivní funkce a hrají důležitou roli v řízení činnosti neuronálních sítí aktivovaných při vybuzení emočních reakcí na podněty z vnitřního i vnějšího prostředí (BOSCH et al. 2009). CRH také moduluje synaptickou účinnost a učení a paměťové procesy závislé na hipokampu (HANSTEIN et al. 2008, HEINRICHS, KOOB 2004). CRH systémy představují rozhodující prostředek při regulaci HHA osy. Kromě toho existuje i mimohypothalamické CRH, které má důležitou úlohu v chování spojeném s úzkostí a strachem. (LUSSIER 2009) Již dříve bylo zjištěno, že stresem vyvolaná anhedonie je spojena se zvýšenou CRH genovou expresí v hypothalamu (DUNCKO et al. 2001). Na druhou stranu tvorba CRH v mozku je regulována i glukokortikoidy. V těchto procesech má rozhodující význam steroidní receptor koaktivátor 1 (LACHIZE et al. 2009). Tvorba CRH je v ose negativně zpětnovazebně regulována prostřednictvím

aktivace glukokortikoidových receptorů zvýšenou hladinou glukokortikoidů (SCHMIDT et al. 2009), zatímco stresem vyvolané adrenergní a glutamatergní excitační signály CRH gen aktivují (DUNCKO et al. 2003, KALIN et al. 1994).

Kortikoliberin má i jiné funkce v jiných místech organismu; má vliv na příjem potravy, reprodukci, růst, imunitu a vegetativní funkce a také vliv na chování (MAJZOUB 2006). CRH a jeho receptory jsou četné v centrálním nervovém systému a v různých periferních tkáních (GRAMMATOPOULOS, CHROUSOS 2002). CRH řídí adaptivní chování, které nastává během odpovědi na stres, ale jeho vysoké hladiny vedou k anxietě, poruchám spánku, narušení příjmu potravy, energetické rovnováhy a nepříznivým změnám metabolismu, kardiovaskulárních a imunitních funkcí (HEINRICHS, KOOB 2004). Během gravidity je HHA osa méně citlivá v důsledku snížení produkce CRH (RUSSELL et al. 2008). V lidské placentě je rovněž vytvářen CRH (BENDLOVÁ 2006), ten však produkci hypothalamického CRH tlumí (OKAMOTO et al. 1990). Dysfunkce systému CRH hraje patrně úlohu v různých neuropsychických a neuroendokrinních chorobách (GRAMMATOPOULOS, CHROUSOS 2002). Je prokázáno, že hladiny CRH jsou výrazně vyšší při některých poruchách CNS, např. v mozkomíšním moku depresivních pacientů (HARTLINE et al. 1996).

CRH a experimenty

Intracerebroventrikulárně podaný CRH u potkanů navodí po jednorázové aplikaci (FEKETE et al. 1985, DIAMANT, WIED 1993) zvýšení krevních hladin ACTH a následně kortikosteronu. Geneticky modifikované myši vykazující při stresu v celé CNS hyperexpresi genu CRH a mají následně stresem vyvolanou hypersekreci stresových hormonů, což zesiluje se stresem spojené chování – imobilitu při testu nuceného plavání aj. (DEUSSING et al. 2008).

U válečných veteránů trpících posttraumatickou stresovou poruchou ukázalo opakované vyšetřování hodnot CRH vysokou bazální hladinu této

látky v mozkomíšním moku ale současně normální vylučování volného kortizolu močí (BAKER et al. 1999), což se považuje za diagnosticky specifickou kombinaci.

Neurotoxitou CRH se zabývali CRAIGHEAD et al. (2000). Na základě pokusů na potkanech in vitro i in vivo dospěli k názoru, že CRH nepůsobí na nervové buňky toxicky přímo, ale poškození po vysokých dávkách je nepřímé a může být realizováno například účinkem na cévní zásobení.

Účinky CRH a vliv aktivace jeho receptorů na paměť a kognitivní funkce byly dosud studovány jen málo (REZACOVA et al. 2011).

Kortikosteron a experimenty

Hypothalamo-hypofyzo-adrenální osa je zkoumána zejména u pacientů s endokrinními poruchami s prokázaným onemocněním nadledvin, hypofýzy, hypothalamu, ale i mozkové kůry a jiných mozkových struktur a funkcí. (HÁJEK 2002) V poslední době je studováno i poškození periferních částí buněk reagujících na kortikoidy a také důsledky dlouhodobé léčby kortikoidními preparáty. (HÖSCHL, HÁJEK 2001)

Obecně se přijímá názor, že zvýšené kortikoidy – vlastní i do organismu uměle vpravené – působí negativní změny v centrálním i periferním nervovém systému. Tyto změny se projevují změnou chování, některých biochemických ukazatelů a také morfologickými změnami dokonce i v mozku. (Souhrnně viz ŘEZÁČOVÁ 2007.) Není ovšem jasné, zda kortikoidy působí na nervovou tkáň přímo (vlastní neurotoxicita zvýšených hladin kortikoidů) nebo prostřednictvím jiných faktorů.

Obecně se předpokládá, že neurodegenerativní změny lze přičíst jen dlouhodobě vysoce zvýšeným hladinám kortikoidů. Nicméně, každá složka neurochemické kaskády stresové odpovědi, zvláště v případě dysregulace HHA osy, může kvantitativně i kvalitativně ovlivnit různé složky chování. (REZACOVA et al. 2011)

Kortikosteron se podílí na strukturální a funkční integritě mozku, zejména hipokampu. Vliv kortikosteronu na učení a paměť je složitější. Kolísá v závislosti na výši hladiny kortikosteronu a délce působení; závisí také na charakteru učebního procesu, na organizaci učení a stavu paměti (KLENEROVA et al. 2002, ROOZENDAAL 2003).

Funkční a následně i eventuální strukturní patologii HHA osy nacházíme například u poruch spojených s vysokou hladinou kortikoidů v počátku onemocnění (posttraumatická stresová porucha (STEIN et al. 1997, YEHUDA et al. 1995, BREMNER et al. 1995, GURVITS et al. 1996.) nebo v průběhu nemoci (Cushingova choroba (STARKMAN et al. 1992) deprese (SHELIN et al. 1999), afektivní poruchy (NEMEROFF et al. 1992, ARANA et al. 1985), Alzheimerova demence (GREENWALD et al. 1986) a také skupiny poruch příjmu potravy (PAPEŽOVÁ et al. 2005) jako jsou neurotická anorexie, bulimie (GLUCK 2006)). V úvahu přichází také například stavy vynucující si dlouhodobé terapeutické podání vyšších dávek kortikoidů (transplantace, chronická kožní onemocnění (psoriasis)) (HÖSCHL et al. 2004).

Kortikoidy v normálním rozmezí hodnot jsou nezbytné pro učení a formování paměti (PAYNE, NADEL 2004). „Vysvětlení úlohy hipokampu jak v paměťových procesech tak současně v HHA ose spočívá v biologickém významu tohoto vzájemného funkčního propojení. Průnik těchto dvou soustav - systému nervového (konkrétně paměťové aktivity) a systému humorálního (konkrétně stresové reakce) - zajišťuje jejich koordinaci a vysokou biologickou efektivitu reakce organismu. Při působení stresoru dojde jednak k výlevu kortikoidů a následně stresové reakci a jednak k zapamatování kontextu, při kterém ke vzniku stresové odpovědi došlo. Paměťová stopa je přitom akcentována biologickou významností situace. Toto propojení umožní organismu buď se v budoucnu potenciálnímu stresoru vyhnout, nebo alespoň na něj reagovat rychleji a adekvátněji a tak minimalizovat jeho účinek.“ (ŘEZÁČOVÁ 2004)

Důsledkem dlouhodobého přetrvávajícího stresu mohou být neurodegenerativní změny, které později mohou vést k deficitům v paměti a kognici. (SWAAB et al. 2005). Negativní vliv dlouhodobého stresu na učení a paměť byl doložen u mnoha živočišných druhů, počínaje rybami, konče člověkem (HÖSCHL, HÁJEK 2001).

Pacienti trpící poruchami spojenými s vysokou hladinou glukokortikoidů vykazují statisticky významně horší výsledky v testech zaměřených na posouzení krátkodobé paměti ve srovnání s kontrolami (ALFAREZ et al. 2006, BRUNNER et al. 2005). Také animální modely ukazují, že expozice vysokým a/nebo dlouhodobým dávkám kortikoidů nebo intenzivnímu stresu vede mimo jiné k behaviorálním změnám (ZACH et al. 2011). Akutní podání kortikosteronu usnadňuje vytvoření podmíněné chuťové averze na novou neznámou chuť roztoku později asociovanou s příznaky otravy navozené následně podaným lithiumchloridem (KENT et al. 2002, TENK et al. 2006). Mezi akutními a oddálenými účinky expozice kortikosteronu existuje význačný rozdíl v ovlivnění kognitivních schopností. Předchozí studie ukázaly, že postižení prostorové pracovní paměti bylo patrné až po dlouhodoběji zvýšených hladinách kortikosteronu (COBURN-LITVAK et al. 2003). Nicméně, další studie ukázaly, že kortikosteron při dlouhodobé aplikaci zhoršuje jak paměť pracovní tak referenční (HOYER, LANNERT 2008). Mechanizmy poškození jsou neznámé, ale zdá se, že příčinou není aktuálně zvýšený kortikosteron. Je možné, že deficit je způsoben utlumením HHA osy (COBURN-LITVAK et al. 2003).

Kortikosteron, hipokampus - paměť

Důsledkem paticky změněné funkce osy – je-li tato změna dostatečně intenzivní a trvá-li dostatečně dlouhou dobu – může být změna funkce, histologie i morfologie dotčených struktur zejména mozku, ale nejen jeho. Tyto změny mohou být akutní a chronické, přičemž chronické změny se mohou objevit jako časně nebo jako pozdní a mohou mít charakter reverzibilní nebo ireverzibilní. (HÖSCHL et al. 2004)

Hipokampus má vysokou hustotu glukokortikoidových receptorů a glukokortikoidy proto mohou regulovat některé složky jeho plasticity. (KORZ, FREY 2003, DAGYTE et al. 2009, LUSSIER et al. 2009). Kortikosteron moduluje formování paměťové stopy zprostředkováním emocionálního kontextu. To zlepšuje na hipokampu závislé upevňování (konsolidaci) prostorové paměti. (MCGAUGH, ROOZENDAAL 2002) Proto se při vytváření a přetrvávání asociativní paměti zdá být nezbytná přítomnost kortikosteronu (BEYLIN, SHORS 2003). Na druhé straně řada studií dokumentuje negativní roli kortikosteronu v mozkových funkcích, a to zejména při učení a paměti (BELANOFF et al. 2001, HE et al. 2008).

Dlouhodobá aplikace vyšších dávek kortikosteronu vede k poškození hipokampu (SAPOLSKY 2000). Také jiní HE et al. (2008) popisují kortikosteronem vyvolané morfologické změny hipokampu, které korelují se zhoršeným učením ve vodním bludišti. I další práce ukazují, že dlouhodobé vystavení zvýšeným hladinám kortikosteronu vedlo u potkanů k deficitu prostorového učení (BODNOFF et al. 1995).

Kortikosteron, choroby, hipokampus - volumetrie

Pro funkční poruchy spojené se strukturami hipokampu je možno hledat patologicko-anatomický korelát volumetrickým měřením in vivo například pomocí nukleární magnetické rezonance nebo přímými mikroskopicko-počítačovými technikami hodnocení tkáňových řezů mozku. Zpravidla se měří absolutní velikost hipokampu. KOUKOLÍK (2002) shrnuje, že patogenetickým mechanismem atrofie hipokampu může být regrese dendritických systémů neuronů, numerická atrofie a předpokládat lze i útlum neurogeneze.

V klinické praxi může být příkladem funkčního, histologického i morfologického poškození cerebrálních struktur (zjm. hipokampu) působením abnormálních hladin kortikoidů asi polovina případů pacientů trpících depresí, dále pacienti s posttraumatickou stresovou poruchou a nemocní s Cushingovým syndromem (zvýšení produkce kortikosteroidů,

často v důsledku benigní či maligní hyperplazie kůry nadledvin) (SAPOLSKY 1996). Pacienti s chorobami spojenými s vysokou hladinou kortikoidů v počátku nebo v průběhu onemocnění vykazují vedle behaviorálních deficitů i statisticky významné zmenšení hipokampů ve srovnání s kontrolami (ALFAREZ et al. 2006, BRUNNER et al. 2005). STARKMAN et al. (1992) uvádí, že v měřeních, která provedli u pacientů s Cushingovým syndromem, koncentrace kortikoidů v plazmě negativně korelovala s objemem hipokampu a objem hipokampu pozitivně koreloval s výkony v paměťových testech. Někteří autoři (BREMNER et al. 2000) našli snížení absolutního objemu hipokampu, jiní (HÖSCHL et al. (2004) u 14 sledovaných osob a stejně například i HÁJEK et al. (2003)) tuto změnu nenalezli. Důkazy pro souvislost mezi nadprodukcí glukokortikoidů a zmenšením objemu hipokampu u lidí jsou, jak uvádějí HÁJEK et al. (2003), pouze nepřímé. Obdobný objemový úbytek u hipokampu po kortikoidech však BREMNER (2000) nezaznamenal u amygdaly ani mozku jako celku.

Z mnoha prací na zvířatech i lidech je dokládána negativní vazba mezi hladinami kortikoidů a hipokampálním objemem (SOUSA et al. 1998, TESSNER et al. 2007), i když některé studie u lidí tento názor nepodporují (MACLULLICH et al. 2005).

Kortikosteron, hipokampus – histologie a morfologie

Existují práce, které prokazují, že v souvislosti se zvýšenou hladinou kortikoidů došlo k neuronální smrti v některých hipokampálních subregionech (SAPOLSKY 1985, TATA et al. 2006), zatímco jiné studie ji nenalezly (SOUSA et al. 1998). Animální modely ukazují, že vystavení vysokým a/nebo dlouhodobě působícím dávkám kortikoidů nebo intenzivnímu stresu vede nejen k behaviorálním změnám, ale i ke změnám v mozkových strukturách a eventuálně ke smrti neuronů v hipokampu.

U potkanů stačí několikadenní zvýšení hladiny kortikosteronu ke zvýšení citlivosti hipokampálních neuronů na ischemii nebo na důsledky epileptického záchvatu (MAZARATI et al. 2009). V průběhu několika týdnů

způsobí vyšší hladina kortikosteronu reverzibilní poškození dendritů hipokampálních neuronů. Trvá-li tato zátěž delší dobu (až měsíce), začnou hipokampální neurony zanikat. K podobným jevům dochází patrně i v hipokampu primátů včetně člověka. (LANDFIELD, ELDRIDGE 1994) Je tedy pravděpodobné, že dlouhodobá aktivace stresové HHA osy, jejímž důsledkem je vysoká hladina kortizolu, poškozuje hipokampální neurony u člověka podobně jako u pokusných zvířat (OBRIEN et al. 1997).

Již dříve byly nalezeny rozdílné účinky kortikosteronu na neuronální a/nebo gliální morfologii v hipokampu potkana při podání krátkodobém oproti dlouhodobé aplikaci. Po krátkodobém vystavení vyšším dávkám kortikoidů byla u potkanů popsána významná redukce v objemech bez ztráty neuronů v gyrus dentatus a CA3 hipokampové podoblasti (SOUSA et al. 1998). Je doloženo, že opakovaný stres má podobné účinky na dendritickou remodelaci v CA3c jako kortikoidy (WATANABE et al. 1992). Morfologické studie provedené na potkanech ukázaly, že dlouhodobé vystavení stresu či zvýšení hladiny glukokortikoidů vedou k procesu postupného poškození neuronů - od počáteční a reverzibilní atrofie dendritických výběžků a redukce větvení (20%) u CA3c pyramidových neuronů (WOOLLEY et al. 1990, MAGARIÑOS, MCEVAN 1995, SOUSA et al. 1998) až k nevratné ztrátě hipokampálních CA3c pyramidových buněk (LANDFIELD 1987), dále také k zánětu glie a atrofii perikaryonů v základních vrstvách hipokampu (SAPOLSKY et al. 1985). Toto poškození indukované stresem nebo exogenními glukokortikoidy je patrně neurobiologickou podstatou pozorovaných negativních změn v reaktivitě, chování, paměti a učení (ZACH et al. 2011). Změny hladin cirkulujícího kortikosteronu vedou ke změnám mikrostruktury, výrazným známkám neuronální degenerace a narušení kognitivních funkcí (SCHUBERT et al. 2008). Většina z těchto změn je reverzibilní a po čase je obtížné rozeznat je na morfologické úrovni (SOUSA et al. 1999, JOËLS 2008), protože mohou být překryty reparačními nebo jinými procesy. V této souvislosti je zajímavá recentní práce, kterou uveřejnili ZOHAR et al. (2011). V rozporu

s většinovým názorem doporučují tito autoři na základě pokusů na zvířatech a kladné klinické zkušenosti na 25 pacientech aplikovat u osob postižených akutním stresovým dějem brzy po expozici jednorázové podání vysoké dávky (100 – 140 mg) hydrokortizonu. Prospěšnost této aplikace byla potvrzena dvojitě slepým pokusem. Autoři uvádějí, že mechanismus tohoto kladného účinku nedovedou vysvětlit. Podobně i jiní autoři (JOËLS 2008, MCEWEN 2008) dosvědčují, že přes intenzivní výzkum neurobiologických mechanismů působení stresu a kortikoidů zůstává podstata jejich účinku na molekulární úrovni stále neobjasněna.

