

**Univerzita Karlova v Praze**

**Filozofická fakulta**

Katedra psychologie

# **Bakalářská práce**

RNDr. MUDr. Monika Červinková, Ph.D.

**Mechanismy uplatňující se při vzniku neurodegenerativních onemocnění a jejich odezva v neurobiologických interakcích**

Mechanisms involved in neurodegenerative disorders origin and their consequences in neurobiological interactions

### **Poděkování:**

Děkuji svému školiteli Doc. PhDr. Petru Kulišťákovi, PhD. za vedení mé bakalářské práce a za jeho cenné rady a připomínky. Dále děkuji všem spolupracovníkům a kolegům, kteří byli vždy ochotni přispět cennou radou a pomocí. Mé poděkování patří také PhDr. Jiřině Jelínkové z Psychiatrické nemocnice Kosmonosy, která mi přispěla cennými radami při volbě testů pro návrh experimentální části práce. V neposlední řadě chci samozřejmě poděkovat svým rodičům a přátelům za vytvoření zázemí pro vznik této práce.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

V Praze, dne 3. května 2015

.....  
RNDr. MUDr. Monika Červinková, Ph.D.

## **Abstrakt (česky)**

*Nerodegenerativní onemocnění představují dnes pro stále stoupající trend závažným problémem nejen medicínským, ale i socioekonomickým. K nejčastěji se vyskytujícím onemocněním v lidské populaci patří Alzheimerova nemoc, Parkinsonova nemoc, Huntingtonova choroba a Amyotrofická laterální skleróza. Etiopatogenetické mechanismy pro vznik onemocnění nejsou dosud detailně objasněny. Je uváděna možná souvislost mezi neurodegenerativními onemocněními a stresem. Předpokládaný vztah mezi neurodegenerativními chorobami a stresem je založen na poznatcích o vzájemné provázanosti funkcí nervového, endokrinního a imunitního systému. Pro výzkum v této oblasti jsou velmi užitečné zvířecí modely, které mohou přispět k objasnění účastnících se biologických mechanismů. Znalost těchto procesů by mohla v budoucnu umožnit rozvoj nových diagnostických a terapeutických přístupů.*

## **Abstract (in English):**

*Neurodegenerative disorders represent due to their still increasing trend serious problem not only medical, but also socio-economic. The most common disorders in human population include Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and Amyotrophic lateral sclerosis. Underlying etiopathogenetical mechanisms are not closely clarified yet. Potential conjunction between neurodegenerative disorders and stress is mentioned. Supposed relationship between neurodegenerative disorders and stress is based on knowledge of functional interrelationships among nervous, endocrine and immune systems. Animal models are very helpful for research in objective field and they can contribute to the elucidation of involved biological mechanisms. Knowledge of these processes could enable development of new diagnostic and therapeutic approaches in future.*

**Klíčová slova (česky)**

*Neurodegenerace, stres, mechanismy, neurobiologické interakce, zvířecí modely*

**Key words (english):**

*Neurodegeneration, stress, mechanisms, neurobiological interactions, animal models*

# Obsah

1 Úvod .....	6
2 Literární přehled.....	7
2.1 Neurodegenerativní onemocnění .....	7
2.1.1 Neurodegenerativní onemocnění jako samostatné klinické jednotky .....	8
2.1.1.1 Alzheimerova nemoc .....	8
2.1.1.2 Parkinsonova nemoc .....	11
2.1.1.3 Huntingtonova choroba .....	13
2.1.1.4 Amyotrofická laterální skleróza .....	15
2.1.2 Neurodegenerace jako součást komplexního postižení .....	16
2.1.2.1 Louis Barr syndrom ( <i>Ataxia teleangiectasia</i> ).....	16
2.1.2.2 Lurcher mutanta myši.....	18
2.1.2.3 Indukce olivopontocerebelární degenerace selektivním neurotoxinem .....	19
2.2 Stres a vliv stresu na organismus .....	19
2.3 Používané protokoly a hodnocení stresu v preklinických studiích.....	21
2.3.1 Protokoly používané k indukci stresu .....	22
2.3.2 Hodnocení stresu v preklinických studiích .....	24
2.4 Stres a neurodegenerativní onemocnění .....	28
2.4.1 Vliv stresu u jednotlivých neurodegenerativních onemocnění.....	28
2.4.2 Vliv stresu u modelu <i>Lurcher</i> myši .....	29
2.4.3 Mechanizmy vysvětlující souvislost neurodegenerativních onemocnění a stresu a z toho vyplývající potenciální nové terapeutické intervence .....	30
3 Návrh výzkumného projektu .....	33
3.1 Návrh studií u lidské populace.....	33
3.1.1 Návrh průřezové studie u probandů s již diagnostikovaným neurodegenerativním onemocněním .....	33
3.1.2 Návrh prospektivní studie ke zjištění predispozice k neurodegenerativnímu onemocnění u rizikových skupin.....	35
3.1.3 Předpokládané limity navržených studií.....	36
3.2 Návrh experimentu využívajícího zvířecí modely .....	37
3.2.1 Experimentální design .....	37
3.2.2 Předpokládané limity navrženého experimentu.....	39
4 Závěr .....	41
5 Seznam použité literatury .....	42
6 Seznam použitých zkratk.....	49

# 1 Úvod

Téma neurodegenerativních onemocnění jsem si pro zpracování své bakalářské práce vybrala proto, že se jedná o aktuální problém. Etiopatogenetické faktory uplatňující se při vzniku těchto onemocnění dosud nejsou plně objasněny. Stejně tak je tomu i stran případných diagnostických markerů, kde též stále neexistují biomarkery specifické pro jednotlivá onemocnění. Vzhledem k výše zmíněnému jsou pochopitelně velmi omezené i terapeutické možnosti. Konkrétně se soustředím především na patogenetické mechanismy uplatňující se při vzniku neurodegenerativních onemocnění, a to zejména na jejich odezvu v neurobiologických interakcích. Především se v tomto směru chci věnovat vlivu stresu u neurodegenerativních onemocnění.