Kortikosteron, hipokampus – pravolevá asymetrie (lateralita)

Jiným důležitým aspektem souvisejícím se stresem jsou změny v lateralitě mozkových struktur. Podkladem teorie cerebrální laterality je pravděpodobně existence asymetrií neuroanatomických, neurofyziologických i neurobiochemických a to se týká i hipokampu. Existuje dokonce i několik modelů popisujících, jak může být hipokampální asymetrie navozena experimentálně in vivo. Dobře dokumentované jsou například na zkušenostech závislé změny laterality – neonatální vystavování novým podnětům (neonatal novelty exposure), dlouhodobá potenciace (LTP) nebo změny po účinku neuromodulátorů. (TANG 2003) U některých pacientů s diagnózou deprese bylo magnetickou rezonancí zjištěno zmenšení objemu hipokampu až o 12 % na straně pravé, o 15 % na straně levé, přičemž objem celého mozku se nezměnil. Možný vliv alkoholu, elektrokonvulzivní terapie i farmak tato studie vyloučila. (SAPOLSKY 1996) U veteránů vietnamské války trpících posttraumatickou stresovou poruchou byla zjištěna statisticky významná osmiprocentní atrofie pravého hipokampu; na hranicích statistické významnosti byla doložena i atrofie levého hipokampu (BREMNER et al. 1995).

Práce zaměřené na sledování pravolevé asymetrie (laterality) mozkových struktur zvláště hipokampu po vystavení kortikoidům se nám u potkanů ani jiných druhů v publikované literatuře nepodařilo nalézt.

CÍLE

Cíl práce

Cílem práce bylo studovat vliv dvou hlavních dlouhodobě kontinuálně podávaných hormonů hypothalamo-hypofyzo-adrenální osy (CRH a kortikosteronu) na chování, učení a paměť a také na biochemické a histomorfologické změny v mozkových strukturách.

Hypotéza

Z charakteru HHA osy, jejích zpětných vazeb, zúčastněných mozkových struktur a jejich funkcí lze odvodit:

Chování je integrální funkcí (imuno-)neurohumorálních procesů v organismu.

Hormony stresové osy (CRH a glukokortikoidy) mohou podstatně modulovat chování na podkladu změn fyziologických, biochemických a po delším působení i strukturních, které zpětně ovlivňují funkce.

Oba hormony působí na chování do určité míry antagonisticky. Převaha kortikoliberinu zvyšuje úzkostlivost - anxiozitu, naproti tomu nadbytek kortikosteronu vyvolává ev. zvyšuje trankvilitu^{*)}.

Chování je projevem neuronální aktivity cerebrálních struktur.

Neuronální aktivita je významně modulována neuronální plasticitou.

Lze předpokládat, že CRH i kortikosteron působí na plasticitu neuronálních sítí.

Důležitou složkou HHA osy je hipokampus, rozhodující místo paměťových procesů.

Oba studované hormony HHA osy mohou ovlivňovat paměť a chování.

Obecně je výsledný účinek součinem síly podnětu a doby jeho působení, při více podnětech též výsledkem jejich případných interakcí.

Každá z aplikovaných látek (kortikoliberin a kortikosteron) ovlivňuje jinou složku jak chování tak i biochemických a morfologických změn.

Z hypotézy vyplývají tyto experimentální otázky:

^{*)} V češtině schází naprosto přesný odborný výraz (termín) pro opozitní vstav proti termínu anxiozita / anxieta – smyslem se snad nejvíce blíží poklid, pokoj, pohoda.

Otázky

- I.a)** Projeví se účinek aplikace kortikoliberinu u adrenaletomovaných zvířat změnou chování?
- I.b)** Změní se chování pod vlivem této aplikace nějak specificky?
- II.a)** Projeví se účinek aplikace kortikoliberinu u zvířat s možností adrenální odpovědi (neadrenaletomovaných) změnou chování?
- II.b)** Změní se chování pod vlivem této aplikace nějak specificky?
- III.a)** Projeví se účinek aplikace kortikosteronu změnou chování?
- III.b)** Změní se chování pod vlivem této aplikace nějak specificky?
- III.c)** Lze po dlouhodobé aplikaci kortikosteronu v mozku najít histologické změny?

METODIKA

Zvířata

Byli použiti naivní samci laboratorního potkana *Rattus norvegicus* (Berkenhout 1769) kmene long-evans linie AVČR, Praha, Krč (stáří 3 měsíce \pm 14 dnů a váha 300 - 400g). Byli chováni za standardních podmínek (teplota 22°C, den / noc 12/12 hod - světlo od 6 do 18 hodin, potrava a voda ad libitum, pokud není uvedeno jinak); byla dodržena klidová přivykační doba 14 dní (po přenesení do nových podmínek chovu); ve dvou dnech před prvním pokusem byla zvířata přivykána na ruční manipulaci (handling). Byl dodržen schválený projekt pokusu a všechny předpisy pro chov a manipulaci s pokusnými zvířaty.

Skupiny

V pokusu byla zvířata rozdělena do 4 skupin (tři experimentální a jedna kontrolní).

Skupina [**↑CRH**] (corticotropin-releasing hormone) měla aplikován CRH (42 μ g celkem, tj. 1,5 μ g na zvíře a den), který byl kontinuálně podáván do pravé postranní mozkové komory (i.c.v. = intracerebroventrikulárně) přes zavedenou permanentní kanylu prostřednictvím osmotické pumpy po dobu 4 týdnů. Jeden týden po zavedení osmotické pumpy byla provedena oboustranná adenektomie a bezprostředně substituce kortikosteronu (35 mg, tj. 1,4 mg na zvíře a den) subkutánní peletou po dobu 3 týdnů - (n = 6).

Skupina [**↑CRH ↑CS**] (corticotropin-releasing hormone; corticosterone) měla aplikován CRH (42 μ g celkem, tj. 1,5 μ g na zvíře a den), který byl kontinuálně i.c.v. podáván přes zavedenou permanentní kanylu prostřednictvím osmotické pumpy po dobu 4 týdnů, zvýšený kortikosteron byl endogenní - (n = 11).

Skupina [**↑CS**] (corticosterone) měla aplikován kortikosteron (200 mg celkem, tj. 9,5 mg na zvíře a den), který byl podáván kontinuálně prostřednictvím subkutánní pelety po dobu 3 týdnů - (n = 10)

Kontrolní skupina [0] byla bez jakékoli farmakologické a chirurgické manipulace – (n = 10).

Kromě kontrolní skupiny [0] byly vytvořeny ještě další tři kontrolní skupiny po šesti zvířatech, které měly vyloučit vliv užitých experimentálně chirurgických zásahů. První z těchto skupin měla implantovanou placebovou (cholesterolovou) podkožní peletu, druhá měla implantovanou osmotickou pumpu s i.c.v. kanylou, která uvolňovala umělý mozkomíšní mok ve stejném množství a po stejnou dobu jako bylo aplikované CRH. Třetí skupině byla provedena simulovaná adrenalectomie, při níž nadledviny zůstaly intaktní. U žádné z těchto tří skupin nebyla zaznamenána jakákoliv změna chování ani fyziologických parametrů lišící se od skupiny kontrolní.

Aplikované látky

CRH - komerčně dodávaný (Sigma Aldrich, Česká republika), deklarovaný jako human, rat, v min. 95% čistotě

Kortikosteron - komerčně dodávaný (Innovative Research of America, USA), 35 mg v subkutánní peletě (velikost: průměr 6 mm a výška 1,5 mm), resp. 200 mg v peletě (velikost: průměr 10 mm a výška 4 mm)

Přípravky

V pokusu byly použity vlastnoručně vyrobené permanentní kovové i.c.v. kanyly, plastové kanylky a komerčně dodávané 28 denní osmotické pumpy (fa Alzet, USA, model 2004, deklarovaný denní objem vytlačované kapaliny je 0,27 μl (SD 0,01 μl) a celkový objem vytlačované kapaliny je 249 μl (SD 6 μl)).

Anestezie

Při aplikaci subkutánní pelety byla užitá krátkodobá inhalační anestezie (Isofluoran).

Při časově náročnější operaci implantace osmotické pumpy s i.c.v. kanylou ev. s adrenalectomií byla použita intraperitoneální anestezie xylazin-ketaminová (Xylapam [xylazinum hydrochloridum, 2 – 4 mg . kg⁻¹ živé váhy] + Narketan [ketaminum hydrochloridum, 2 mg . kg⁻¹ živé váhy]).

Chirurgické techniky

Aplikace subkutánní pelety byla provedena v krátkodobé celkové anestezii. Peleta byla aplikována do břišní krajiny, pravého hypogastria v laterální oblasti a rána uzavřena uzlovými stehy.

Adrenalektomie (MARKOVITZ et al. 1964, WAYNFORTH, FLECKNELL 1984) byla provedena v střednědobé celkové anestezii z dorzálního přístupu mediálním řezem a paravertebrální tupou preparací svaloviny vpravo i vlevo. Byly odstraněny nadledviny, a rány byly uzavřeny ve dvou vrstvách uzlovým a pokračujícím stehem.

Zavedení komorové kanyly (koordináty: bregma – 0,92, later. 1,6 -1,8, hloubka min. 2,9 - max. 3,8 podle anatomického atlasu PAXINOS, WATSON 1986) a osmotické pumpy bylo provedeno v střednědobé celkové anestezii. Anestetované zvíře bylo umístěno do stereotaktického přístroje a proveden mediální kožní řez, periost byl odstraněn. Dále proveden návrť mozkovny do pravého os parietale. V dorzální oblasti šíje a zad byla vypreparována subkutánní kapsa pro uložení osmotické pumpy. Stereotakticky byla návrtem intracerebroventrikulárně (i.c.v.) zavedena permanentní komorová kanyla a následně zafixována v aplikační poloze rychle samopolymerující pryskyřicí. Do připravené kožní kapsy byla umístěna osmotická pumpa spojená s kanylou plastovou kanylkou. Pryskyřičný val byl překryt volnou kůží hlavy a rána uzavřena pokračujícím stehem.

Operovaná zvířata byla umístěna samostatně do chovných nádob a do probuzení sledována. Eventuálně při větší ztrátě tekutin (močením během operace) byl objem doplněn i.p. aplikací temperovaného izotonického roztoku. Chirurgické rány byly po dokončení zákroku a sešití desinfikovány a slabě překryty framykoinovou masťou. Po probuzení byla navracena zpět do původních chovných nádob. Rány se hojily per primam a závažnější pooperační komplikace nebyly pozorovány.

Podrobněji viz (ŘEZÁČOVÁ 2007)

Behaviorální metodiky

Úloha aktivního alotetického vyhýbání se místu (AAPA - active allothetic place avoidance):

Obr. 1 Zařízení pro test AAPA

Zařízení (jako první navrhli CIMADEVILLA et al. 2000; modifikace STUHLIK et al. 2004) pro provádění testu AAPA je kruhová kovová elektricky vodivá deska o průměru 80 cm, rotující 1 ot. \cdot min⁻¹, s fixní (neotáčející se) imaginární (neoznačenou)

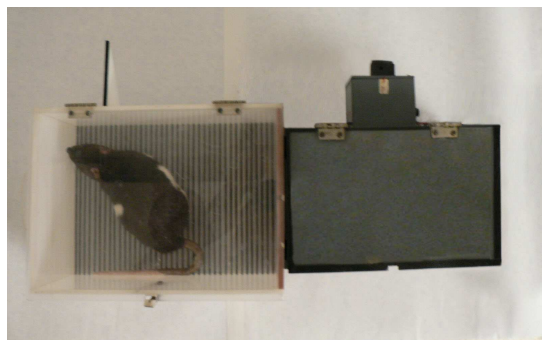


kruhovou výsečí (60°), která je definovaná v rámci místnosti. Vstup do této zakázané zóny je trestán malou nepříjemnou elektrickou rankou do tlapek. Potkan nese na zádech diodový světelný zdroj, aby mohla být jeho poloha zaznamenávána počítačem, který ji průběžně vyhodnocuje a eventuálně okamžitě trestá elektrickou rankou vstup do zakázané zóny. Každé zvíře bylo testováno (bez předešlé habituace) pět po sobě jdoucích dní jedenkrát denně po dobu 20 min. Shodný test probíhal dvakrát: poprvé v době podávání hormonů (fáze A) a podruhé v době po skončení uvolňování hormonů (fáze B). (Viz ŘEZÁČOVÁ et al.2011).

Úloha pasivního vyhýbání se místu (Step-through):

Obr. 2 Aparatura step-through

Step-through (originálně King, Glasser 1970) aparatura se skládá se ze dvou menších boxů: osvětleného (30 x 20 x 15 cm) a

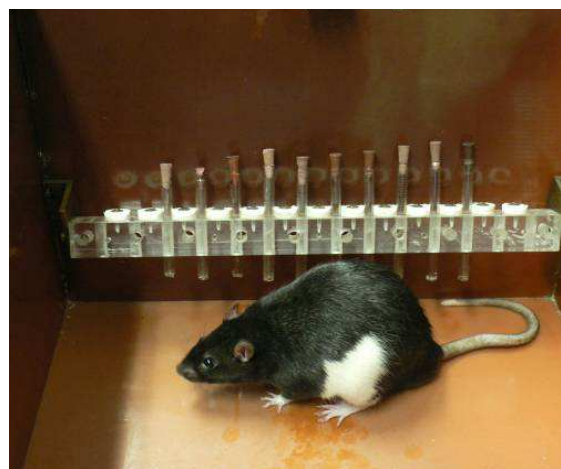


temného (25 x 16 x 15 cm) vzájemně propojených malým otvorem (6 x 7 cm). Experiment využívá přirozené potkaní preference temného boxu před osvětleným. Po třech habituačních bezkonfliktních sezeních následuje sezení konfliktní, při kterém je vstoupení do temného boxu potrestáno slabým elektrickým proudem (48V, 0,1 – 1,0 mA). Následující dvě sezení jsou bez proudu - testovací.

Úloha podmíněné chuťové averze (CTA - conditioned taste aversion):

Obr. 3 Zařízení pro test CTA

Zařízení pro test chuťové averze (Garcia et al. 1955) je box, v němž je zvířatům (kterým byl 48 hod před pokusem a během celého pokusu zamezen přístup k vodě) pouze po dvacet minut denně po pět dnů nabízena z pítek tekutina.



Třetí den je nová, neznámá, žádoucí, sladká sacharinová chuť ($784 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) asociována s příznaky otravy vyvolanými injekcí roztoku litiumchloridu ($9,06 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v množství 2% tělesné hmotnosti). Pátý den je testován poměr vypitých tekutin čistá voda / sacharinový roztok.

Úlohy v Morrisově vodním bludišti (MWM - Morris water maze):

Obr. 4 Morrisovo vodní bludiště

Zařízení (Morris 1984) je tvořeno kruhovou nádrží průměru cca 2 m a hloubky 50 cm, s výškou vodní hladiny 30 cm. Těsně pod hladinou je excentricky umístěn



pro potkana neviditelný, přemístitelný ostrůvek průměru 10 cm z průhledného plastu. Úkolem potkana vypouštěného z různých míst na obvodu bazénu je najít během jedné minuty ostrůvek. Motivací k hledání je fyzická zátěž plavání, strach a odpočinutí na ostrůvku. Testování probíhalo v pěti po sobě jdoucích dnech, v každém dni každý potkan absolvoval 8 maximálně jednodominutových plaveb. Aparatura byla použita pro dva druhy úloh: 1. test krátkodobé paměti s každodenně měněnou polohou ostrůvku a 2. test krátkodobé i dlouhodobé paměti se stabilní polohou ostrůvku.

Histologické a morfologické stanovení

Ve dvanáctém týdnu experimentu byla všechna zvířata celkem v počtu 55 usmrcena parenterálním podáním smrtné dávky anestetika. Zvířata určená pro histologické zpracování mozku byla perfundována po otevření hrudní dutiny přístupem přes levou srdeční komoru. Cévní řečiště kraniální poloviny těla bylo promyto nejdříve izotonickým roztokem a následně fixačním roztokem 5% paraformaldehydu. Poté byly kadavery dekapitovány a vyjmut mozek. Následně byla mozková tkáň uložena do 20% roztoku sacharózy, zmražena a nařezána, natažena na standardní histologická podložní sklíčka, obarvena a adjustována. Hodnocení histologických řezů probíhalo pod světelným mikroskopem a identifikovány hranice jednotlivých částí a vrstev hipokampu. Počet neuronů byl stanovován metodou optického frakcionátoru, podle (GUNDERSEN et al. 1988b, WEST et al. 1991). Objem hipokampální formace byl určován na základě Cavalieriova principu (GUNDERSEN et al. 1988a). Objem mozku byl stanoven z frontálních řezů pomocí počítačového programu Image J a byl využit pro normalizaci velikosti hipokampu. (Podrobněji viz příložené publikace ZACH et al. 2010, ZACH et al. 2011.)

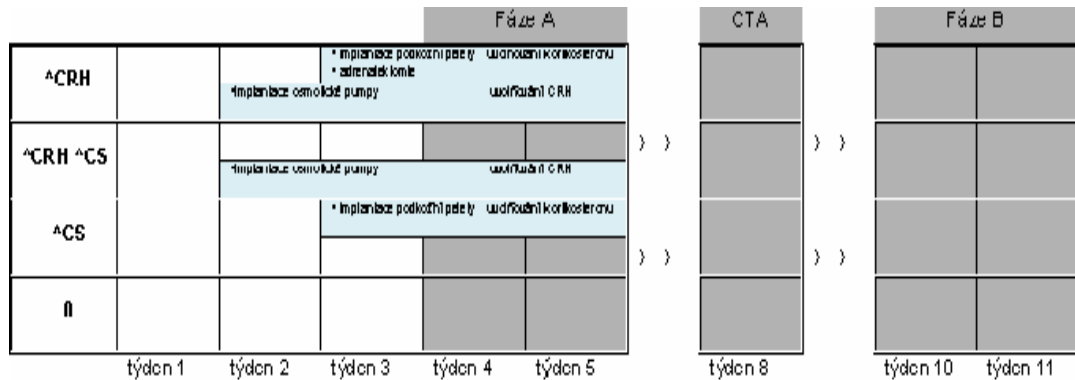
Stanovení hladin hormonů

Hladiny ACTH a kortikosteronu byly během pokusu stanovovány opakovaně, aby byla určena jejich bazální hladina a zachyceny změny. Viz příložené publikace (REZACOVA et al. 2011, ZACH et al. 2010).

Užité statistické metody

K hodnocení experimentálních výsledků byl použit program Statistika a jeho parametrické i neparametrické testy. Viz jednotlivé příložené publikace (REZACOVA et al. 2011, ZACH et al. 2010, ZACH et al. 2011).

Časové schéma experimentu



Ve fázi A proběhly testy: AAPA, Step-through.

Ve fázi B proběhly testy: AAPA, MWM modifikované.

Mezi fázemi A a B byl proveden test CTA.

Bylo použito 55 zvířat na behaviorální experimenty, na histologická a morfologická stanovení 20, na stanovení hormonální 55, na další biochemická stanovení 165 zvířat.

Biochemická část práce není dokončena, odebrané vzorky v počtu 825 jsou zamrazeny a připraveny ke stanovení. Stanovení těchto vzorků není a v dohledné době patrně nebude možné pro nedostatek finančních prostředků.

VÝSLEDKY

Znázornění statistické významnosti v grafech:

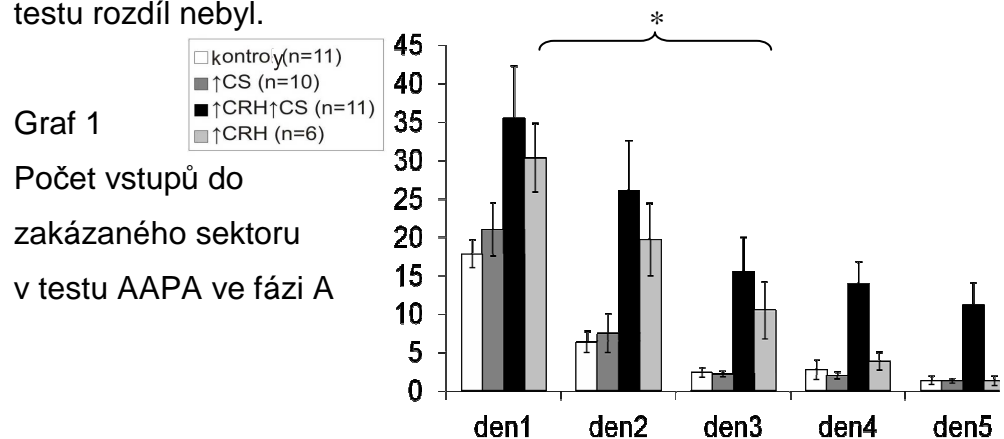
* - mezi experimentální a kontrolní skupinou, není-li uvedeno jinak

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Skupina [\uparrow CRH]

Samotný dlouhodobě podávaný kortikoliberin v různých behaviorálních úlohách měnil chování různě.

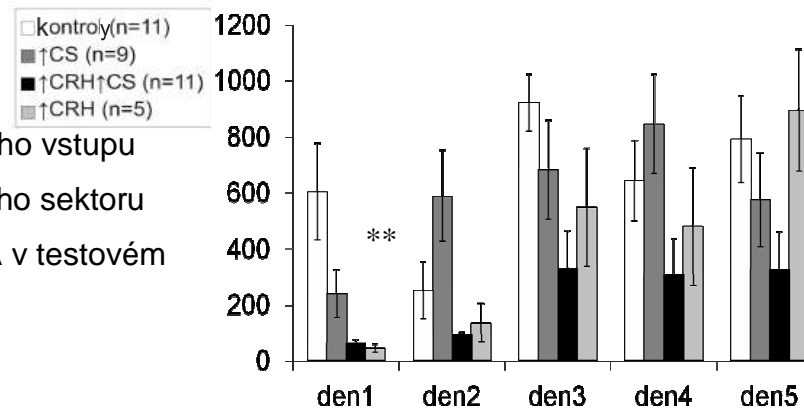
Úloha AAPA (fáze A): V prvním až třetím dnu se pokusná zvířata od kontrolních sice signifikantně lišila zvýšeným počtem vstupů do zakázaného sektoru (graf 1) ($p < 0,05$ { $p = 0,03$ }; $F(3,34) = 8,63$ $p < 0,001$), postupně se však rozdíl zmenšoval až tak, že ve čtvrtém až pátém dnu rozdíl od kontrol zcela vymizel ({ $p = 0,83$ }; $F(3,34) = 10,42$ $p < 0,001$). V souhrnném počtu vstupů za celých pět dnů se skupina nelišila od kontrol ({ $p = 0,10$ }; $F(3,34) = 10,1$ $p < 0,001$). V jiných parametrech tohoto testu rozdíl nebyl.



Úloha AAPA (fáze B): V prvním dnu byl zaznamenán signifikantně kratší čas do prvního vstupu (graf 2) do zakázaného sektoru ($p < 0,01$ { $p = 0,003$ }; $F(3,32) = 6,89$ $p = 0,001$), počet vstupů se však první den od kontrolní skupiny signifikantně nelišil ({ $p = 0,24$ }; $F(3,32) = 5,06$ $p = 0,005$). V maximálním čase mezi vstupy do zakázaného sektoru se v prvním dnu skupina od kontrolních nelišila ({ $p = 0,30$ }; $F(3,32) = 7,30$ $p < 0,001$). Doba strávená v časově nejbezpečnějším prostoru arény nebyla u skupiny kratší oproti kontrolám ({ $p = 0,62$ }; ($F(3,32) = 8,17$ $p < 0,001$).

Graf 2

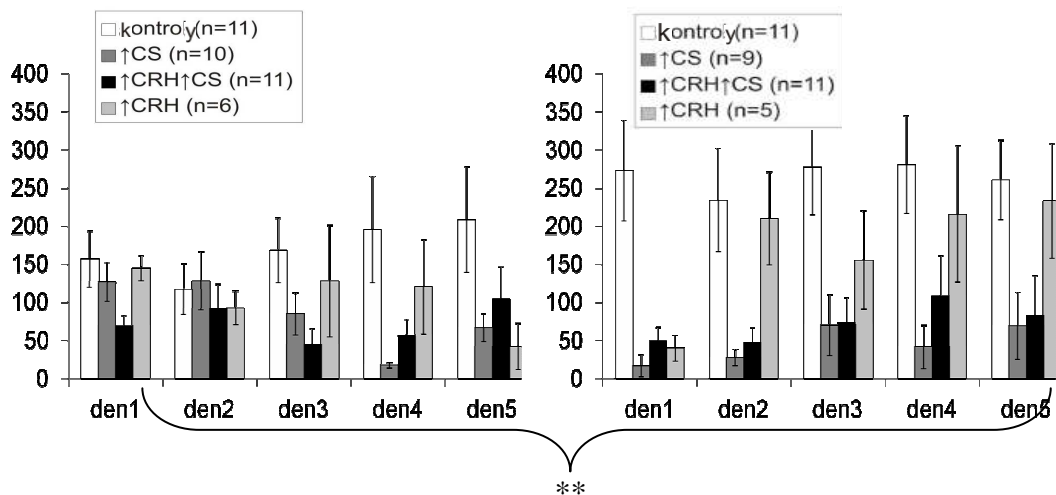
Čas (s) prvního vstupu
do zakázaného sektoru
v testu AAPA v testovém
bloku B



V obou testech AAPA společně (ve fázi A a ve fázi B): Suma časů strávených v časově nejbezpečnějším prostoru arény (graf 3 a 4) u této skupiny na rozdíl od kontrolní skupiny byla kratší ($p=0,01$ { $p=0,01$ }; $F(3,32)=12,2$ $p<0,001$), v samotné fázi B se skupina od kontrol nelišila signifikantně ($p=0,11$); $F(3,32)=8,17$ $p<0,001$).

Graf 3 a 4

Průměrné časy (s) strávené v časově nejbezpečnějším prostoru arény fáze A a fáze B



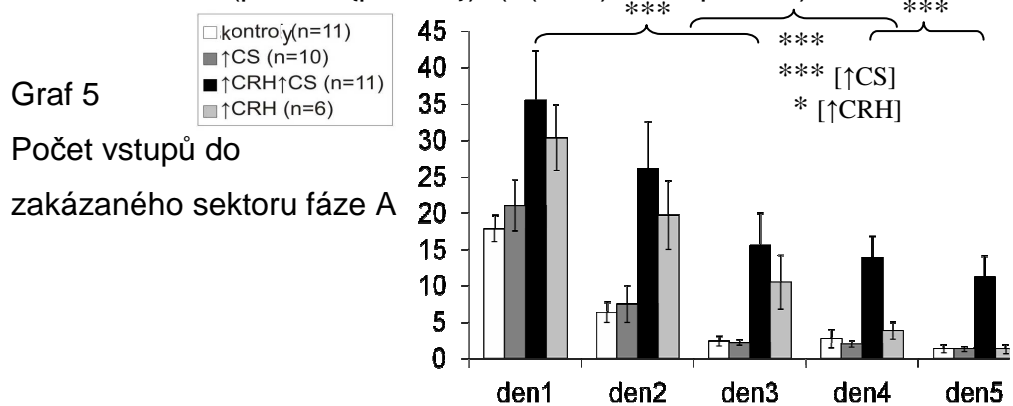
V ostatních testech se zvířata od kontrolních nelišila.

Shrnutí [↑CRH]: Dlouhodobě podávaný korikoliberin u adrenaletomované skupiny negativně ovlivnil výsledky pouze v úloze AAPA. Poškození se vůči kontrolám projevilo zpomaleným učením (počet vstupů 1. – 3. den), deficitem v dlouhodobé paměti (čas do prvního vstupu první den) a jinou prostorovou strategií (snížené využívání časově nejbezpečnějšího prostoru arény).

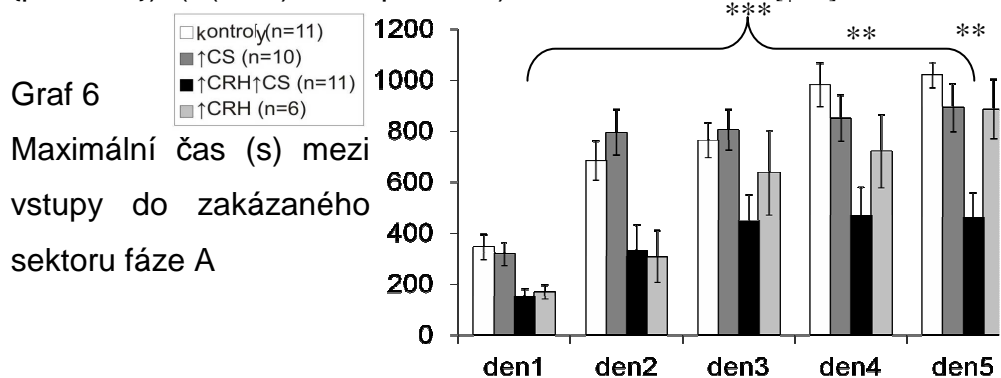
Skupina [\uparrow CRH \uparrow CS]

Dlouhodobě podávaný kortikoliberin s endogenně zvýšeným kortikosteronem v různých behaviorálních úlohách měnil chování různě.

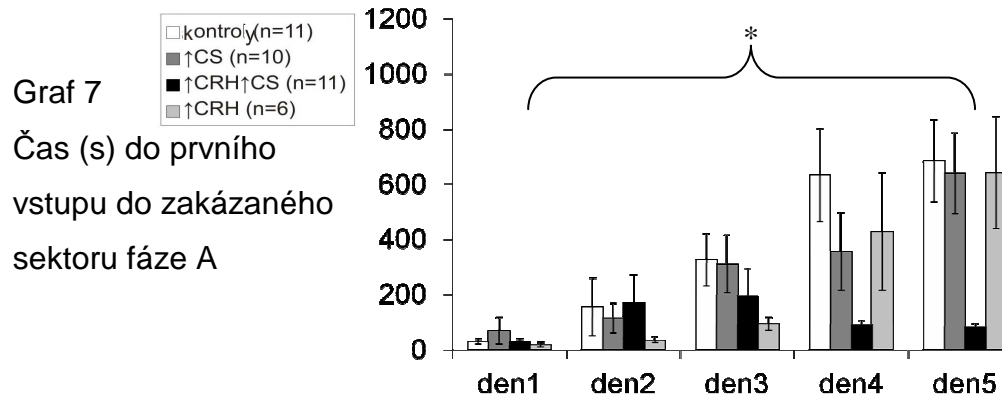
Úloha AAPA (fáze A): Ve všech sledovaných parametrech kromě celkové lokomoce měla skupina ve srovnání se skupinou kontrolní horší výsledky. Z toho jen některé byly statisticky průkazné. Počet vstupů skupiny do zakázaného sektoru (graf 5) byl oproti kontrolám první až třetí den vyšší ($p=0,001$ { $p=0,001$ }; $F(3,34)=8,63$ $p<0,001$) a také čtvrtý až pátý den ($p<0,001$ { $p<0,001$ }; $F(3,34)=10,42$ $p<0,001$). Též souhrnně v celých pěti dnech byl počet vstupů oproti kontrolám vyšší ($p<0,001$ { $p<0,001$ }), zároveň byl také vyšší oproti skupině [\uparrow CS] s dlouhodobě zvýšeným kortikosteronem ($p<0,001$ { $p<0,001$ }), a dokonce i oproti skupině [\uparrow CRH] s dlouhodobě zvýšeným CRH a adenalektomií ($p<0,05$ { $p=0,03$ }); ($F(3,34)=10,1$ $p<0,01$).



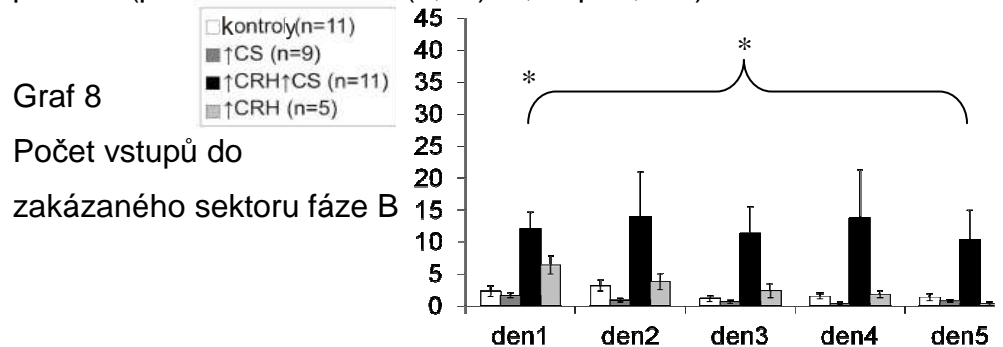
Skupina byla na rozdíl od kontrol horší i v maximálním čase mezi vstupy (graf 6) čtvrtý ($p<0,01$ { $p=0,007$ }) resp i pátý den ($p<0,01$ { $p=0,003$ }); ($F(3,34)=8,66$ $p<0,001$) a také suma hodnot maximálního času mezi vstupy za celých pět dnů byla oproti kontrolám nižší ($p=0,001$ { $p=0,001$ }) a zároveň v tomto parametru byla skupina horší oproti skupině [\uparrow CS] s dlouhodobě zvýšeným kortikosteronem ($p<0,01$ { $p=0,002$ }); ($F(3,34)=8,66$ $p<0,001$).



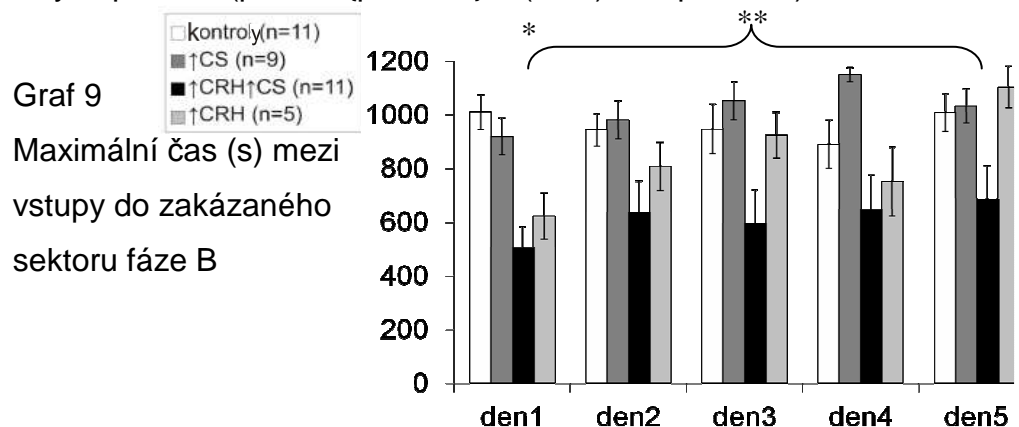
Rozdíl oproti skupině kontrolní byl i v kratším sumárním (za celých pět testových dní) času do prvního vstupu do zakázaného sektoru (graf 7) ($p < 0,05$ { $p = 0,03$ }; $F(3,34) = 3,78$ $p = 0,019$).