V úvodní části práce se budu zabývat charakteristikou jednotlivých klinických jednotek. Vzhledem k tomu, že zmíněnou problematiku nelze v celé šíři studovat u člověka, nabízí se možnost využití zvířecích modelů. Z tohoto důvodu práce zahrnuje také přehled zvířecích modelů užívaných pro experimenty v oblasti neurodegenerativních onemocnění a v experimentální části se pokusím navrhnout i experimenty využívající tyto modely. Je třeba předem upozornit, že žádný ze zmíněných modelů nerekapituluje zcela behaviorální a patologické změny u lidského onemocnění. Přesto jsou však zvířecí modely velmi cenné jak pro studium etiopatogeneze neurodegenerativních onemocnění, tak pro výzkum v oblasti terapeutických přístupů.

Další část práce je věnována vlivu stresu na organismus obecně. Jsou zde zmíněny uplatňující se mechanismy a zpětnovazebné regulace. V návaznosti na tuto obecnou problematiku uvádím vliv stresu konkrétně u neurodegenerativních onemocnění. Vzhledem k výše zmíněnému využití zvířecích modelů, je dále zařazena kapitola zabývající se modelováním a hodnocením stresu v preklinických studiích. Tyto teoretické poznatky jsou dále využity i v experimentální části. V experimentální části se snažím navrhnout projekt tak, aby zahrnoval jak srovnání vlivu stresu u zdravých a postižených jedinců, tak metody, kterými by bylo potenciálně možno časně detekovat nástup onemocnění u rizikových pacientů (např. pozitivní rodinná anamnéza). Jak již bylo zmíněno, budou zde zahrnuty i experimenty na zvířecích modelech, které umožňují i hodnocení morfologických změn nejen v CNS, ale i dalších orgánech neuro-endokrino-imunitního regulačního systému.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Neurodegenerativní onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění jsou choroby postihující CNS charakteristické progresivním zánikem neuronů, reaktivním zmnožením glie a ukládáním proteinových depozit v postižených buňkách či jejich bezprostředním okolí. Jsou variabilní skupinou ve svých klinických příznacích, ty jsou různorodé v závislosti na postižené struktuře CNS. Nejčastějším základním patogenetickým mechanismem vedoucím ke vzniku choroby je změna sekundární struktury (konformace) konkrétního proteinu. Dochází k nárůstu výskytu proteinu v tzv.  $\beta$ -konformaci ( $\beta$ -sheet). Protein v této formě postižená buňka nedokáže zpracovat, hromadí se uvnitř buňky či jejím okolí, kde může působit toxicky či indukovat apoptózu. Současně dochází k nedostatku funkčního proteinu (Frost, Hemberg, Lewis, & Feany, 2014; McGonigle, 2014; Ribeiro, Camargos, Souza, & Teixeira, 2013). V následující podkapitole budou probrána neurodegenerativní onemocnění, která se nejčastěji vyskytují v lidské populaci. Konkrétní patogenetické mechanismy budou zmiňovány v rámci podkapitol věnovaných jednotlivým onemocněním. Pro snadnou orientaci a souvislost uvádím u každé klinické jednotky v návaznosti též používané zvířecí modely. Ačkoli jsou pro modelování v oblasti neurodegenerativních onemocnění využívána různá zvířata napříč živočišnou říší včetně např. hmyzu (octomilka) či hlístů (hád'átko), v následujícím popisu se budu věnovat pouze běžně využívaným modelům savcům. Tyto modely, na rozdíl od výše zmíněných, umožňují testování motorických a kognitivních funkcí a hodnocení behaviorálních projevů (Ribeiro et al., 2013).

Přehled neurodegenerativních onemocnění a odpovídajících zvířecích modelů je věnován především „klasickým“ neurodegenerativním onemocněním, která jsou samostatnými klinickými jednotkami. Jsou probrána nejčastěji se vyskytující neurodegenerativní onemocnění. Pro omezený rozsah práce uvádím pouze ta onemocnění, která jsou v lidské populaci relativně častá, a existuje dostatečný počet prací zabývajících se touto tematikou. U méně častých chorob obvykle není k dispozici dostatečný počet literárních zdrojů, ze kterých by bylo možno usuzovat na obecně platné mechanismy. Práce týkající se těchto chorob jsou často publikovány jako kazuistiky. Obvykle též nejsou k dispozici zvířecí modely, které by umožňovaly podrobnější výzkum těchto vzácných onemocnění. Je třeba také zmínit, že existuje celá řada neurodegenerativních onemocnění,



která se vyskytují v rámci komplexního postižení jako součást různých syndromů. Této skupině onemocnění se vzhledem k její šíři a značné heterogenitě přehledně věnovat nebudu. Zmíním pouze model, se kterým mám vlastní zkušenosti, a na něm též demonstruji možnosti různých druhů modelování a jejich srovnání, dále ukáži paralely s lidským onemocněním na základě dostupných literárních poznatků a předchozího vlastního výzkumu.

Obecně lze zvířecí modely rozdělit na geneticky modifikované a indukované (farmakologicky, toxicky). Geneticky modifikované modely jsou dnes založeny především na využívání transgenních technologií. Pro některá onemocnění existují též modely na bázi elektrolyticky nebo chemicky způsobených lézí v konkrétní oblasti CNS (McGonigle, 2014).