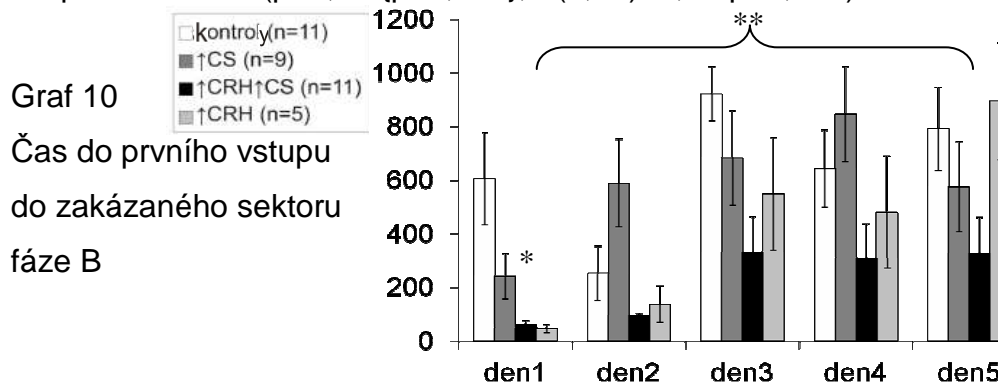
Úloha AAPA (fáze B): Kognitivní deficit pozorovaný v této úloze ve fázi A (během uvolňování hormonů) přetrvával. Statisticky průkazné rozdíly byly zaznamenány ve třech z pěti sledovaných parametrů. V počtu vstupů do zakázaného sektoru (graf 8), který byl první den u této skupiny oproti kontrolám vyšší ($p < 0,05$ { $p = 0,02$ }; $F(3,32) = 10,2$ $p < 0,00001$) a také ve vyšším celkovém součtu počtu vstupů za celých pět dnů ($p < 0,05$ { $p = 0,02$ }; $F(3,32) = 5,06$ $p = 0,005$).



Maximální čas mezi vstupy (graf 9) byl také kratší oproti kontrolám v prvním dnu ($p < 0,05$ { $p = 0,049$ }; $F(3,32) = 7,3$ $p < 0,001$) i v součtu za celých pět dnů ($p < 0,01$ { $p = 0,008$ }; $F(3,32) = 7,3$ $p < 0,001$).



Čas do prvního vstupu (graf 10) byl také u této skupiny kratší oproti kontrolní skupině v prvním dnu ($p < 0,05$ { $p = 0,02$ }; $F(3,32) = 8,16$ $p < 0,001$), stejně tak i suma časů za celých pět dnů byla kratší oproti skupině kontrolní ($p < 0,01$ { $p = 0,005$ }; $F(3,32) = 6,89$ $p = 0,001$).

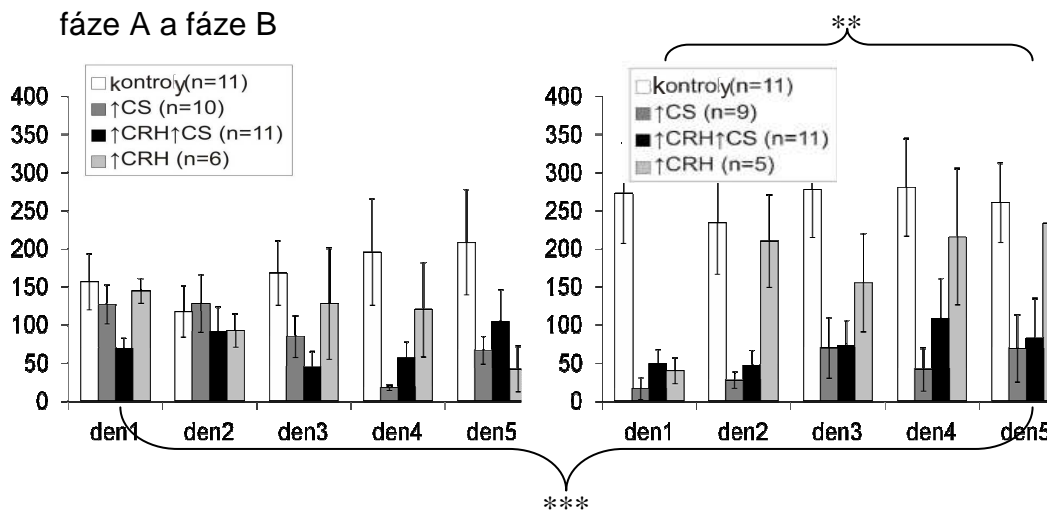


Celková doba strávená v časově nejbezpečnějším prostoru (graf 12) arény u této skupiny byla na rozdíl od kontrolní skupiny kratší v součtu za celých pět dnů ($p < 0,01$ { $p = 0,005$ }; $F(3,32) = 8,17$ $p < 0,001$).

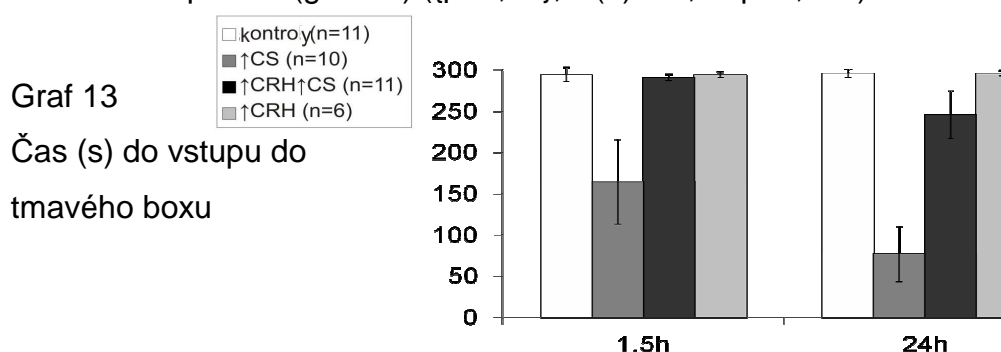
V obou testech AAPA společně (ve fázi A a ve fázi B): Suma časů strávených v časově nejbezpečnějším prostoru arény (graf 11 a 12) byla u této skupiny na rozdíl od kontrolní skupiny kratší ($p < 0,001$ { $p = 0,001$ }; $F(3,32) = 12,2$ $p < 0,001$).

Graf 11 a 12

Průměrné časy (s) strávené v časově nejbezpečnějším prostoru arény fáze A a fáze B



Step-through: V této úloze bylo zaznamenáno nesignifikantní zhoršení dlouhodobé paměti (graf 13) ($p=0,54$; $H(3)=16,31$ $p=0,001$).



V ostatních testech se skupina s aplikovaným CRH a endogenně zvýšeným kortikosteronem od kontrolní skupiny nelišila.

Shrnutí [↑CRH ↑CS]: Dlouhodobě podávaný kortikoliberin a endogenně zvýšený kortikosteron primárně zhoršovaly výsledky v úlohách kognitivně náročnějších (AAPA) na rozdíl od úloh konfliktních (step-through) a nekonfliktních, zaměřených na jednodušší alometrickou prostorovou orientaci a paměť (MWM). Poškození se projevilo téměř ve všech zkoumaných parametrech kromě celkové ušlé vzdálenosti. Oproti kontrolám bylo zpomaleno učení a zhoršeno naučení (počet vstupů), snížena pozornost (maximální čas mezi vstupy) a dlouhodobá paměť (čas do prvního vstupu). Tento deficit se ještě zvýraznil v druhé testovací fázi. V celé této úloze měla skupina jinou prostorovou strategii (snížené využívání časově nejbezpečnějšího prostoru arény).

Skupina [\uparrow CS]

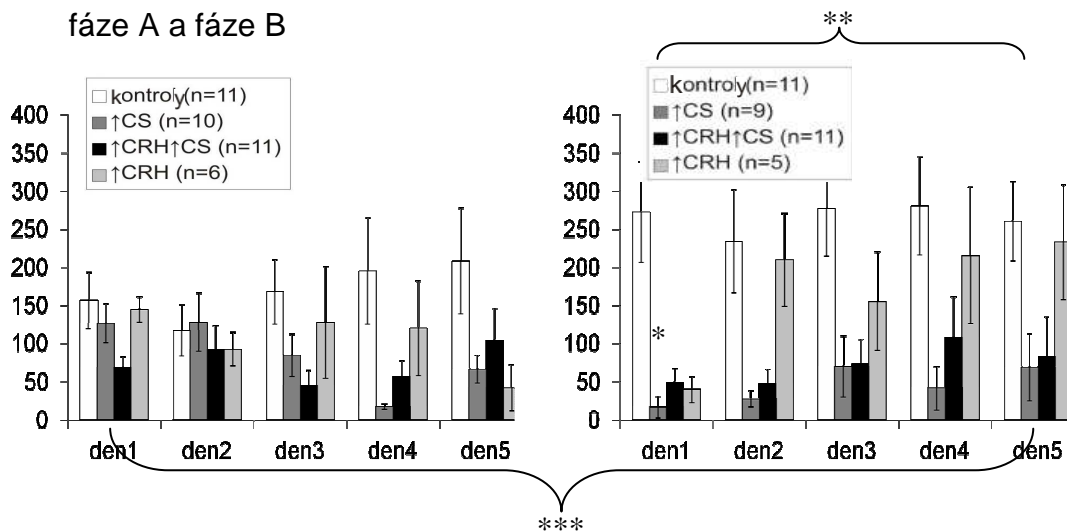
Samotný dlouhodobě podávaný kortikosteron v různých behaviorálních úlohách měnil chování různě.

Úloha AAPA (fáze B): Pokusná zvířata se první den méně často oproti kontrolní skupině nalézala v časově nejbezpečnějším prostoru arény (graf 15) ($p < 0,05$ { $p = 0,019$ }; $F(3,32) = 6,96$ $p < 0,001$). Suma časů v celých pěti v této oblasti dnech byla stejně jako v prvním dni nižší oproti kontrolám ($p < 0,01$ { $p = 0,002$ }; $F(3,32) = 8,17$ $p < 0,001$), to však nezvýšilo součet počtu vstupů do zakázaného sektoru v celých pěti dnech ({ $p = 0,79$ }).

V obou testech AAPA společně (ve fázi A a ve fázi B): Suma časů strávených v časově nejbezpečnějším prostoru arény (graf 14 a 15) byla u této skupiny na rozdíl od kontrolní skupiny kratší ($p < 0,001$ { $p < 0,001$ }; $F(3,32) = 12,2$ $p < 0,001$). V této úloze se skupina v jiných hodnocených parametrech od skupiny kontrolní nelišila.

Graf 14 a 15

Průměrné časy (s) strávené v časově nejbezpečnějším prostoru arény fáze A a fáze B

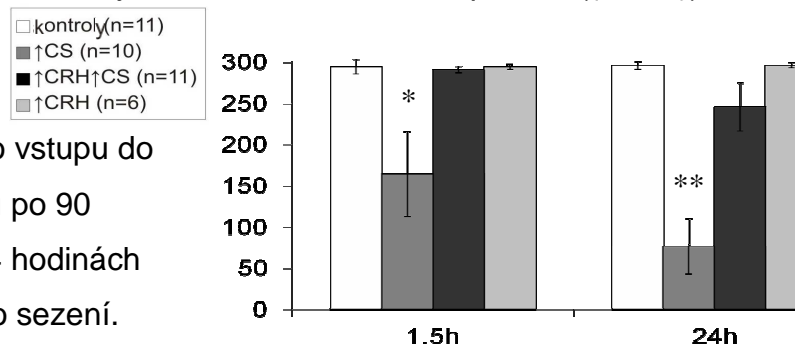


Step-through: Po 24 hodinách od sezení konfliktního s podmíněným averzivním podnětem vstupovala pokusná zvířata do tmavé části boxu dříve oproti kontrolám, které do tmavého boxu téměř nevstupovaly (graf 16) ($p < 0,01$ { $p = 0,0016$ }; $H(3) = 16,31$ $p = 0,001$). Po 1,5 hodině od konfliktního sezení nebylo možno Kruskal-Wallis testem stanovit

statistickou významnost rozdílu této skupiny od skupiny kontrolní. Podle Student T testu je však rozdíl na hladině $p < 0,05$ ($\{0,034\}$).

Graf 16

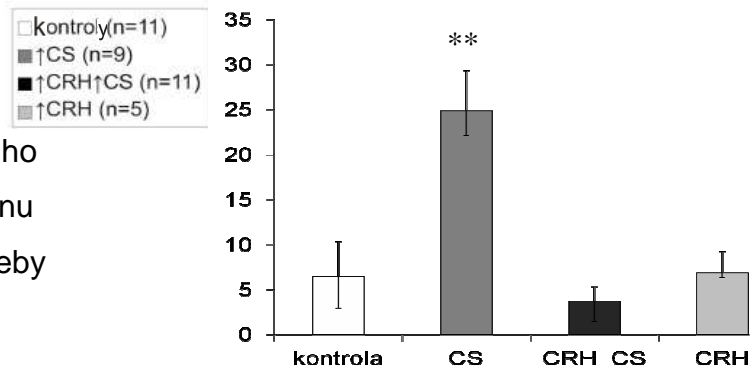
Latence (s) do vstupu do tmavého boxu po 90 minutách a 24 hodinách od konfliktního sezení.



Úloha CTA: Při testu chuťové averze pátý testovací den (graf 17) pila pokusná zvířata oproti kontrolní skupině sladký roztok více ($p < 0,01$ ($\{p=0,005\}$; $F(3,34)=6,95$ $p < 0,001$) i přes simulovanou otravu při předcházejícím prvním kontaktu s novou chutí. V celkovém příjmu tekutin se skupina nelišila od kontrol.

Graf 17

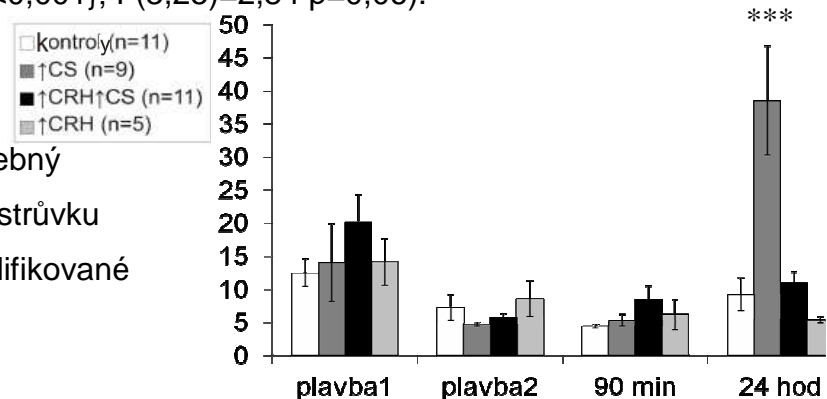
Procento vypitého roztoku sacharinu z celkové spotřeby tekutin 5. den



MWM modifikované: V plavbě následující 90 minut od plaveb učebních se výsledky mezi skupinami nelišily. Po 24 hodinách (graf 18) se doba potřebná k nalezení ostrůvku oproti skupině kontrolní prodloužila ($p < 0,001$ ($\{p < 0,001\}$; $F(3,25)=2,84$ $p=0,06$).

Graf 18

Čas (s) potřebný k nalezení ostrůvku v MWM modifikované variantě



Shrnutí [↑CS]: Samotný dlouhodobě podávaný kortikosteron negativně ovlivnil výsledky v jednodušších úlohách konfliktních (step-through, CTA) i nekonfliktních (MWM), zatímco v kognitivně vysoce náročné úloze AAPA ke zhoršení výsledků, krom jiné prostorové strategie nedošlo. Zatímco krátkodobá paměť byla postižena jen mírně – nesignifikantně a to jen v období uvolňování hormonu z implantované podkožní pelety v jediné úloze, deficit paměti dlouhodobé se signifikantně projevil ve třech úlohách ze čtyř a to nejen v čase uvolňování ale i v době 6 týdnů po skončení aplikace hormonu. Po šesti týdnech od ukončení aplikaci kortikosteronu při testu AAPA (fáze B) byla u pokusné skupiny ovlivněna prostorová strategie. Zvířata první den a sumárně v celých pěti dnech signifikantně méně často využívala časově nejbezpečnější oblast arény. Tento efekt se projevil signifikantně i při celkovém společném součtu časů strávených v tomto prostoru při fázi A a B.

Histomorfologie:

Samotný dlouhodobě podávaný kortikosteron měnil morfologickou a histologickou strukturu mozku.

U skupiny se zvýšeným kortikosteronem ve srovnání s kontrolami prokázala histologie v prefrontálním kortexu, hipokampu a amygdale jen nečetné neurony se zřetelnými degenerativními změnami (pyknosou a zmnožením cytoplazmy). O něco více bylo zasaženo parabrachiální jádro, jehož postižení (při celkovém nízkém počtu buněk v této struktuře) může mít potenciálně funkční význam.

Byla zjištěna nepoměrnost (lateralita) pravého a levého hipokampu u kontrolních potkanů long-evans chovu AV ČR. Pravý hipokampus byl výrazně objemově větší než hipokampus levý. U skupiny s kortikosteronem se ve srovnání s kontrolní skupinou velikost levého hipokampu nelišila. Na rozdíl od toho pravý hipokampus u pokusné skupiny byl zřetelně menší.

Současně se zmenšením pravého hipokampu bylo zjištěno zmenšení pravé hemisféry vůči kontrolám, objem levé hemisféry se nezměnil. Zmenšení objemu hipokampu je tak výrazné, že převrací lateralitu, dokonce natolik, že levý hipokampus (ač nezvětšen) se stal u pokusné skupiny

s kortikosteronem oproti pravému signifikantně objemově dominantním. Zmenšení objemu nebylo způsobeno snížením počtu neuronů ani jejich degenerací.

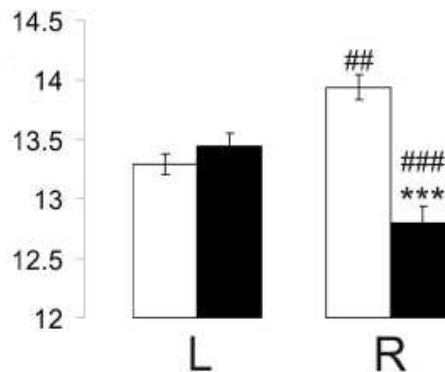
Graf 19 a 20

19 - Objem hipokampu (mm^3)

(bílé sloupce kontroly, černé CS)

("#" v jedné skupině mezi pravou (R) a levou částí (L); "***" mezi skupinami)

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

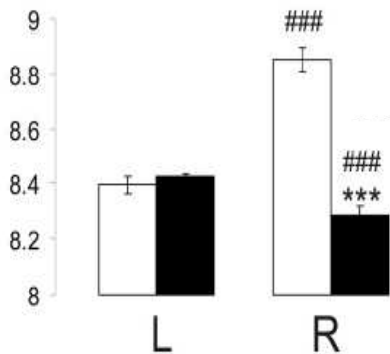


20 – Normalizovaný hipokampální

objem v % (bílé sloupce kontroly, černé CS)

("#" v jedné skupině mezi pravou (R) a levou částí (L);

"**" mezi skupinami) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)



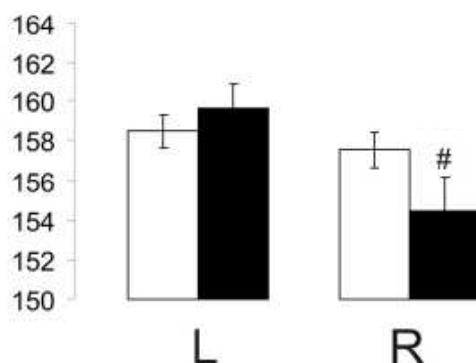
Graf 21 a 22

21 – Objem hemisfér (mm^3)

(bílé sloupce kontroly, černé CS)

("#" v jedné skupině mezi pravou (R) a levou částí (L); "***" mezi skupinami)

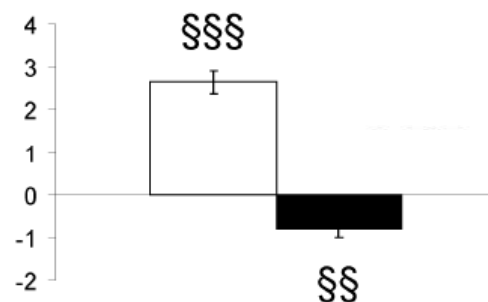
(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)



22 – Index pravolevého poměru

(laterality) normalizovaného objemu hipokampů (v%) $(R-L)/(R+L) * 100$

(bílé sloupce kontroly, černé CS) (odlišnost hodnot skupiny od 0; §§ = $p < 0,01$; §§§ = $p < 0,001$)



Shrnutí [↑CS] – histomorfologie: Samotný dlouhodobě podávaný kortikosteron ovlivnil volumetrické výsledky ve srovnání s kontrolami. Šest týdnů od ukončení aplikace bylo nalezeno převrácení objemového poměru levého a pravého hipokampu (laterality) ve prospěch dominance levého hipokampu bez změny počtu neuronů.

DISKUSE

Model

Prvořadou otázkou zda navržený model společného i odděleného vlivu kortikosteronu a kortikoliberinu na chování laboratorního potkana v zvolených behaviorálních úlohách je relevantní a použitelný pro studium položených otázek byl vyřešen již dříve (ŘEZÁČOVÁ 2007).

Následky působení kortikoidů můžeme u potkanů rozdělit (SKÓRZEWSKA et al. 2006) z časového hlediska na důsledky akutní a chronické. Avšak mezi autory se dosud neustanovila jednota v hodnocení, které důsledky působení látek obecně lze považovat podle doby vzniku za akutní (lépe časné) a které za chronické (lépe pozdní), podle doby trvání za dočasné (krátkodobé) nebo trvalé (dlouhodobé). Neexistuje ani shoda v tom, jaký časový interval působení je krátkodobý a jaký dlouhodobý a dokonce ani jak vysoké hladiny lze ještě považovat za fyziologické. Jednota v odlišení délky podávání při stanovení účinků látek na chování a/nebo funkční a následně i strukturální změny v mozkové tkáni, by byla velmi potřebná k předpovědi, zda následek působení látky bude pouze dočasný nebo trvalý. Určitým východiskem by mohlo být rozdělení podle aktivované úrovně odpovědi organismu: Akutní (dočasné) důsledky účinků kortikoidů by zahrnovaly zejména změny na ne-genové úrovni, naopak důsledky chronické (trvalé) by svědčily pro změny primárně genové exprese, zahrnující také nástup trvalých degenerativních změn (VRIES et al. 2002). To ovšem stejně ještě nevystihuje potřeby předpovědi, zda podávaná dávka bude navozovat změny akutní nebo chronické. Navíc situaci komplikuje fakt, že některé změny chronické se mohou objevit již časně a teoreticky i naopak (např. při posttraumatické stresové poruše). Rozdělení je navíc komplikováno klinickým významem a používáním termínů akutní (prudké, náhlé) a chronické (vleklé, počasně) onemocnění.

V této práci považuji za podávání dlouhodobé dva- a vícetýdenní aplikaci hormonů. Za důsledky časné ty, které se projeví již v době aplikace látek. Za dlouhodobé (trvalé) změny ty, které přetrvávají alespoň do konce experimentu (tj. minimálně do sedmého týdne po ukončení aplikace).

Je dobré mít na paměti, že hladiny hormonů v organismu nejsou stálé, nýbrž mají přinejmenším cirkadiální, pulzní a oscilační charakter. Kromě dalších změn v závislosti na neperiodických podnětech nejrůznějšího charakteru (manipulace, pachy, zvuky apod.). Pomocí osmotické pumpy a subkutánní pelety není tedy pochopitelně možné napodobit přirozenou dynamiku aktuálních hladin ve vnitřním prostředí. Experiment proto není přesným farmakologickým modelem stresu, ani endogenně paticky zvýšených hladin, ale jen arteficiální studií vlivu kontinuálně zvýšených hladin hormonů. Na druhé straně tento model dobře napodobuje klinickou situaci při terapeutické aplikaci kortikoidů.

Aplikované hormony

CRH – Zvolená aplikovaná dávka potkaního CRH 1,5 µg na zvíře a den odpovídá používaným dávkám v důvěryhodné literatuře (VELDHUIS, DEWIED 1984, CUNNINGHAM et al. 1988).

Kromě aplikace do postranních komor použili někteří autoři též aplikaci CRH u potkanů do třetí mozkové komory (BENOIT et al. 2000), jiní dokonce i aplikaci subkutánní (VELDHUIS, DEWIED 1984) nebo aplikovali ovinní CRH intracerebroventrikulárně (FEKETE et al. 1985, CUNNINGHAM et al. 1988). Ovšem všichni tito autoři použili ovinní CRH na rozdíl od námi použitého potkaního. Přesné aminokyselinové složení může ovlivňovat dynamiku a biologickou účinnost aplikované látky.

Intracerebroventrikulární aplikace CRH, kterou jsem používala, HHA osu zřejmě ovlivňovala, vedla totiž v pokusu ke zvýšení plazmatických hladin kortikosteronu.

Kortikosteron – U potkanů kmene long-evans je fyziologická hladina kortikosteronu kolem 50 ng v 1 ml plazmy (TOHEI et al. 2003). To je v souladu s našimi výsledky i s podobnými aplikacemi v literárních pramenech (např. SKORZEWSKA et al. 2006). V našich experimentech se aplikované dávky shodují s údaji v literatuře (BUSH et al. 2003), i když někteří aplikují dávky více než dvojnásobné (COBURN-LITVAK et al. 2003).

V literárních pramenech není způsob aplikace kortikosteronu jednotný. Někteří autoři používají podkožní pelety, někteří dokonce i vlastnoručně vyrobené (BODNOFF et al. 1995, BUSH et al. 2003). Jiní podávají

kortikosteron systemicky jednorázovou denní injekcí intraperitoneálně (COBURN-LITVAK et al. 2003, THOMPSON et al. 2004, SAJADI et al. 2006, PAKDEL, RASHIDY-POUR 2006). Jednorázové denní podání má zcela jinou dynamiku než přirozený průběh hladin nebo alespoň kontinuálně aplikovaná dávka a může mít odlišné důsledky.

Jsme si vědomi, že po chirurgické adrenalektomii se z ektopické adrenální tkáně uvolňuje neznámé, různé a proměnlivé množství steroidních hormonů, které ale zpravidla nedosahuje normálních hladin (PINSKER c.o. 2007). Hladiny hormonů byly v průběhu experimentu stanoveny biochemicky.

Srovnání účinku kortikoliberinu i kortikosteronu s literárními údaji lze provést jen přibližně, obtížně a s malým počtem literárních pramenů. Pro obě aplikované látky platí, že různí autoři používají různé techniky podání hormonů (i.c.v., i.p. a subkubkutánní), liší se časové rozložení aplikace (jednou nebo víckrát denně, jen výjimečně kontinuálně) i výše denní dávky (někdy i v úrovni řádu), dokonce také přesné složení hormonu (ve starších pracích téměř výhradně ovinní CRH).

Behaviorální metodiky

Etologický aspekt v této práci umožňuje odhalení jemných změn ve funkci a reakcích organismu ještě před výraznějšími změnami mikro- a makrostruktur celého nervového i humorálního systému, které mohou být později znovu překryty regeneračními či reparačními procesy. Behaviorální techniky jsem použila jako jedno z možných kritérií posouzení vlivu kortikosteronu a CRH na některé funkce a struktury mozku. Z literatury je známo, že zvýšené dávky kortikosteronu mohou mít neurotoxický vliv především na některé mozkové struktury, což by se mělo odrazit v behaviorálních projevech. Je s podivem, že lze nalézt jen poměrně málo prací, které se skutečně exaktně zabývají vlivem adrenálních glukokortikoidů a jejich liberinu a tropního hormonu na chování pokusných zvířat eventuálně člověka za různých experimentálních nebo přirozených podmínek.

Vlivy vnějšího prostředí jsem se snažila minimalizovat co možná největší standardizací v průběhu celého pokusu. O výsledcích ve všech

testech rozhoduje zdravotní stav (jako standardní podmínka) a typ nervové soustavy zvířete.

Dále používané pojmy pro druhy paměti (pracovní, krátkodobá, dlouhodobá, referenční) na základě její materiální realizace jsou objasněny v části Pojmy a zkratky.

Po předchozí zkušenosti jsem z baterie 8 v diplomové práci použitých behaviorálních testů zvolila 4 následující:

Úloha AAPA – Motivace je v této úloze pouze averzivní, konfliktní (elektrická ranka při vstupu do zakázaného sektoru). Úloha AAPA je prostorový test vyžadující navigaci (BURES et al. 1997), neustávající lokomoci a také pravděpodobně orientovanou pozornost. Zahrnuje vestibulární stimulaci (vyvolanou rotací arény; KLEMENT et al. 2010). Výsledky testu při přítomnosti orientačních bodů záleží na schopnosti vytvoření, uchování a vybavení paměťové stopy s různou délkou trvání, dále na schopnosti alotetické kognitivní prostorové orientace (podpořené orientací idiotetickou). Nezbytnou podmínkou je schopnost identifikovat relevantní orientační rámec. Test AAPA patří mezi úlohy prověřující složitější prostorovou orientaci a kognitivní koordinaci s možností sledovat více citlivějších parametrů (WESIERSKA et al. 2005). Řešení této úlohy je závislé na neporušené funkci hipokampu (CIMADEVILLA et al. 2000, WESIERSKA et al. 2005).

Úloha step-through – Motivace je v této úloze apetitivní a přirozená, ochranná. V pokusu je posílena dvěma habituačními sezeními a následně je apetitivní motivace v konfliktu s motivací averzivní, nepřirozenou (elektrická ranka) ve 3. sezení. Úlohy pasivního vyhýbání se jsou obecně podmiňovací testy, obsahující komponenty jak klasického (pavlovského), tak operantního podmiňování. Za standardních pokusných podmínek závisí výsledek zejména na poměru apetitivní a averzivní motivace a na schopnosti vytvoření, uchování a vybavení paměťové stopy konfliktu s různou délkou trvání. Úloha podmíněného averzivního učení se pasivnímu vyhýbání se místu prověřuje krátkodobou i dlouhodobou paměť a učení. Může sloužit i k testování integrity hipokampu. (IZQUIERDO, MEDINA 1993)

Úloha CTA – Motivace apetitivní, přirozená (pití po vyžínění a preference sladké chuti) a averzivní s biologickým ochranným významem, uměle navozená/přirozená (po aplikaci roztoku lithiumchloridu, který vyvolá příznaky otravy (gastrointestinální nevolle, malátnost a celková alterace stavu)). Ve 3. sezení je v konfliktu motivace apetitivní s averzivní. Podmíněná chuťová averze je ustálená behaviorální metodika pro studium neuronální plasticity. Výhodou tohoto testu jsou zejména dobře popsání zúčastněné anatomické struktury i fyziologické buněčné mechanismy a jednoduchost a přesnost měření. (BUREŠ et al. 1998) Výsledek testu závisí na schopnosti vypracovat podmíněnou reakci na jednorázový averzivní podnět (sladká chuť) a na poměru apetitivní a averzivní motivace a neofobie z neznámé chuti. Úloha podmíněného averzivního učení vyhýbání se nepříznivému podnětu testuje dlouhodobou asociativní paměť a učení.

Úloha v MWM – Motivace averzivní (voda = námaha a nepříjemnost plavání až hrozba utopení) i apetitivní (ostrůvek = odpočinek až záchrana) jsou dostatečné a v průběhu testu progresivně vzrůstají. Výsledek testu za světla a přítomnosti orientačních bodů nejvíce záleží na schopnosti alometrické kognitivní prostorové orientace (z části podpořené orientací idiotetickou) a na schopnosti vytvoření, uchování a vybavení paměťové stopy s různou délkou trvání. V MWM může být testována pracovní krátkodobá nebo referenční dlouhodobá paměť a prostorová orientace. Může sloužit i k testování integrity hipokampu. (MORRIS et al. 1990, WITTNER 2005)

Shrnutí úloh: Úloha AAPA je konfliktní (averzivní) s prostorovou složkou. Úloha CTA je konfliktní (apetitivně averzivní) bez prostorové složky. Úloha step-through je konfliktní (apetitivně averzivní) v našem uspořádání bez prostorové složky. Úloha v MWM je nekonfliktní (averzivně apetitivní) s prostorovou složkou.

Výsledky behaviorálních testů – po skupinách

Skupina [↑CRH] – U skupiny se zvýšeným CRH, s nízkým (substituovaným) kortikosteronem, adenalektomií bylo nalezeno zpomalení habituace a doby učení a též porušení dlouhodobé prostorové paměti.

Deficit pozorovaný v prvních třech dnech v úloze AAPA fáze A v parametru počtu vstupů do zakázaného sektoru je možno interpretovat jako zpomalené učení na podkladu prodloužení habituace na neznámé prostředí testovací aparatury. Toto prodloužení je pravděpodobně zapříčiněné i.c.v. podávaným CRH, který je běžně považován za anxiogenní. Je velmi pravděpodobné, že na zhoršených výsledcích prvních tří dnů se přednostně nepodílí ani tak kognitivní deficit, jako kortikoliberinem zvýšená anxiogenita. Tento názor je ve shodě s výsledky HEINRICHS et al. (1996), kteří u transgenních myší se zvýšenou produkcí CRH zaznamenali normalizování stavu v prostorové úloze po podání benzodiazepinu. Autoři vyvozují, že hyperemocionalita (u myší) brání učení v emocionálně náročnějších kontextech (skrytá platforma v MWM). Také já jsem přesvědčena, že stejně i u potkanů zvýšená anxieta navozená aplikací CRH zpomaluje habituaci a prodlužuje učení ve složitých prostorových kontextech (úloha AAPA). To se mohlo projevit zvláště u adenalektomovaných zvířat (tedy bez možnosti glukokortikoidové odpovědi) s nízkou substitucí kortikosteronu, navozující nepoměr kortikoliberinu a kortikosteronu v příslušných centrech mozku oproti normálnímu stavu. Změna by mohla příčinně souviset se změnou ve vnímání intenzity motivace vzhledem k tomu, že hipokampus je místem s množstvím kortikoidových receptorů uplatňujících se mimo jiné v negativním zpětnovazebném působení na HHA osu.

Tato interpretace výsledků u adenalektomované skupiny je ve shodě s dvěma skutečnostmi z našeho pokusu - jednak pozorovaným anxiózním chováním i v ostatních testech a jednak i se skutečností, že v žádném jiném testu se během aplikace hormonů deficit paměti ani v náznaku neprojevil.

V druhém testu AAPA (ve fázi B) byl po šestém týdnu od ukončení aplikace CRH nalezen deficit prostorové paměti, který se projevil jako kratší čas do prvního vstupu. Dále pro určitý paměťový deficit svědčí sice nesignifikantní, ale zřetelné zkrácení maximálního času mezi vstupy do

zakázaného sektoru. Ovlivnění prostorové složky v obou fázích dohromady dosvědčuje změnu v prostorovém chování (kratší čas strávený v časově nejbezpečnějším prostoru arény). Tento efekt lze připsat vlivu na prostorovou složku paměťové stopy.

Nalezené zhoršené výsledky v testech svědčí pro významné zpomalení učení a ovlivnění motivační složky chování (anxieta) během aplikace a po ukončení aplikace pro určitý deficit v prostorové paměti.

Skupina [\uparrow CRH \uparrow CS] – U skupiny se zvýšeným CRH a následně endogenně zvýšeným kortikosteronem bylo nalezeno značné porušení učení, paměti (krátkodobé i dlouhodobé) a kognitivní koordinace.