## **2.1.1 Neurodegenerativní onemocnění jako samostatné klinické jednotky**

### **2.1.1.1 Alzheimerova nemoc**

Alzheimerova nemoc (AN) je dnes považována za nejčastější příčinu demence vyššího věku. Společně se stárnutím populace a stoupající prevalencí představuje významný socioekonomický problém. Onemocnění je charakterizováno progresivní kognitivní deteriorací a kortikální atrofií. Konkrétní etiopatogenetické procesy nejsou dosud objasněny. Kromě genetické predispozice je jako možný etiologický faktor uváděno difuzní poranění mozku (Bissette, 2009; Smith et al., 1999)

AN je obvykle řazena samostatně, ale vzhledem k přítomnosti tau proteinu, je možné ji v širším slova smyslu vnímat v souvislosti se skupinou tzv. tauopatií, kam dále patří Progresivní supranukleární obrna (Steele-Richardson-Olszewsky), Kortikobazální degenerace, Pickova nemoc – frontotemporální atrofie (Pickova tělíska intracelulárně), Demence s argyrofilními zrny, což jsou vzácná onemocnění spojená s mutací tau proteinu, jehož s tubulinem asociovaná jednotka zpevňuje strukturu mikrotubulů. Hyperfosforylovaná forma tau proteinu je nefunkční a agreguje v podobě amyloidu. O těchto chorobách se z výše zmíněných důvodů dále podrobněji zmiňovat nebudu (Ejaz Ahmed et al., 2013; Frost et al., 2014; McGonigle, 2014).

Charakteristickými histopatologickými změnami jsou extracelulární depozita  $\beta$ -amyloidu (amyloidní plaky) pocházející z fragmentovaného membránového APP (Amyloid Precursor Protein) a dále přítomností intracelulárních agregátů tvořených nerozpustným hyperfosforylovaným tau proteinem (neurofibrilární klubka – neurofibrillary tangles), který je asociován s mikrotubuly (Frost et al., 2014; Hall & Roberson, 2012). APP může být degradován dvěma způsoby. Za fyziologických okolností vznikají působením  $\alpha$ -sekretázy amyloidogenní fragmenty o délce 40 aminokyselin, za patologického stavu však převládá degradace  $\beta$ -sekretázou (BACE) a  $\gamma$ -sekretázou, která vede ke vzniku nerozpustných delších fragmentů o délce 42 aminokyselin. Tyto fragmenty jsou pak ukládány ve formě  $\beta$ -amyloidových plak. Popsané změny následně indukují apoptózu cholinergních neuronů a stimulují proliferaci glie (McGonigle, 2014; Ribeiro et al., 2013).

### **Geneticky modifikované modely Alzheimerovy choroby**

Vývoj transgenních modelů Alzheimerovy choroby vychází především z mutací genů pro APP, presenilin-1 (PSEN1), presenilin-2 (PSEN2) a tau protein podmiňujících vzácné familiární formy Alzheimerovy choroby (Hall & Roberson, 2012). Stejně, jako u většiny ostatních chorob, se nejvíce využívají myší modely. Jejich výhodou je krátká doba života s možností brzkého vývoje fenotypu, velká reprodukční kapacita a nízké ekonomické náklady na chov. Na druhé straně jsou u tohoto modelu limity v důsledku velikosti experimentálního zvířete (zobrazovací metody, možnost chirurgické intervence apod.) a omezená možnost testování kognitivních funkcí a behaviorálních projevů.

Vůbec první transgenní model, PDAPP myš, byla vytvořena v polovině devadesátých let na základě znalosti mutace v *APP* genu podmiňující vzácnou presenilní autosomálně dominantní formu nemoci. V mozku této myši byly nalezeny typické amyloidové plaky, nicméně nebyla detekována intracelulární klubka tau proteinu ani výrazný úbytek neuronů typický pro klasickou formu AN (Harvey, Richie, Hoffer, & Airavaara, 2011). Postupně byly vyvinuty další transgenní myši s jednou či více mutacemi v genu pro APP na základě dat genetických analýz rodin s familiárními formami onemocnění. Některé z těchto myši vykazují kognitivní deficit i úbytek neuronů, nicméně žádná nespĺňuje všechna kritéria AN včetně výskytu neurofibrilárních klubek tau proteinu,

kteřá jsou, jak se zdá, pro patogenezi nemoci stejně klíčová jako výskyt  $\beta$ -amyloidových plak (Hall & Roberson, 2012; Harvey et al., 2011).

Další skupinu transgenních myši tvoří linie s jednou či více mutacemi v genu pro PSEN1 a PSEN2. Tyto proteiny tvoří komponenty degradačního komplexu  $\gamma$ -sekretázy a mutace v genu *PSEN1* tvoří podklad pro většinu familiárních forem AN. Transgenní linie nesoucí mutace pouze v těchto genech (např. PS1 linie) sice vykazují vyšší tvorbu delší formy  $\beta$ -amyloidu, nicméně nevyskytuje se u nich žádná klinická symptomatologie. Dalším krokem bylo proto křížení APP transgenů s těmito liniemi. Vzniklé modely (PSAPP, 5XFAD) již vykazují jak patologii související s  $\beta$ -amyloidem, tak kognitivní deficit a úbytek neuronů (Epis et al., 2010; McGonigle, 2014; Neha, Sodhi, Jaggi, & Singh, 2014). U žádné z těchto linií však nebyly nalezeny agregáty tau proteinu, proto byly tyto myši dále kříženy s liniemi obsahujícími jednu či více mutací v genu pro tau protein, aby bylo dosaženo pokud možno kompletního histopatologického a klinického obrazu shodného s člověkem. Asi nejvíce používaným modelem z této skupiny je trojitě transgenní myš 3xTg-AD, která kombinuje dvojitou mutaci v APP s mutací v *Tau* a *PSEN1* genu (Oddo, Caccamo, Kitazawa, Tseng, & LaFerla, 2003).

Dalšími, již méně využívanými modelovými zvířaty, jsou laboratorní potkani. Transgenní modely laboratorních potkanů jsou méně rozšířené, protože nejsou ještě dokonale propracované transgenní techniky pro tato zvířata. V budoucnu se však dá předpokládat rozvoj v této oblasti, protože výhodou tohoto modelu je fakt, že laboratorní potkan je dosud nejlépe „funkčně“ charakterizovaným modelovým zvířetem. Převážná většina potkaních modelů nese mutaci v genu pro APP (Bugos, Bhide, & Zilka, 2009; Leon et al., 2010). Existují také modely s mutovaným *PSEN1*. Transgenní potkaní modely však vykazují poměrně velkou heterogenitu (Do Carmo & Cuello, 2013).