Hluboký deficit pozorovaný v úloze AAPA (jak ve fázi A, tak ve fázi B) ve více parametrech přetrvává bez známek zlepšení i v šestém týdnu od ukončení aplikace CRH. V tomto pokusu aplikované mimohypothalamické CRH může ovlivnit HHA osu a má také zprostředkovaně omezující účinek na neuronální aktivitu hipokampu (REBAUDO et al. 2001). Biologický význam těchto jevů je stále nejasný, ale naše výsledky podporují názor, že i nedlouhodobě zvýšené hladiny CRH mohou narušit učení v náročnějších prostorových úlohách vyžadujících integritu hipokampu, jako je v našem případě úloha AAPA.

Úlohu step-through a ještě i jiné pasivní testy použili VELDHUIS, DEWIED (1984) při zkoumání vlivu CHR na chování potkanů wistar. Zjistili, že při subkutánní aplikaci vysoké dávky (300 ng) je zapamatování v pasivních testech zhoršeno pravděpodobně zvýšením kortikoidů v krvi. Naproti tomu při nízké subkutánní dávce (30 ng) není HHA osa aktivována a zapamatování je naopak usnadněno. Jednorázová intracerebroventrikulární aplikace 30 ng CRH způsobila stejný deficit paměti jako vysoká dávka subkutánní. To je v principiálním souladu s našimi výsledky této skupiny (aplikace CRH intracerebroventrikulární), u které se sice projevil jistý trend ke zhoršení v paměti dlouhodobé, nebyl však signifikantní. Ve shodě s našimi výsledky našli DIAMANT, DEWIED (1993) zeslabení paměťové stopy v úloze step-through po intracerebroventrikulární (ve shodě s námi)

jednorázové (na rozdíl od nás) aplikaci CRH neadrenalektomovaným potkaním samcům kmene wistar, což v principu odpovídalo této skupině.

Celkové výsledky svědčí pro hlubší, poškození učení, paměti i chování v složitějších averzivních konfliktních úlohách na rozdíl od úloh jednodušších averzivně apetitivních (CTA). To lze vysvětlit i přítomností konfliktu v zadání úlohy, který zvířata zřejmě nejsou schopna v složitějších podmínkách adekvátně řešit.

U této skupiny pochopitelně dochází k nejvýraznějším a dlouhodobým změnám v chování. Je pravděpodobné, že příčinou je společné zvýšení jak CRH tak kortikosteronu a tento společný vliv má jiný efekt než samotný zvýšený CRH nebo samotný zvýšený kortikosteron. To zřetelně vyplývá při porovnání výsledků jednotlivých experimentálních skupin. Závažnější důsledky současného působení vyšších hladin obou hormonů je možné vysvětlit zcela přirozeně tím, že zasáhnou HHA osu na minimálně dvou regulačních místech a tím snáze způsobí její delibraci.

U této skupiny bylo nalezeno významné narušení kognitivní koordinace v na vlně vysoce náročných úlohách (AAPA). Tento deficit přetrvával minimálně do konce experimentu (6 týdnů). Výsledky v testu step-through také naznačují poškození dlouhodobé paměti, které však nebylo průkazné. Nebyly nalezeny změny v ostatních, kognitivně jednodušších testech.

Skupina [↑CS] – Skupina s dlouhodobě zvýšeným kortikosteronem měla velmi pravděpodobně zároveň sníženou hladinu CRH na podkladě negativní zpětné vazby v systému HHA osy, čemuž nasvědčují i výsledky stanovení ACTH. Je zajímavé, že u této skupiny byla zaznamenána zvýšená hladina kortikosteronu i v dlouhodobém horizontu šesti týdnů od ukončení aplikace hormonu při snížené hladině ACTH. To by bylo možno vysvětlit dvěma způsoby: perzistencí vyšší koncentrace na transkriptinové proteiny navázaného kortikosteronu, nebo zvýšením citlivosti adrenální kůry na ACTH.

U skupiny se zvýšeným kortikosteronem bylo nalezeno zejména porušení dlouhodobé paměti, mírný deficit krátkodobé paměti a změna prostorové strategie.

Při řešení úlohy AAPA byl zjištěn rozdíl od kontrolní skupiny pouze v jiné prostorové strategii. Ovlivnění prostorové složky první den ve fázi B i souhrnně za obě fáze A a B ukazuje na změnu v prostorovém chování (kratší čas strávený v časově nejbezpečnějším prostoru arény). Tato jiná prostorová strategie, která nezhoršila výsledky v jiných měřených parametrech, naznačuje větší jistotu při řešení prostorové úlohy a neporušenost paměťové stopy řešení této kognitivně náročné úlohy.

V úloze step-through bylo nalezeno výrazné poškození dlouhodobé paměti (24 hodin od konfliktu) a v pokusu viditelné (i když statisticky nesignifikantní) poškození i paměti krátkodobé (90 minut od konfliktu).

Ve výsledcích v testu podmíněné chuťové averze bylo zaznamenáno změněné chování hodnocené jako deficit v dlouhodobé paměti (vysoké procento vypitého sacharinového roztoku 5. den) u této skupiny na rozdíl od kontrol i od ostatních experimentálních skupin.

V testu v MWM byla paměť dlouhodobá výrazně zhoršena pouze u této experimentální skupiny s vysokým kortikosteronem. To je v souladu s literaturou (COBURN-LITVAK et al. 2003), kteří u potkanů sprague-dawley v jiných prostorových testech rovněž našli zhoršení dlouhodobé paměti po 21 denní intraperitoneální aplikaci kortikosteronu.

Výsledky testů u této skupiny jsou ve shodě s obecně přijímaným názorem, že kortikoidy poškozují především paměť dlouhodobou, zatímco krátkodobou později a jen v omezené míře.

Za příčinu deficitu v úloze step-through zjištěného u této skupiny i v krátkodobé paměti je možné považovat snížení vnímání významnosti averzivního stimulu v testech konaných v době aplikace hormonu. Tomu by nasvědčovalo, že při testu v MWM konaném později již bez aplikace látek došlo k narušení jen paměti dlouhodobé. Snížení vnímání významnosti averzivního stimulu může být zapříčiněno stresovou analgezií, ale spíše subjektivně nižší významností podnětu (nekognitivní deficit).

Dále je možné se domnívat, že příčinou poškození v testu v MWM mohou být v důsledku dřívější aplikace kortikosteronu progredující neurodegenerativní procesy na rozdíl od ovlivnění motivace aktuálně působícím zvýšeným kortikosteronem v testu step-through.

Lze namítnout, že závažnější kognitivní deficity pozorované v úloze step-through způsobené podáváním kortikosteronem mohou být reparovány restitučními procesy probíhajícími v CNS po skončení aplikace (a tedy budou nezastížitelné v krátkodobé paměti v později konaném testu v MWM).

Pro nějaký druh poškození paměťového procesu však svědčí i negativní ovlivnění tvorby podmíněné chuťové averze (podmíněného reflexu) na sladkou chuť v úloze CTA.

Dlouhodobě podávaný kortikosteron měnil prostorovou strategii chování v úloze AAPA a ovlivnil výsledky v úlohách step-through, CTA a MWM - pravděpodobně snižoval anxieta zvířat při konání úlohy, což mohlo vést k jiným prostorovým strategiím a/nebo způsobil paměťový deficit nejprve v krátkodobém intervalu a přeneseně následně i v dlouhodobém intervalu od podnětu a tedy způsobil zhoršení měřených parametrů. Tyto dvě možné příčiny zhoršení výsledků se pouze na podkladu behavioristiky nepodařilo oddělit.

Na základě volumetrických změn v hipokampu nalezených později po ukončení behaviorálních experimentů je možno považovat za nejpravděpodobnější vysvětlení, že jde o skutečný paměťový deficit, který mohl být v době podávání kortikosteronu posílen sníženým vnímáním averzivní motivace.

U skupiny se zvýšeným kortikosteronem bylo nalezeno porušení dlouhodobé paměti (step-through, CTA, MWM), pozorované mírné zhoršení krátkodobé paměti (step-through) nebylo signifikantní. Naproti tomu nebyla porušena náročná kognitivní koordinace (AAPA), ale byla nalezena změna prostorového chování v této úloze.

Histologie, volumetrie

Histologická zkoumání a volumetrická měření mozkových struktur byla provedena pouze u skupiny se zvýšeným kortikosteronem ([↑CS]). Důvodem jsou jednoznačné literární údaje, že přímé působení CRH a to jak in vitro tak in vivo nevykazuje neurotoxické účinky. Podle výsledků, které publikovali CRAIGHEAD et al. (2000) může CRH dokonce zabránit buněčné smrti způsobené oxidačním stresem v buněčných kulturách. Na druhé straně však bylo již dříve známo, že CRH může nepříznivě ovlivňovat neuronální plasticitu a že může částečně, ale významně přispívat k neurotoxicitě a neurodegeneraci způsobené jinými činiteli. Jedním z možných vysvětlení by byl negativní vliv CRH na průtok krve mozkovými kapilárami, což ovlivňuje mimo jiné koncentraci excitačních aminokyselin. (CRAIGHEAD et al. 2000)

U skupiny se zvýšeným kortikosteronem jsme nenašli výrazné snížení (ani ev. zvýšení) počtu neuronů ani obecné známky neurodegenerace v prefrontálním kortexu, amygdale ani hipokampu. To je v souladu se zjištěním TATA et al. (2006), kteří popsali pouze ultrastrukturální změny u zvířat po aplikaci kortikosteronu. Některé starší práce (SAPOLSKY et al. 1985, WOOLLEY et al. 1990) popisují naproti tomu určité všeobecné změny v tělech neuronů i jejich dendritů a mírnou atrofii případně až úbytek hipokampálních neuronů. Určitý rozdíl ve výsledcích různých autorů může být způsoben užitím různých histologických technik.

Rovněž naše výsledky ukázaly i při výrazných změnách chování jen menší poškození CNS struktur. Je možno se domnívat, že eventuální změny v mozkových strukturách, ke kterým v našem případě mohlo dojít, jsou na subcelulární úrovni, nezachytitelné klasickými histologickými technikami. Naše histologické vzorky byly odebrány až po šesti týdnech od konce aplikace kortikosteronu a nelze vyloučit, že v této době mohlo dojít k překrytí průkazu neurodegenerativních změn změnami restitučními (SAPOLSKY et al. 1985). Je také možné, že obecně i významná behaviorální změna nemusí být doprovázena patrnou změnou neuronální struktury.

Výrazným přínosem naší práce bylo stanovení asymetrie změn v pravém a levém hipokampu, což bývá ve většině prací na podobné téma opomíjeno. Zjistili jsme, že u intaktních potkanů long-evans linie AV ČR je objem pravého hipokampu signifikantně větší než levého, objem pravé a levé

hemisféry se neliší. Ve sporadické literatuře jsou publikovány rozdíly objemu někdy ve prospěch levé (SAHIN et al. (2001), jindy pravé hemisféry (KOLB et al. 1982). Naše výsledky volumetrického stanovení objemů hipokampu u kontrol lze do určité míry srovnat se zjištěními VERSTYNEN et al. (2001) a TANG et al. (2008), kteří u potkaních samců kmene long-evans středního věku vystavených postnatálně (do tří týdnů) variabilnímu prostředí zjistili rovněž větší pravý hipokampus. Námi stanovený objem pravé hemisféry u kortikosteronových zvířat se vzhledem ke kontrolám zmenšil. Levý hipokampus ani levá hemisféra se vzhledem ke kontrolám neměnila. Po dlouhodobé aplikaci kortikosteronu jsme našli nejen zmenšení objemu pravého hipokampu oproti kontrolám, ale navíc i oproti levému hipokampu této skupiny.

Shrnutí diskuse

Hormonální narušení hypothalamo-hypofyzo-adrenální osy na různých úrovních (jen \uparrow CRH nebo \uparrow CRH s \uparrow CS nebo jen \uparrow CS) v našich pokusech vedlo k poškození kognitivních schopností zvířat. U skupiny se zvýšeným kortikosteronem jsme zjistili histologicko-morfologické změny mozku, resp. hipokampu.

Po sedmi týdnech od ukončení podávání kortikosteronu byla zjištěna změna objemu a laterality hipokampu. Tato změna však nebyla způsobena asymetrickým úbytkem počtu neuronů v hipokampové struktuře, ale pravděpodobně zmenšením jejich objemu a snížením počtu dendritického větvení.

Narušení osy kortikoliberinem a/nebo kortikosteronem má vliv zejména na mozkové struktury obsahující vysokou koncentraci glukokortikoidových receptorů, zejména hipokampus a amygdalu; nejdříve snižují jejich neuroplasticitu, později vedou až k neurodegeneraci.

Paměťové stopy, které jsou vytvořeny při jen krátkém působení kortikoidů ve fázi ještě intaktní neuroplasticity hipokampu, jsou dostatečně konzervovány a přetrvávají delší dobu neporušené než paměťové stopy vzniklé při nebo po dlouhodobějším působení vyšších hladin kortikoidů. Lze předpokládat, že změny v chování, paměti i učení jsou založeny na funkčních a později strukturních změnách částí mozku významných pro tyto funkce.

Období mezi druhým a třetím týdnem aplikace kortikosteronu bylo kritické pro vytvoření a fixování normální paměťové stopy u skupiny se zvýšeným kortikosteronem ([↑CS]). U skupin se zvýšeným kortikoliberinem ([↑CRH] a [↑CRH↑CS]) byly první příznaky poruch chování zaznamenány mezi druhým a třetím týdnem aplikace, ale mohly vzniknout i dříve. (U těchto dvou skupin to nebylo možno z výsledků rozhodnout, protože v této době neprobíhaly žádné behaviorální testy.)

Stanovení nejčasnější hranice vzniku zřetelných histomorfologických změn u kortikosteronové skupiny by vyžadovalo další testování.

Samotný intracerebroventrikulárně aplikovaný kortikoliberin ovlivňoval některé složky chování. Samotný aplikovaný kortikosteron ovlivňoval chování v jiných jeho složkách. Aplikovaný kortikoliberin a v závislosti na něm endogenně zvýšený kortikosteron působily na chování jinak než oba hormony odděleně.

CRH samotný postihoval kognitivně náročnější úlohy zejména zvýšením anxiozity. CRH v kombinaci s kortikosteronem působil hlubší a trvalejší postižení v kognitivně náročnějších úlohách. Samotný kortikosteron ovlivňoval zejména paměťovou ev. motivační složku (zmenšoval význam averzivních podnětů a tedy přes hipokampus jdoucí amygdalou podmíněný podnět k tvorbě paměťové stopy) - moduloval sílu a význam paměťové stopy. Toto postižení mělo zřejmě podklad v poškození funkce a struktury hipokampu.

Změna objemové laterality a funkční pravolevé dominance hipokampu mohla být a pravděpodobně byla příčinou kognitivních deficitů u zvířat ovlivněných kortikosteronem.

Společné působení obou hormonů není součtem ani součinem vlivů izolovaných, nýbrž jinou kvalitou.

Z našich pokusů vyplynulo, že CRH a glukokortikoidy ovlivňují chování do určité míry antagonicky. Zatímco převaha kortikoliberinu působí a prohlubuje anxiozitu (úzkostlivost), vyvolává přebytek glukokortikoidu naopak trankvilitu (poklid). Vztah obou těchto hormonů můžeme pozorovat u zvířat (ale i u lidí) jako behaviorální odraz, který může mít tento hormonální podklad.

Závěry

Po aplikaci kortikosteronu a/nebo kortikoliberinu u pokusných laboratorních potkanů kmene long-evans byly zjišťovány změny chování ve vybraných čtyřech různých behaviorálních testech a také změny volumetrie a histologie mozkové tkáně, resp. hipokampu. Výsledky podpořily experimentální hypotézu. Následující body odpovídají na konkrétní položené otázky v kapitole Cíle (:18).

I.a) [↑CRH] – Intracerebroventrikulárně kontinuálně aplikovaný kortikoliberin osmotickou pumpou po dobu 4 týdnů (42 µg celkem, tj. 1,5 µg na den) se současnou bilaterální adrenalectomií a s následnou nízkou substitucí kortikosteronem (35mg celkem, tj. 1,4 mg na den) způsobil zřetelnou změnu chování.

I.b) Bylo nalezeno prodloužení habituační doby způsobené anxiétou a prodloužení doby učení a též porušení dlouhodobé paměti.

II.a) [↑CRH ↑CS] – Intracerebroventrikulárně kontinuálně aplikovaný kortikoliberin osmotickou pumpou po dobu 4 týdnů (42 µg celkem, tj. 1,5 µg na den) s endogenně zvýšeným kortikosteronem způsobil zřetelnou změnu chování.

II.b) Narušena byla především kognitivní koordinace a dlouhodobá paměť.

III.a) [↑CS] – Kortikosteron kontinuálně uvolňovaný ze subkutánní pelety po dobu 3 týdnů (200 mg celkem, tj. 9,52mg na den) způsobil zřetelnou změnu chování.

III.b) Bylo nalezeno porušení dlouhodobé paměti, mírný deficit krátkodobé paměti a změna prostorového chování.

III.c) Byla zjištěna změna objemu a převrácení pravolevé objemové dominance (laterality) hipokampu, která nebyla způsobena úbytkem neuronů.

Možnosti dalšího výzkumu:

Navržený a použitý způsob testování a aplikace látek se jeví jako perspektivní pro sledování významu glukokortikoidů a kortikoliberinu ve fyziologii a patofyziologii hypotalamo-hypofyzo-adrenální osy. Lze uvažovat i o využití při výzkumu některých psychiatrických poruch a onemocnění a studovat možnosti potenciálních terapeutických přístupů, které by zabránily negativním behaviorálním a neurodegenerativním změnám při patické aktivaci stresové osy.

SOUHRN

Práce se zabývá vlivem kortikoliberinu a kortikosteronu na chování, paměť a učení a na histomorfologické změny hipokampu. Pokus byl proveden na potkanech – samcích kmene long-evans, linie AVČR, Krč – stáří cca 3 měsíce, váha kolem 350g.

Zkoumané látky byly aplikovány kontinuálně; kortikoliberin osmotickou pumpou do pravé postranní mozkové komory po dobu 4 týdnů, kortikosteron subkutánní peletou po tři týdny. Zvířata byla rozdělena do tří experimentálních skupin a skupiny kontrolní. Skupina [\uparrow CRH] (n=6) osmotickou pumpou podaný kortikoliberin (1,5 μ g na zvíře a den), provedena adrenalektomie, substituce kortikosteronem podkožní peletou (1,4 mg na zvíře a den). Skupina [\uparrow CRH \uparrow CS] (n=11) osmotickou pumpou podaný kortikoliberin (1,5 μ g na zvíře a den). Třetí skupina [\uparrow CS] (n=10) měla kortikosteron podaný subkutánní peletou (9,52 mg na zvíře a den). Skupina kontrolní (n=10) bez zásahu. Všechny skupiny byly podrobeny čtyřem různým behaviorálním testům – test aktivního alotetického vyhýbání se místu (AAPA), step-through, test podmíněné chuťové averze (CTA), a testu v Morrisově vodním bludišti (MWM).

U skupiny [\uparrow CRH] bylo nalezeno prodloužení habituační doby způsobené anxiétou a prodloužení doby učení a též porušení dlouhodobé paměti. U skupiny [\uparrow CRH \uparrow CS] byla narušena především kognitivní koordinace a dlouhodobá paměť. U skupiny [\uparrow CS] bylo nalezeno porušení dlouhodobé paměti, mírný deficit krátkodobé paměti a změna prostorového chování. U této skupiny byla zjištěna změna objemu a převrácení pravolevé objemové dominance (laterality) hipokampu, která nebyla způsobena úbytkem neuronů.

V našich pokusech CRH samotný postihoval kognitivně náročnější úlohy (AAPA) zejména zvýšením anxiózy zvířat. CRH v kombinaci s kortikosteronem působil hlubší a trvalejší postižení v kognitivně náročnějších úlohách (AAPA). Samotný kortikosteron pravděpodobně ovlivňoval zejména paměťovou ev. motivační složku – moduloval sílu a význam paměťové stopy. Toto postižení mělo zřejmě podklad v poškození funkce a struktury hipokampu zjištěné po ukončení pokusu.

Zdá se, že paměťové stopy, které byly vytvořeny při jen krátkém působení kortikoidů ve fázi ještě intaktní neuroplasticity hipokampu, byly dostatečně konzervovány a přetrvávaly delší dobu než paměťové stopy vzniklé při nebo po delším působení vyšších hladin kortikoidů.

Období mezi druhým a třetím týdnem aplikace kortikosteronu bylo kritické pro vytvoření a fixování normální paměťové stopy u skupiny se zvýšeným kortikosteronem ([↑CS]). U skupin se zvýšeným kortikoliberinem ([↑CRH] a [↑CRH↑CS]) byly první příznaky poruch chování zaznamenány mezi druhým a třetím týdnem aplikace, ale mohly vzniknout i dříve. U těchto dvou skupin to nebylo možno z výsledků rozhodnout, protože v této době neprobíhaly žádné behaviorální testy.

Z našich pokusů vyplývá, že CRH a glukokortikoidy ovlivňují chování do určité míry antagonicky. Zatímco převaha kortikoliberinu působí a prohlubuje anxiozitu (úzkostlivost), vyvolává přebytek glukokortikoidu naopak trankvilitu (poklid). Vliv poměru obou těchto současně na mozek působících hormonů se může uplatňovat při modulaci behaviorálního projevu – chování. Společné působení obou hormonů není však součtem ani součinem vlivů izolovaných, nýbrž jinou kvalitou.

SUMMARY

Dissertation deals with the influence of corticoliberin and corticosterone on behavior, memory and learning and the histomorphological changes in the hippocampus. The experiment was performed on rats – long-evans strain, line AV ČR, Krč (male, age ca three months, weight ca 350g).

The hormones used were administrated continuously; corticoliberin by the osmotic pump into the right lateral cerebral ventricle for four weeks, corticosterone by the subcutaneous pellet for three weeks. The animals were divided into three experimental groups and one control group. The group [↑CRH] (n=6) osmotic pump-applied corticoliberin (1,5 µg per animal per day), it was made adrenalectomy with substitution by corticosterone subcutaneous pellet (1,4 mg per animal per day). The group [↑CRH↑CS] (n=11) osmotic pump-applied corticoliberin (1,5 µg per animal per day). The third experimental group [↑CS] (n=10) corticosterone was administered by subcutaneous pellet (9,52 mg per animal per day). The control group (n=10) was without any treatment. All groups were subjected to four various behavioral tests - test of active allothetic place avoidance (AAPA), step-through test, conditioned taste aversion (CTA), and test in Morris' water maze (MWM).

In the [↑CRH] group was found extension of habituation period caused by anxiety and prolongation of learning and a damage of long-term memory too. In the [↑CRH↑CS] group primarily cognitive coordination and also long-term memory were damaged. In the [↑CS] group impairment of long-term memory, a mild short-term memory deficit and also a change of spatial behavior were observed. Additionally, in this group were found the changes in the volume of the whole hippocampus and overturn of right-left volume dominance (laterality) of hippocampus, which were not caused by loss of neurons.

In our experiments, CRH itself affected the cognitively more demanding task (AAPA), mainly by increasing the anxiety of the animals. CRH in combination with corticosterone caused deeper and more permanent disability in cognitively more demanding tasks (AAPA). Corticosterone itself probably influenced mainly memory eventually motivational component which

modulated power and importance of memory traces. This impairment was based apparently on damage of the function and structure of the hippocampus, which was observed after the experiment.

It seems that memory traces created with only a short time in the influence of corticosteroids still intact hippocampal neuroplasticity were sufficiently preserved and persisted longer than the memory traces incurred during or after prolonged exposure to higher levels of corticosteroids.

The period between the second and third weeks of corticosterone administration was critical for normal development and fixing of memory traces in the group with elevated corticosterone ([↑CS]). For groups with increased corticoliberin ([↑CRH] and [↑CRH↑CS]) were the first signs of behavioral disturbances observed between the second and third weeks of application, but might occur earlier. For these two groups from the results was not possible to determine it, because in this time no behavioral tests were performed.

From our experiments implies that CRH and glucocorticoids affect behavior to some extent in antagonistic manner. While the preponderance of corticoliberin acts and deepens anxiety, in contrary excess of glucocorticoids induces tranquility. The effect of the relation between these two simultaneously acting on the brain hormones can be applied to modulate behavioral expression. The combined influence of both hormones, is not the sum or product of their isolated effects, but it has another, different quality.

LITERATURA

1. ARANA G.W., R.J. BALDESSARINI, M. ORNSTEN (1985) The dexamethazone suppression test for diagnosis and prognosis in psychiatry. *Arch.gen.Psychiat.*42:1193-1204
2. ALFAREZ D.N., O. WIEGERT H.J. KRUGERS (2006) Stress, corticosteroid hormones and hippocampal synaptic function. *CNS neurol.Disord.Drug Targ.*5:521-529
3. BAKER D.G., S.A. WEST, W.E. NICHOLSON, N.N. EKHATOR, J.W. KASCKOW, K.K. HILL, A.B. BRUCE, D.N. ORTH, T.D. GERACIOTI JR. (1999) Serial CSF corticotropin-releasing hormone levels and adrenocortical activity in combat veterans with post-traumatic stress disorder. *Am.J.Psychiat.*156(4):585-588;erratum in:*Am.J.Psychiat.* 156(6):986
4. BATS S, J.L. THOUMAS, B. LORDI, M.C. TONON, R. LALONDE, J. CASTON (2001) The effects of a mild stressor on spontaneous alternation in mice. *Behav.Brain Res.* 118:11–15
5. BELANOFF J.K., K. GROSS, A. YAGER, A.F. SCHATZBERG (2001) Corticosteroids and cognition. *J.psychiatr.Res.* 35:127–145
6. BENDLOVÁ B. (2006) c.o.
7. BENOIT S.C., T.E. THIELE, S.C. HEINRICHS, P.A. RUSHING, K.A. BLAKE, R.J. STEELE (2000) Comparison of central administration of corticotropin-releasing hormone and urocortin on food intake, conditioned taste aversion, and c-Fos expression. *Peptides* 21(3):345-351
8. BEYLIN A.V., T.J. SHORS (2003) Glucocorticoids are necessary for enhancing the acquisition of associative memories after acute stressful experience. *Horm.Behav.* 43:124–131
9. BODNOFF S.R., A.G. HUMPHREYS, J.C. LEHMAN, D.M. DIAMOND, G.M. ROSE, M.J. MEANEY (1995) Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J.Neurosci.*15(1):61-69
10. BOSCH O.J., H.P. NAIR, T.H. AHERN, I.D. NEUMANN, L.J. YOUNG (2009) The CRF system mediates increased passive stress-coping behavior following the loss of a bonded partner in a monogamous rodent. *Neuropsychopharmacology* 34:1406–1415
11. BREMNER J.D., P. RANDALL, T.M. SCOTT, R.A. BRONEN, P.J. SEIBYL, S.M. SOUTHWICK, R.C. DELANEY, G. MCCARTHY, D.S. CHARNEY, R.B. INNIS (1995) MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic disorder (see comments). *Am.J.Psychiat.*152:973-981
12. BREMNER J.D., M. NARAYAN, E.R. ANDERSON, L.H. STAIB, H.L. MILLER, D.S. CHARNEY (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *Am.J. Psychiatry* 157:115-118
13. BROWN E.S., A.J. RUSH, B.S. MCEVAN (1999) Hippocampal remodeling and demage by corticosteroids: implication for mood disorders. *Neuropsychopharmacology* 21:474-484
14. BRUNNER R, D. SCHAEFER, K. HESS, P. PARZER, F. RESCH, S. SCHWAB (2005) Effect of corticosteroids on short-term and long-term memory. *Neurology* 64(2):335–337
15. BUREŠ J., F. BERMÚDEZ-RATTONI, T. YAMAMOTO (1998) Conditioned taste aversion. *Memory of a special kind.* Oxford Univ.Press, Oxford
16. BURES J, A.A. FENTON, Y. KAMINSKY, J. ROSSIER, B. SACCHETTI, L. ZINYUK (1997) Dissociation of exteroceptive and idiothetic orientation cues: effect on hippocampal place cells and place navigation. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.,Biol.Sci.*352 (1360):1515-1524

17. BUSH V.L., D.N. MIDDLEMISS, C.A. MARSDEN, K.C. FONE (2003) Implantation of a slow release corticosterone pellet induces long-term alterations in serotonergic neurochemistry in the rat brain. *J.Neuroendocrinol.*15(6):607-613
18. CIMADEVILLA J.M., Y. KAMINSKY, A. FENTON, J. BURES (2000) Passive and active place avoidance as a tool of spatial memory research in rats. *J.Neurosci.Meth.* 30(2):155-164
19. COBURN-LITVAK P.S., K. POTHAKOS, D.A. TATA, D.P. MCCLOSKEY, B.J. ANDERSON (2003) Chronic administration of corticosterone impairs spatial reference memory before spatial working memory in rats. *Neurobiol.Learn.Mem.*80(1):11-23
20. CRAIGHEAD M.W., H. BOUTIN, K.M. MIDDLEHURST, S.M. ALLAN, N. BROOKS, I. KIMBER, N.J. ROTHWELL (2000) Influence of corticotrophin releasing factor on neuronal cell death in vitro and in vivo. *Brain Res.*27(2):139-143
21. CUNNINGHAM J.J., P.A. MEARA, R.Y. LEE, H.H. BODE (1988) Chronic intracerebroventricular CRF infusion attenuates ACTH-corticosterone release. *Am.J. Physiol.*255(2):213-217
22. DAGYTE G, E.A. ZEE, F. POSTEMA, P.G. LUITEN, J.A. DEN BOER, A. TRENTANI, P. MEERLO (2009) Chronic but not acute foot-shock stress leads to temporary suppression of cell proliferation in rat hippocampus. *Neuroscience* 162:904–913
23. DEUSSING J.M., A. LU, M.A. STEINER, A.M. VOGL, F. HOLSBOER, C.T. WOTJAK, W. WURST (2008) Conditional overexpression of corticotropin-releasing hormone in mice, an animal model for understanding the development of corticotropin-releasing hormone-mediated brain pathology. *Int.J.Neuropsychopharmacol.*11:117
24. DIAMANT M., D. DEWIED (1993) Structure-related effects of CRF and CRF-derived peptides: dissociation of behavioral, endocrine and autonomic activity. *Neuroendocrinology* 57(6):1071-1081
25. DUNCKO R, A. KISS, I. SKULTETYOVÁ, M. RUSNAK, D. JEZOVA (2001) Corticotropin-releasing hormone mRNA levels in response to chronic mild stress rise in male but not in female rats while tyrosine hydroxylase mRNA levels decrease in both sexes. *Psychoneuroendocrinology* 26:77–89
26. DUNCKO R, M. SCHWENDT, D. JEZOVA (2003) Altered glutamate receptor and corticoliberin gene expression in brain regions related to hedonic behavior in rats. *Pharmacol.Biochem.Behav.*76:9–16
27. ELHAGE W., G. GRIEBEL, C. BELZUNG (2006) Long-term impaired memory following predatory stress in mice. *Physiol.Behav.*87:45–50
28. FEKETE M., M. BALAZS, G. TELEGDY, A.V. SCHALLY (1985) Effects of intracerebroventricular administration of ovine corticotropin-releasing factor (CRF 1-41) on passive avoidance behaviour: lack of influence on monoamine contents of limbic brain areas. *Neuropeptides* 6(4):283-292
29. FELDMAN S., J. WEIDENFELD (1995) Neural mechanisms involved in the corticosteroid feedback effects on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog.Neurobiol.*45:129-141
30. GARCIA J., D.J. KIMELDORF, R.A. KOELLING (1955) Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science* 122:157-158
31. GLUCK M.E. (2006) Stress response and binge eating disorder. *Appetite* 46(1):26–30
32. GRAMMATOPOULOS D.K., G.P. CHROUSOS (2002) Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH receptor antagonists. *Trends Endocrino.Metab.*13:436–444
33. GREENWALD B.S., A.A. MATHE, R.C. MOHS, M.I. LEVY, C.A. JOHNS, K.L. DAVIS (1986) Cortisol and Alzheimer's disease II: Dexamethasone suppression, dementia severity, and affective symptoms. *Am.J.Psychiatry* 143:442-446
34. GUNDERSEN H.J.G., T.F. BENDTSEN, L. KORBO, N. MARCUSSEN, A. MILLER, K. NIELSEN, J.R NYENGAARD, B. PAKKENBERG, F.B. SÖRENSEN, A. VESTBY, M.J. WEST (1988a) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:379-394

35. GUNDERSEN H.J.G., P. BAGGER, T.F. BENDTSEN, S.M. EVANS, L. KORBO, N. MARCUSSEN, A. MILLER, K. NIELSEN, J.R. NYENGAARD, B. PAKKENBERG, F.B. SÖRENSEN, A. VESTERBY, M.J. WEST (1988b) The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:857-881
36. GURVITS T.V., M.E. SHENTON, H. HOKAMA, H. OHTA, N.B. LASKO, M.W. GILBERTSON, S.P. ORR, R. KIKINIS, F.A. JOLESZ, R.W. MCCARLEY, R.K. PITMAN (1996) Magnetic resonance imaging study of hippocampal volume in choric, combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol.Psychiatry* 40:1091-1099
37. HÁJEK T. (2002) Antiglukokortikoidy v léčbě afektivních poruch. *Psychiatrie* 6(2):97-103
38. HÁJEK T., M. KOPEČEK, M. PREISS, F. CHARVÁT, R. PÁNKOVÁ, P. ARENBERGER, J. HERCOGOVÁ, V. BENEŠ, M. ALDA, C.HÖSCHL (2003) Prospektivní sledování objemu funkce hipokampu u osob léčených glukokortikoidy. *Psychiatrie* 7(4):251-257
39. HANSTEIN R., A. LU, W. WURST, F. HOLSBOER, J.M. DEUSSING, A.B.CLEMENT, C. BEHL (2008) Transgenic overexpression of corticotropin releasing hormone provides partial protection against neurodegeneration in an in vivo model of acute excitotoxic stress. *Neuroscience* 156:712-721
40. HARTLINE K.M., M.J. OWENS, C.B. NEMEROFF (1996) Postmortem and cerebrospinal fluid studies of corticotropin-releasing factor in humans. *Ann.N.Y.Acad. Sci.*780:96-105
41. HE W.B., J.L. ZHANG, J.F. HU, Y. ZHANG, T. MACHIDA, N.H. CHEN (2008) Effects of glucocorticoids on age-related impairments of hippocampal structure and function in mice. *Cell.mol.Neurobiol.*28:277-291
42. HEINRICHS S.C., M.P. STENZEL-POORE, L.H. GOLD, E. BATTENBERG, F.E. BLOOM, G.F. KOOB, W.W. VALE, E.M. PICH (1996) Learning impairment in transgenic mice with central overexpression of corticotropin-releasing factor. *Neuroscience* 74(2):303-311
43. HEINRICHS S.C., G.F. KOOB (2004) Corticotropin-releasing factor in brain: a role in activation, arousal, and affect regulation. *J.Pharmacol.exp.Ther.*311:427-440
44. HOYER S., H. LANNERT (2008) Long-term effects of corticosterone on behavior, oxidative and energy metabolism of parietotemporal cerebral cortex and hippocampus of rats: comparison to intracerebroventricular streptozotocin. *J.neural.Transm.*115:1241-1249
45. HÖSCHL C., T. HAJEK (2001) Hippocampal damage mediated by corticosteroids - a neuropsychiatric research challenge. *Eur.Arch.Psychiatry clin.Neurosci.*251 suppl.2:81-88
46. HÖSCHL C., T. HÁJEK, M. KOPEČEK (2004) Poškozují exogenně podávané kortikoidy mozek? *Psychiatrie* 8 suppl.2:20-23
47. CHAUVEAU F., C. TRONCHE, C. PIÉRARD, P. LISCIA, I. DROUET, M. COUTAN, D. BÉRACOCHEA (2010) Rapid stress-induced corticosterone rise in the hippocampus reverses serial memory retrieval pattern. *Hippocampus* 20:196-207
48. IZQUIERDO I., J.H. MEDINA (1993) Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Braz.J.med.biol.Res.*26:573-589
49. JOËLS M. (2008) Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur.J.Pharmacol.*583:312-321
50. KALIN N.H., L.K. TAKAHASHI, F.L. CHEN (1994) Restraint stress increases corticotropin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus. *Brain.Res.*656:182-186
51. KENT W.D., S.K. CROSS-MELLOR, M. KAVALIERS, K.P. OSSENKOPP (2002) Acute effects of corticosterone on LiCl-induced rapid gustatory conditioning in rats: a microstructural analysis of licking patterns. *Behav.Brain Res.*136(1):143-150
52. KING R.A., R.L. GLASSER (1970) Duration of electroconvulsive shock-induced retrograde amnesia in rats *Physiol.Behav.*5(3):335-339