Výše zmíněné modely postihují autozomálně dominantní (AD) formy onemocnění, které jsou však málo časté. Častěji se vyskytují sporadické formy AN s pozdním nástupem. Z tohoto důvodu jsou snahy také o modelování této situace. Za nejsilnější rizikový faktor pro vznik AN je považován gen *APOE* kódující apolipoprotein E (apoE). Jako riziková se jeví alela  $\epsilon$ 4, kódující apoE4, který se liší od častější formy apoE3 pouze záměnou jedné aminokyseliny na pozici 112. Nejslibnější variantou z této skupiny modelů se zdají být apoE knock-in myši (Hall & Roberson, 2012).

### ***Indukované modely Alzheimerovy choroby***

Intracerebrální podání  $\beta$ -amyloidu bylo používáno pro modelování AN ještě před vývojem první linie APP myši. Tento způsob indukce je využíván u laboratorních potkanů. Metoda umožňuje velice rychlé získání požadovaného fenotypu v řádu týdnů, nicméně takovýto model neumožňuje sledovat progresi nemoci z hlediska stárnutí. Z tohoto důvodu jsou nyní jednoznačně více využívané transgenní modely (Frautschy, Yang, Calderon, & Cole, 1996). Dalšími substancemi používanými k indukci kognitivního deficitu u laboratorních zvířat jsou kolchicin, těžké kovy a neurotoxiny. Jsou aplikovány pro modelování sporadických forem AN (Neha et al., 2014).

Z indukovaných potkaních modelů též stojí za zmínku intracerebroventrikulární aplikace streptozocinu v subdiabetogenní dávce (streptozocin je běžně používán k modelování diabetu). Následkem jeho podání dojde k poruše glukozového a energetického metabolismu v mozku a oxidativnímu poškození, které vede ke kognitivní dysfunkci následkem inhibice syntézy adenosintrifosfátu (ATP) a acetyl-koenzymu A (Ejaz Ahmed et al., 2013).

#### ***2.1.1.2 Parkinsonova nemoc***

Parkinsonova nemoc (PN) je v populaci nejčastěji se vyskytujícím onemocněním ze skupiny tzv. synukleopatií, jejichž společným patogenetickým podkladem je přítomnost patologické formy  $\alpha$ -synukleinu. Do této skupiny dále patří Demence s Lewyho tělísky a Mnohotná systémová atofie, které dále podrobněji probírat nebudu (Blandini, 2013).

Jde o progresivní onemocnění s řadou neurologických deficitů různého funkčního stupně převážně v oblasti motoriky, ale také v jiných „nemotorických“ oblastech jako je např. gastrointestinální dysfunkce či olfaktorický deficit, které jsou popisovány v časných stádiích onemocnění. Charakteristickými symptomy rozvinuté choroby jsou klidový tremor, rigidita, akineze nebo bradykineze a posturální instabilita. Celkový obraz je variabilní a je uváděna celá řada dalších příznaků (Harvey et al., 2011; Jankovic, 2008).

Histopatologicky je patrný úbytek dopaminergních neuronů v pars compacta substantiae nigrae. Jak již bylo zmíněno, podkladem je patologická forma  $\alpha$ -synukleinu, který spolu s ubiquitinem vytváří tzv. Lewyho tělíska intracelulárně a indukuje apoptózu. Ačkoli je  $\alpha$ -synuklein běžně přítomen v CNS, jeho úloha za nepatologických podmínek není zcela zřejmá (Blandini, 2013).

### ***Geneticky modifikované modely Parkinsonovy nemoci***

Stejně jako při vytváření modelů Alzheimerovy nemoci i u Parkinsonovy nemoci vycházejí transgenní linie ze znalostí kauzálních mutací u vzácných familiárních forem onemocnění, které tvoří asi 5-10% případů. Jedná se o mutace v genech pro  $\alpha$ -synuklein (SNCA), leucine-rich repeat serin/threonine kinase 2 (LRRK2), Parkin, PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), UCH-L1 a DJ-1 (Blandini & Armentero, 2012; Blesa, Phani, Jackson-Lewis, & Przedborski, 2012; Jackson-Lewis, Blesa, & Przedborski, 2012). Jako modelová zvířata jsou používány myši a laboratorní potkani. Mutace v *SNCA* genu byly objeveny jako vůbec první u AD familiární formy PN. Dosud bylo vytvořeno několik transgenních myších linií s mutací v tomto genu. Tyto linie sice nevykazují typický zánik dopaminergních neuronů v substantia nigra, u některých však byly prokázány nukleární inkluze  $\alpha$ -synukleinu a snížená hladina dopaminu ve striatu spolu s typickou motorickou manifestací, včetně responsivity k dopaminu (Blandini & Armentero, 2012; Blesa et al., 2012; McGonigle, 2014). Další transgenní myší linie byly vytvořeny mutacemi v ostatních genech podmiňujících familiární formy PN. Nevykazují symptomy typické pro člověka, snad s výjimkou LRRK2 transgenní myši, u které jsou popisovány behaviorální změny ve smyslu zvýšené thigmotaxe v open-field testu (Bezard, Yue, Kirik, & Spillantini, 2013; Gama Sosa, De Gasperi, & Elder, 2012).

### ***Toxicky indukované modely Parkinsonovy nemoci***

Toxicky indukované modely jsou pro PN využívány více než modely transgenní. Na rozdíl od nich poskytují celé spektrum charakteristických symptomů. MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) je široce používán k modelování PN zejména u primátů a jiných vyšších savců, ale je možné použití i u myši a řady dalších zvířat (Bezard

et al., 2013; Blandini & Armentero, 2012). MPTP indukuje prakticky kompletní klinický obraz nemoci, v histologickém obrazu však chybí intracelulární depozita  $\alpha$ -synukleinu (Blesa et al., 2012; Crabtree & Zhang, 2012).