53. KLEMENT D., D. LEVCIK, L. DUSKOVA, T. NEKOVAROVA (2010) Spatial task for rats testing position recognition of an object displayed on a computer screen. *Behav.brain Res.*207(2):480-489
54. KLENEROVÁ V., S. HYNIE (2002) Stres, paměť a návykové látky – účastníci se mechanismy. *Psychiatrie* 6 suppl.3:21-27
55. KLENEROVÁ V., O. KAMINSKÝ, P. ŠÍDA, I. KREJČÍ, Z. HLIŇÁK, S. HYNIE (2002) Impaired passive avoidance acquisition in Sprague-Dawley and Lewis rats after restraint and cold stress. *Behav.Brain Res.*17;136 (1):21 – 29
56. KOLB B., R.J. SUTHERLAND, A.J. NONNEMAN, I.Q. WHISHAW (1982) Asymmetry in the cerebral hemisphere of the rat, mouse, rabbit, and cat: the right hemisphere is larger. *Exp.Neurol.*78:348-359
57. KORZ V., J.U. FREY (2003) Stress-related modulation of hippocampal long-term potentiation in rats: Involvement of adrenal steroid receptors. *J.Neurosci.*23:7281–7287
58. KOUKOLÍK F. (2002) Lidský mozek. Portál, Praha
59. LACHIZE S., E.M. APOSTOLAKIS, S. VANDERLAAN, A.M. TIJSSEN, J. XU, E.R. DEKLOET, O.C. MEIJER (2009) Steroid receptor coactivator-1 is necessary for regulation of corticotropin-releasing hormone by chronic stress and glucocorticoids. *Proc.nat.Acad.Sci.USA.*106:8038–8042
60. LANDFIELD P.W. (1987) Modulation of brain aging correlates by long-term alterations of adrenal steroids and neurally-active peptides. *Prog.Brain Res.*72:279–300
61. LANDFIELD PW, J.C.ELDRIDGE JC. (1994) The glucocorticoid hypothesis of age-related hippocampal neurodegeneration: role of dysregulated intraneuronal calcium. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*746:308-326
62. LUSSIER A.L., H.J. CARUNCHO, L.E. KALYNCHUK (2009) Repeated exposure to corticosterone, but not restraint, decreases the number of reelin-positive cells in the adult rat hippocampus. *Neurosci.Lett.*460:170–174
63. MACLULLICH A.M., I.J. DARY, J.M. STARR, K.J. FERGUSON, J.M. WARDLAW, J.R. SECKL (2005) Plasma cortisol levels, brain volumes, and cognition in healthy elderly men. *Psychoneuroendocrinology* 30:505-515
64. MAGARINOS A.M., B.S. MCEWEN (1995) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience* 69(1):83–88
65. MAJZOUB J.A. (2006) Corticotropin-releasing hormone physiology. *Eur.J.Endocrinol.*155 sup.1:71-76
66. MARKOVITZ M.B.E., J. ARCHIBALD, H.G. DOWNIE (1964) Experimental surgery. The Williams and Wilkins comp., Baltimore
67. MAZARATI A.M., D. SHIN, Y.S. KWON, A. BRAGIN, E. PINEDA, D. TIO, A.N. TAYLOR, R. SANKAR (2009) Elevated plasma corticosterone level and depressive behavior in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiol.Disease* 34(3):457-461
68. MCEWEN B.S. (2008) Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur.J.Pharmacol.*583: 174-185
69. MCEWEN B.S., R.M. SAPOLSKY (1995) Stress and cognitive function. *Curr.Opin. Neurobiol.*5:205–216
70. MCGAUGH J.L., B. ROOZENDAAL (2002) Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr.Opin.Neurobiol.*12:205–210
71. MIZOGUCHI K., M. YUZURIHARA, A. ISHIGE, H. SASAKI, D.H. CHUI, T. TABIRA (2000) Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J.Neurosci.*20:1568–1574
72. MORRIS R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J.neurosci.Meth.*11:47-60
73. MORRIS R.G.M., F. SCHENK, F. TWEEDIE, L.E. JARRARD (1990) Ibutenate lesions of hippocampus and/or subiculum: dissociating components of allocentric spatial learning. *Europ.J.Neurosci.*2(12):1016-1028

74. NEMEROFF C.B., K.R. KRISHNAN, D. REED, R. LEDER, C. BEAM, N.R. DUNNICK (1992) Adrenal gland enlargement in major depression. A computed tomographic study (see comments). *Arch.Gen.Psychiatry* 49:384-387
75. OBRIEN J.T., D. AMES, I. SCHWEITZER, P. DESMOND, P. COLEMAN, B. TRESS (1997) Clinical, magnetic resonance imaging and endocrinological differences between delusional and non-delusional depression in the elderly. *Int.J.Geriatr.Psychiatry* 2:211-218
76. OKAMOTO E., T. TAKAGI, C. AZUMA, T. KIMURA, Y. TOKUGAWA, N. MITSUDA, F. SAJI, O. TANIZAWA (1990) Expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene in human placenta and amniotic membrane. *Horm.met.Res* 22(7):394-397
77. PAKDEL R., A. RASHIDY-POUR (2006) Glucocorticoid-induced impairment of long-term memory retrieval in rats: an interaction with dopamine D2 receptors. *Neurobiol. Learn.Mem.* 85(3):300-306
78. PAPEŽOVÁ H., A. YAMAMOTOVÁ, R. UHER (2005) Elevated pain threshold in eating disorders: physiological and psychological factors. *J.psychiatr.Res.* 39(4):431-438
79. PARKER K.L., W.E. RAINEY (2004) The adrenal glands. In: *Textbook of endocrine physiology.* (ed.) Griffin, Ojeda, Oxford Uni.Press, N.Y.:324-326
80. PAYNE J.D., L. NADEL (2004) Sleep, dreams, and memory consolidation: the role of the stress hormone cortisol. *Lear.Mem.* 11(6):671-678
81. PAXINOS G., CH. WATSON (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Acad. Press, London
82. PINSKER P. (2007) c.o
83. REBAUDO R, R. MELANI, M. BALESTRINO, N. IZVARINA (2001) Electrophysiological effects of sustained delivery of CRF and its receptor agonists in hippocampal slices. *Brain Res.* 922:112-127
84. REZACOVA L., J. SVOBODA, A. STUHLIK, K. VALES (2011) Differential effects of stable elevated levels of corticotropin-releasing hormone and systemic corticosterone on various types of rat learning. *Neuroendocrinol.Lett.* 32(2):101-113
85. ROMER A.S. (1962) *The vertebrate body.* Saunders, Philad., Lond.
86. ROOZENDAAL B. (2003) Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 27:1213-1223
87. RUSSELL J.A., A.J. DOUGLAS, P.J. BRUNTON (2008) Reduced hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: central opioid inhibition and noradrenergic mechanisms. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1148:428-438
88. ŘEZÁČOVÁ L. (2004) Paměť a prostorová orientace u potkanů *Rattus norvegicus* (Berkenhout 1769). Vliv dizocilpinu na NMDA receptorové kanály v experimentálních podmínkách. *Bakal.práce, Pff.UK, Praha*
89. ŘEZÁČOVÁ L. (2007) Působení kortikoliberinu a kortikosteronu na chování laboratorního potkana. *Dipl.práce, Pff.UK, Praha*
90. SAHIN B, H. ASLAN, B. UNAL, S. CANAN, S. BILGIC, S. KAPLAN, L. TUMKAYA (2001) Brain volumes of the lamb, rat and bird do not show hemispheric asymmetry: a stereological study. *Image Anal.Stereol.* 20:9-13
91. SAJADI A.A., S.A. SAMAEI, A. RASHIDY-POUR (2006) Intra-hippocampal micro-injections of anisomycin did not block glucocorticoid-induced impairment of memory retrieval in rats: an evidence for non-genomic effects of glucocorticoids. *Behav.Brain Res.* 2(1):158-162
92. SANDI C., J.C. WOODSON, V.F. HAYNES, C.R. PARK, K. TOUYAROT, M.A. LOPEZ-FERNANDEZ, C. VENERO, D.M. DIAMOND (2005) Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex. *Biol.Psychiatry.* 57:856-864
93. SAPOLSKY R.M. (1985) A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus – increased neuronal vulnerability to metabolic inzulte. *J.Neurosci.* 5:1228-1232
94. SAPOLSKY R.M. (1996) Why stress is bad for your brain. *Science* 273:749-750

95. SAPOLSKY RM (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch.Gen.Psychiat.*57:925–935
96. SAPOLSKY R.M., L.C. KREY, B.S. MCEWEN (1985) Prolonged glucocorticoid exposure reduces hippocampal neuron number: implications for aging. *J.Neurosci.*5(5):1222–1227
97. SELYE H. (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138:32
98. SHELINE Y.I., M. SANGHAVI, M.A. MINTUM, M.H. GADO (1999) Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J.Neurosci.*19:5034-5043
99. SCHMIDT M.V., V. STERLEMANN, K. WAGNER, B. NIEDERLEITNER, K. GANEA, C. LIEBL, J.M. DEUSSING, S. BERGER, G. SCHÜTZ, F. HOLLSBOER, M.B. MÜLLER (2009) Postnatal glucocorticoid excess due to pituitary glucocorticoid receptor deficiency: differential short- and long-term consequences. *Endocrinology* 150:2709–2716
100. SCHUBERT M.I., R. KALISCH, I.SOTIROPOULOS, C. CATANIA, N. SOUSA, O.F. ALMEDIA, D.P. AUER (2008) Effects of altered corticosteroid milieu on rat hippocampal neurochemistry and structure – an in vivo magnetic resonance spectroscopy and imaging study. *J.psychiatr.Res.*42:902-912
101. SKÓRZEWSKA ANNA, A. BIDZINSKI, MALGORZATA LEHNER, DANUTA TURZYNSKA, ALEKSANDRA WISLOWSKA-STANEK, ALICJA SOBOLEWSKA, J. SZYNDLER, P. MA-CIEJAK, EVA TARACHA, A. PLAZNIK (2006) The effects of acute and chronic administration of corticosterone on rat behavior in two models of fear respon-ses, plasma corticosterone concentration, and c-Fos expression in the brain structures. *Pharmacol.Biochem.Behav.*85(3):522-534
102. SOUSA N., M.D. MADEIRA, M.M. PAULA-BARBOSA (1998) Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study. *Brain Res.*794:199-210
103. SOUSA N., M.D. MADEIRA, M.M. PAULA-BARBOSA (1999) Corticosterone replacement restores normal morphological features to the hippocampal dendrites, axons and synapses of adrenalectomized rats. *J.Neurocytol.*28:541-558
104. STARKMAN M.N., S.S. GEBARSKI, S.BERENT, D.E. SCHTEINGART (1992) Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing’s syndrome. *Biol.Psychiatry* 32:756-765
105. STEIN M.B., R. YEHUDA, C. KOVEROLA, C. HANNA (1997) Enhanced dexamethasone suppression of plasma cortisol in adult women traumatized by childhood sexual abuse. *Biol.Psychiatry* 42:680-686
106. STUHLIK A., L. REZACOVA, K. VALES, V. BUBENIKOVA, S. KUBIK (2004) Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neurosci.Lett.*366:162–166
107. SWAAB D.F., A.M. BAO, P.J. LUCASSEN (2005) The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res.Rev.*4(2):141-194
108. TANG A.C. (2003) A hippocampal theory of cerebral lateralization. In: *The Asymmetrical Brain*, Bradford Book, Cambridge Mass.:37-69
109. TANG A.C., Z. BENDE, B.C. REEB, J.A. CONNOR (2008) An epigenetic induction of a right-shift in hippocampal asymmetry: selectivity for short- and long-term potentiation but not post-tetanic potentiation. *Hippocampus* 18:5-10
110. TATA D.A., V.A. MARCIANO, B.J. ANDERSON (2006) Synapse loss from chronically elevated glucocorticoids: relationship to neuropil volume and cell number in hippocampal area CA3. *J.comp.Neurol.*498(3):363–74
111. TENK C.M, M. KAVALIERS, K.P. OSSENKOPP (2006) The effects of acute corticosterone on lithium chloride-induced conditioned place aversion and locomotor activity in rats. *Life Sci.*79(11):1069–1080

112. TESSNER K.D., E.F. WALKER, S.H. DHURUV, K. HOCHMAN, S. HAMANN (2007) The relation of cortisol levels with hippocampus volumes under baseline and challenge conditions. *Brain Res.*1179:70-78
113. THOMPSON B.L., K. ERICKSON, J. SCHULKIN, J.B. ROSEN (2004) Corticosterone facilitates retention of contextually conditioned fear and increases CRH mRNA expression in the amygdala. *Behav.Brain Res.*2(2):209-215
114. TOHEI A., Y. MOGI, H. KON, R. HOKAO, M. SHINODA (2003) Strain difference in pituitary-adrenal axis between Wistar-Imamichi and Long Evans adult male rats. *Exp.Anim.*52(5):437-439
115. TUVNES F.A., H.A. STEFFENACH, R. MURISON, M.B. MOSER, E.L. MOSERI (2003) Selective hippocampal lesions do not increase adrenocortical activity. *J.Neurosci.*23(10):4345-4354
116. VELDHUIS H.D., D. DEWIED (1984) Differential behavioral actions of corticotropin-releasing factor (CRF). *Pharmacol.Biochem.Behav.*21(5):707-13
117. VERSTYNEN T., R. TIERNEY, T. URBANSKI, A. TANG (2001) Neonatal novelty exposure modulates hippocampal volumetric asymmetry in the rat. *Neuroreport* 12:3019-3022
118. VRIES W.B., F.R. LEIJ, J.M. BAKKER, P.J. KAMPHUIS, M.F. OOSTERHOUT, M.E. SCHIPPER, G.B. SMID, B. BARTELDIS, F. BEL (2002) Alterations in adult rat heart after neonatal dexamethasone therapy. *Pediatr.Res.*52(6):900-906
119. VYSKOČIL (2005) c.o.
120. WATANABE Y, GOULD E, MCEWEN BS (1992) Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.*588(2):341-345
121. WAYNFORTH H.B., P.A. FLECKNELL (1984) Experimental and surgical technique in the rat. *Acad.Press, London*
122. WESIERSKA M., C. DOCKERY, A.A. FENTON (2005) Beyond memory, navigation, and inhibition: Behavioral evidence for hippocampus- dependent cognitive coordination in the rat. *J.Neurosci.*25:2413-2419
123. WEST M.J., L. SLOMIANKA, H.J. GUNDERSEN (1991) Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231:482-497
124. WITTNER M., P. ŘÍHA (2005) Transient Hypobaric Hypoxia Improves Spatial Orientation in Young Rats. *Physiol.Res.*54:335-340
125. WOOLLEY CS, E. GOULD, B.S. MCEWEN (1990) Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res.*531(1-2):225-231
126. YEHUDA R., B. KAHANA, K. BINDER-BRYNES, S.M. SOUTHWICK, J.W. MASON, E.L. GILLER (1995) Low urinary cortisol excretion in Holocaust survivors with posttraumatic stress disorder. *Am.J.Psychiatry* 152:982-986
127. ZACH P., JANA MRZILKOVA, A. STUHLIK, K. VALES, LENKA REZACOVA (2011) Delayed effect of chronic administration of corticoids on the taste aversion learning. *Neuroendocrinol.Lett.*32(1):90-95
128. ZOHAR J., H. YAHALOM, N. KOZLOVSKY, S. CWIKEL-HAMZANY, M. A. MATAR, Z. KAPLAN, R. YEHUDA, H. COHEN (2011) High dose hydrocortisone immediately after trauma may alter the trajectory of PTSD: Interplay between clinical and animal studies. *Europ.Neuropsychopharmacol.*21(11):796-809

PŘÍLOHY

Seznam příloh

Příloha 1:

REZACOVA L., J. SVOBODA, A. STUHLIK, K. VALES (2011)

Differential effects of stable elevated levels of corticotropin-releasing hormone and systemic corticosterone on various types of rat learning. *Neuroendocrinol.Lett.*32(2):101-113

Příloha 2:

ZACH P., J. MRZÍLKOVÁ, L. ŘEZÁČOVÁ, A. STUHLÍK, K. VALEŠ

(2010) Delayed Effects of Elevated Corticosterone Level on Volume of Hippocampal Formation in Laboratory Rat. *Physiol.Res.*59:985-996

Příloha 3:

ZACH P., J. MRZILKOVA, A. STUHLIK, K. VALES, L. REZACOVA

(2011) Delayed effect of chronic administration of corticoids on the taste aversion learning. *Neuroendocrinol.Lett.*32(1):90-95