Další skupinou látek používaných pro indukci PN jsou pesticidy a herbicidy. Často zmiňovaný je rotenon, flavonoid užívaný jako širokospektrý pesticid (Blandini & Armentero, 2012). Na rozdíl od MPTP je kromě zánětlivé reakce a behaviorálních změn přítomná i formace inkluzí podobných Lewyho tělískům (Ribeiro et al., 2013). Tvorba  $\alpha$ -synukleinových inkluzí je prokázána i po podání herbicidu paraquat, který se však dnes již k modelování PN příliš nevyužívá (Blandini & Armentero, 2012; Blesa et al., 2012).

Zatímco výše zmíněné látky jsou podávány systémově, prototypem lokální aplikace je 6-hydroxydopamin. Po podání dochází k odumírání dopaminergních neuronů substantia nigra již za 12 hodin. Obvykle se aplikuje unilaterálně. Stejně jako ostatní používané toxiny, 6-hydroxydopamin způsobuje poškození buněk oxidativním stresem jednak v důsledku autooxidace za vzniku peroxidu vodíku, jednak akumulací v mitochondriích, kde opět inhibuje komplex I (Bezard et al., 2013; Blandini & Armentero, 2012).

### **2.1.1.3 Huntingtonova choroba**

Huntingtonova choroba (HCH) je onemocnění řazené spolu se Spinocerebelární ataxií, která podrobněji probírána nebude do tzv. tripletových chorob. Jejich podkladem je přítomnost patologického proteinu, který je produktem mutovaného genu, ve kterém dochází k expanzi trinukleotidových repetit. HCH je fatální AD dědičné neurodegenerativní onemocnění způsobené expanzí (>36) CAG tripletu v genu pro huntingtin (4p16.3) Mutovaný protein agreguje v neuronech striata, s postupem nemoci i v dalších oblastech (cortex, thalamus, hypothalamus a pars compacta substantiae nigrae). Výrazná kortikální atrofie je též významným rysem HCH (Harvey et al., 2011).

Mechanismy, kterými mutovaný huntingtin způsobuje buněčnou smrt, nejsou stále objasněny. Klinicky je onemocnění charakteristické choreatickými mimovolnými pohyby, nejružnějším spektrem psychiatrických symptomů a kognitivní deteriorací s postupným upoutáním na lůžko (Ramaswamy, McBride, & Kordower, 2007; Zuccato, Valenza, & Cattaneo, 2010).

## **Geneticky modifikované modely Huntingtonovy choroby**

Prvním a nejpoužívanějším modelem je R 6/2 myš obsahující N-terminální část mutovaného huntingtinu. Tato linie je velmi dobře prostudovaná a vykazuje velmi brzy výrazný patologický fenotyp s nástupem motorických a behaviorálních abnormalit již okolo 5. týdne věku. Knock-in myší linie, např. HdhQ111, nevykazují tak výrazné fenotypické změny a dosahují na rozdíl od R 6/2 normální délky života. Dalším široce využívaným modelem je myš YAC128 s celým implementovaným lidským huntingtin genem na arteficiálním chromozómu. I tuto linii charakterizují mírnější fenotypové změny a standardní délka života (McGonigle, 2014; Ribeiro et al., 2013).

Myší modely představují důležitý nástroj pro zkoumání a pochopení molekulárních mechanismů Huntingtonovy choroby. Pro plnohodnotné modelování lidského onemocnění však mají určitá omezení. Z tohoto důvodu byly vytvořeny modely velkých zvířat, tj. transgenní ovce a primáti, u kterých se používá dobře vytvořený systém skórování motorických funkcí (Huntington's disease primate rating scale, HDPMRS) i kognitivní testování (Gama Sosa et al., 2012; Jacobsen et al., 2010; S. H. Yang et al., 2008).

Prasata a zejména miniprasata jsou používána jako hlavní „velké“ zvířecí modely pro studium lidských chorob díky mnohým anatomickým, fyziologickým a metabolickým podobnostem. Pro jejich sofistikované kognitivní a motorické schopnosti jsou vhodné pro dlouhodobé studie učení, paměti a chování. Vzhledem k délce jejich života také umožňují pozorování progresu choroby. Díky velikosti a struktuře mozku je možné u prasete použít neurochirurgické procedury a neinvazivní zobrazovací metody podobné používaným v humánní klinické diagnostice (Lunney, 2007).

Tvorba transgenního prasete technikou klonování nebyla úspěšná, protože docházelo k vysoké perinatální úmrtnosti (D. Yang et al., 2010). Použití strategie založené na použití lentivirového vektoru vedlo k úspěšnému vytvoření transgenního miniprasete (Baxa et al., 2013). Tento model byl vytvořen a je nadále používán v České Republice (Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Liběchov).

Model poskytuje možnosti studia nejširšího rozsahu aspektů HCH, jako je charakterizace molekulárních mechanismů choroby na primárních buňkách izolovaných z transgenních a „wild type“ prasat, biochemické studie, sledování různých biomarkerů choroby, studium struktury mozku a jiných orgánů post mortem. Umožňuje též použití

vysokorozlišovacích zobrazovacích technik a testování motorických či kognitivně-behaviorálních funkcí. Toto transgenní miniprase reprezentuje dosud nejoptimálnější model pro studium preklinických příznaků choroby, dlouhodobé neinvazivní studie a hlavně poskytuje možnost testování nových léčiv cílených proti HCH (Baxa et al., 2013).

### ***Excitotoxické modely Huntigtonovy choroby***

Ještě před identifikací kauzálního genu v roce 1993 bylo k modelování choroby používáno lokálního excitotoxického působení chinolinové a kainové kyseliny. Jako modelová zvířata jsou používání především hlodavci a primáti. Lokální aplikace chinolinové kyseliny do striata vedla u primátů ke srovnatelným motorickým a kognitivním změnám pozorovaným u člověka. Bilaterální striatální léze u primátů měla kromě motorických dysfunkcí za následek poruchu vizuospeciálních funkcí, procedurální paměti a vybavování (McGonigle, 2014; Ramaswamy et al., 2007).

#### ***2.1.1.4 Amyotrofická laterální skleróza***

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je neurodegenerativní onemocnění, resp. v tomto případě spíše skupinou relativně heterogenních syndromů, u kterých dochází k progresivnímu úbytku motoneuronů v mozku (mozkové kůře a mozkovém kmeni) a míše. Buněčné smrti motoneuronu předchází progresivní distální axonopatie. Ztráta motoneuronů vede ke svalové slabosti a atrofii progredující do kompletní paralýzy. Smrt nastává obvykle do 2-5 let od propuknutí choroby. I u tohoto neurodegenerativního onemocnění existují familiární a sporadické formy. Většina případů je sporadických. U 5-10% případů je jako příčina uváděna mutace v genu pro superoxid dismutázu 1 (*SOD1*), která vytváří excesivní množství volných radikálů (Chieppa et al., 2014; Harvey et al., 2011; Venkova et al., 2014).

### ***Geneticky modifikované modely Amyotrofické laterální sklerózy***

Vzhledem k patogenezi onemocnění (selektivní postižení motoneuronů) jsou pro ALS používány výhradně geneticky modifikované modely. Jsou převážně založeny na



mutaci v genu pro superoxid dismutázu (*SOD1*; *ALSI*). Byly vytvořeny modely myši, potkaní a existuje i prase transgenní pro *SOD1*. Ačkoli hlodavčí modely rekapituluji degeneraci motoneuronů, není zde dokonalá shoda s lidskou patologií, protože ALS u lidí není jednotnou entitou, ale jde o poměrně heterogenní syndromy (Chieppa et al., 2014; Harvey et al., 2011; Kato, 2008; Mead et al., 2011). Problematická je též relevantnost anatomických struktur, které jsou odlišné u lidí a hlodavců. Slibným modelem se proto zdá být relativně nedávno vytvořený prasečí model (Chieppa et al., 2014).

Vývoj transgenních modelů pro toto onemocnění není stále ještě příliš pokročilý. Kromě zmíněných transgenních modelů pro *SOD1* byly vytvořeny též knock-out modely pro alsin (*ALS2*). Tyto linie však nevykazovaly žádnou viditelnou patologii ve smyslu neurodegenerace. Je zmiňováno ještě několik dalších genů, pro něž ale dodnes převážně neexistují savčí modely, ačkoli jsou již první výsledky např. u hmyzu nebo ryb (Harvey et al., 2011; Kato, 2008).

### **2.1.2 Neurodegenerace jako součást komplexního postižení**

Ze skupiny neurodegenerativních onemocnění vyskytujících se v rámci komplexnějšího postižení, bych zmínila syndrom Louis-Barr (Ataxia teleangiectasia), kterému se budu podrobněji věnovat. Charakterizuji tento humánní syndrom. Dále popíšu podobné postižení u zvířecího modelu (*Lurcher* mutanta myši), se kterým mám zkušenosti z předchozího výzkumu. Mezi těmito dvěma postiženími lze nalézt řadu paralel. Tento model byl v našich experimentech používán pro studium zapojení hypothalamo-pituitárně-adrenální (HPA) osy v etiopatogenezi choroby (Cervinkova, Mandakova, & Sima, 2006). Na závěr ukáži možnost modelování obdobného neurologického deficitu, jaký je popisován u *Lurcher* mutanty myši, užitím selektivního neurotoxinu 3-acetylpyridinu (3-AP).

#### **2.1.2.1 Louis Barr syndrom (Ataxia teleangiectasia)**

Ataxia teleangiectasia je multisystémové postižení. Jedná se o chorobu s autozomálně recesivním (AR) typem dědičnosti. Neexistuje jednotná teorie, která by

vysvětlovala multisystémové poruchy. Uvádí se, že se jde o defekt ve vývoji mezodermy. K dalším odchylkám, které by mohly vysvětlit multisystémové postižení, patří abnormality kolagenu (kolagen deficitní na hydroxylyzin), zvýšené hladiny  $\alpha$ 1-fetoproteinu indikující defekt v orgánové maturaci, zvýšená náchylnost buněk k radiačnímu poškození (zvýšená fragilita chromozomů) a poruchy v opravné syntéze DNA. Gen, který zodpovídá za vznik Ataxia teleangiectasia, byl lokalizován v oblasti chromozomu 11q22-23 (Platzer et al., 1997; Stankovic et al., 1997; Stumm et al., 1995; Udar et al., 1999). Jsou popisovány též další chromozomální aberace 14q11-12, q32, 7q32-35 a p13-15 (Kojis, Gatti, & Sparkes, 1991; Udar et al., 1999; Watters et al., 1997). Zajímavostí je, že tyto odchylky strukturálního uspořádání chromozomů jsou právě v místech, která nesou geny kódující receptor pro antigen lymfocytů T (Baxter, Kumar, & Lavin, 1989).

K charakteristickým znakům tohoto postižení patří ataxie, teleangiektázie, opakované sinopulmonální infekce a abnormality v buněčné i protilátkové imunitě. Histopatologickým podkladem choroby je atrofie kůry mozečku se ztrátou Purkyňových a granulárních buněk, atrofie nucleus dentatus a olivy, úbytek neuronů substantia nigra a okulomotorických jader. Dále dochází k míšní atrofii a degenerativním změnám motorických neuronů zadních kořenů míšních a motoneuronů sympatiku (Kuljis, Chen, Lee, Aguila, & Xu, 1999). Tato choroba byla původně považována především za neurologické onemocnění. Nyní je známo, že postihuje také vaskulární, endokrinní a imunitní systém (Bridges & Harnden, 1981).

Z klinických příznaků se nejprve objevuje ataxie, která obvykle propuká mezi 9. a 13. měsícem života. Teleangiektázie se začínou vyskytovat do 2 let věku. Zpravidla se vyvíjejí nejprve na bulbární spojivce a poté na horní části hřbetu nosního, na ušních boltcích nebo v loketních jamkách. S věkem pacienta se objevují další neurologické symptomy, jako choreotaktická dyskineze, pohledová inkoordinace, extrapyramidové příznaky a příznaky zadních provazců míšních. Velmi brzo po narození se již mohou vyskytnout i opakované sinopulmonální infekce. Tito pacienti bývají náchylní k virovým i bakteriálním infekcím. Hlavními příčinami úmrtí bývají těžké infekce a nádory z lymforetikulárních nebo epiteliálních buněk. Z malignit se nejčastěji vyskytují non Hodgkin lymfomy (45%), lymfatické leukémie (24%), karcinomy (žaludku, jater, ovarií atd.) (21%) a Hodgkin lymfomy (10%) (Jackson, 1995; Swift, Reitnauer, Morrell, & Chase, 1987).

### 2.1.2.2 *Lurcher* mutanta myši

Podkladem pro vznik *Lurcher* mutanty je mutace genu pro  $\delta 2$  glutamátový receptor (GRID2) na 6. chromozómu, jejímž důsledkem je apoptóza Purkyňových buněk mozečku a dolní olivy, což má pravděpodobně zároveň za následek tomu odpovídající úbytek granulárních buněk (Caddy & Biscoe, 1975; Norman, Fletcher, & Heintz, 1991; Zuo et al., 1997). Výsledkem je spontánní kongenitální olivopontocerebelární degenerace. Všechny Purkyňovy buňky, 90% granulárních buněk a 60-75% neuronů dolní olivy degeneruje v prvních čtyřech týdnech života. Tyto změny se klinicky projeví neurologickým postižením – ataxií (Doughty, De Jager, Korsmeyer, & Heintz, 2000; Vogel, Sunter, & Herrup, 1989; Wetts & Herrup, 1983).

U tohoto kmene je popisována zvýšená odpovědnost na zánětlivé stimuly, která je doprovázena potencovanou pituitárně-adrenální odpovědí. Též je zmiňována rychlejší a intenzivnější odpověď ACTH a kortikosteronu po vystavení stresu (změna prostředí) (Frederic et al., 1997). Opakované nálezy zvýšených koncentrací IL-1 $\beta$  ve strukturách mozku přispívají k hypotéze, že IL-1 $\beta$  se zde účastní neurodegenerativních procesů (Bluthe, Michaud, Delhaye-Bouchaud, Mariani, & Dantzer, 1997; Vernet-der Garabedian, Lemaigre-Dubreuil, Delhaye-Bouchaud, & Mariani, 1998).

Z humánních klinických syndromů je tomuto modelu nejbližší výše zmíněný syndrom Louis-Barr (Ataxia teleangiectasia). Obdobné nálezy u myšičího *Lurcher* modelu a lidského syndromu Ataxia teleangiectasia jsou shrnuty v tabulce č. 1.

Ataxia teleangiectasia		Lurcher
Klinicky se neprojevuje bezprostředně po narození		+
Propuknutí klinických příznaků do dvou let věku		+ (do 6-8 týdnů věku)
Kompletní příznaky:	ataxie	+
	teleangiektázie	?
	opakované sinopulmonální infekce	?
Selektivní deficience některých tříd imunoglobulinů		?

Tabulka č. 1. Srovnání klinických projevů u lidského onemocnění a myšičího modelu. + shodné nálezy, ? u zvířecího modelu nebylo ještě detailně studováno.

### **2.1.2.3 Indukce olivopontocerebelární degenerace selektivním neurotoxinem**

Pro odlišení zda jsou změny způsobeny neurodegenerací samotnou nebo jsou následkem postižení v jiných systémech, jsme použili modelování pomocí neurotoxinu 3-acetylpyridinu, který je selektivní pro oblast mozečku a dolní olivy. Výsledkem jeho aplikace je stejný neurologický deficit jako u výše zmíněné *Lurcher* myši. Srovnání s tímto modelem tedy umožňuje diferencovat změny na podkladě genotypu a geneticky nepodmíněné, které jsou důsledkem vzniklé neurodegenerace (Caddy & Vozeh, 1997).

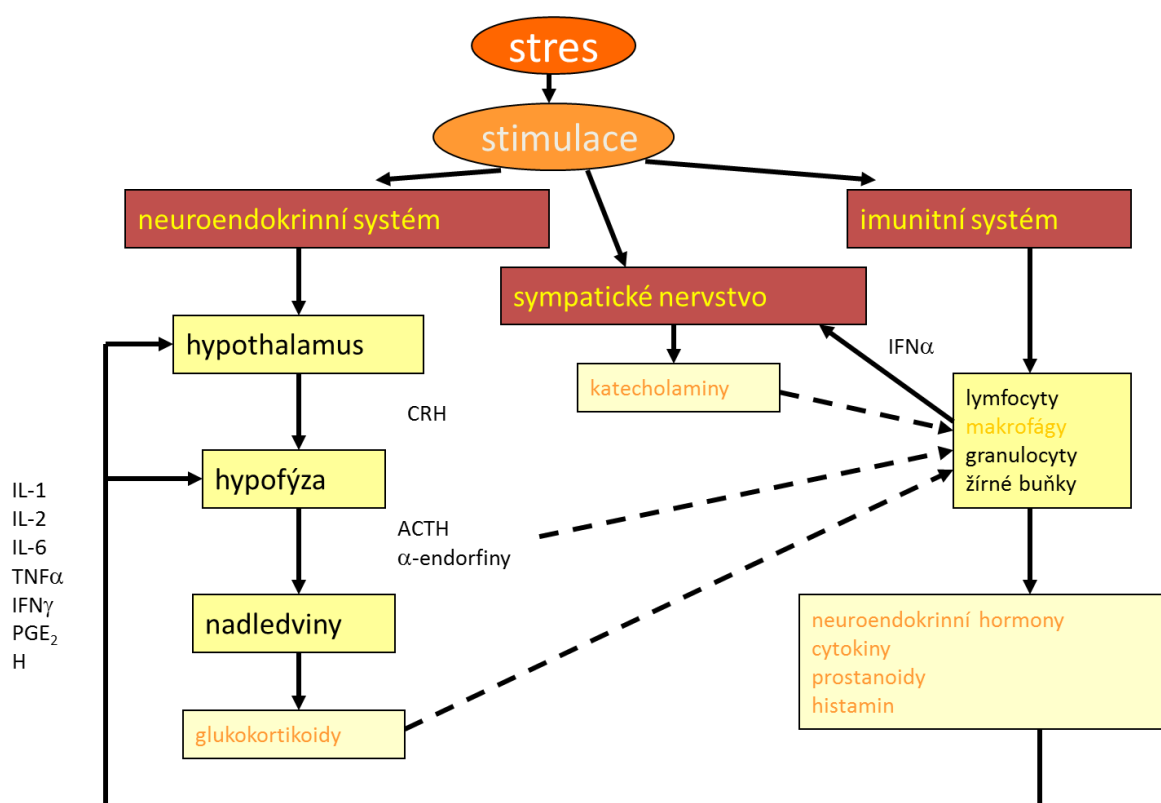
Uvedený přehled není komplexním zpracováním tematiky. Jedná se o náhled do problematiky a ukázání možností a limitů, která práce se zvířecími modely přináší. Pro detailnější informace odkazují na použitou literaturu. Existuje řada přehledových publikací, zabývajících se obecně možnostmi modelování lidských neurodegenerativních onemocnění u zvířat. Bylo publikováno též mnoho prací zabývajících se konkrétními modely pro určitá onemocnění.

## **2.2 Stres a vliv stresu na organizmus**

Za první vymezení pojmu stres v novodobé historii můžeme považovat definici Hanse Selyeho, který je často nazýván „otcem stresu“. Popisuje ho jako nespecifický fenomén reprezentující průnik symptomů způsobený širokým spektrem škodlivých agens. Později tento Selyeho koncept modifikoval John Wayne Mason, který poukazuje na důležitost psychosociálních stresorů a emocionálních aspektů stresu. Stresovou reakci definuje jako specifickou hormonální, behaviorální a fyziologickou odpověď organismu. Našli bychom ještě další definice, kdy Lazarus definuje stres jako nárok na jednotlivce, který přesahuje jeho schopnosti se s nárokem vyrovnat či Ganongovu fyziologickou definici, která uvádí, že stres je takový vliv na člověka, který vede k prodloužené hormonální odezvě kůry nadledvin (Bali & Jaggi, 2015b; Schreiber, 1992).

Dnes stres v širším slova smyslu považujeme za narušení homeostázy organismu, během čehož dochází k aktivaci různých adaptivních procesů a v důsledku toho následně k fyziologickým a behaviorálním změnám. Tyto změny nastávají na úrovni psychologické (emocionální a kognitivní), behaviorální („fight and flight“) a biologické (změny autonomních a endokrinních funkcí) (Bali & Jaggi, 2015b).

Z hlediska délky expozice stresoru dělíme stres na akutní a chronický. V důsledku působení akutního stresu dochází ke spuštění kaskády biologických dějů, zejména díky aktivaci dvou hlavních drah, tj. hypothalamo-pituitárně-adrenální (HPA) osy a sympatického adreno-medulárního systému. Prostřednictvím neuroendokrinního systému dochází pak dále i k ovlivnění dalších systémů, především imunitního systému. Zmíněné systémy tedy kooperují jako jednotný neuro-endokrino-imunitní (NEI) systém. Na úrovni imunitního systému můžeme pozorovat jednak změny v zastoupení buněčných subpopulací a také změny v produkci působků buněk imunitního systému - cytokinů. Zmíněné cytokiny se též podílí na zpětnovazebných regulacích (Bali & Jaggi, 2015b; Gaillard, 1994; Kiecolt-Glaser et al., 1984). Schematické znázornění působení stresu na organismus je uvedeno na obrázku č. 1.



Obrázek č. 1. Schematické znázornění působení stresu na organismus, zapojení hypothalamo-pituitárně-adrenální (HPA) osy s účastí odpovídajících hormonů (kortikotropin uvolňující hormon (CRH) a adrenokortikotropní hormon (ACTH)) a zpětnovazebných regulací prostřednictvím cytokinů (interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), tumor nekrotizující faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )), prostaglandinu E2 (PGE2) a histaminu (H).

Aktivace HPA osy je zmiňována jak u akutního, tak chronického stresu. Nicméně odpověď organismu na akutní a chronický stres je zpravidla odlišná. Rozdíly jsou

pozorovány v závislosti na délce a intenzitě působícího stresu. Především chronický stres je zmiňován jako faktor predisponující k různým psychickým či somatickým onemocněním. Zmiňovány jsou především deprese, kardiovaskulární choroby, diabetes mellitus, autoimunitní onemocnění, infekce horních cest dýchacích a horší hojení ran (Cohen et al., 2012; Porcelli, Lewis, & Delgado, 2012; Uschold-Schmidt, Nyuyki, Fuchsl, Neumann, & Reber, 2012). Již dlouhodobě je také zmiňován negativní vliv chronického stresu na reprodukční funkce v důsledku aktivace hypothalamo-pituitárně-gonadální (HPG) osy (Rivier & Rivest, 1991).

U chronického stresu je předpokládáno, že jedním z mechanismů působení je rezistence glukokortikoidních receptorů, což může interferovat s HPA mediovanou negativní regulací lokální prozánětlivé cytokinové odpovědi. Bez odpovídající regulace prostřednictvím kortizolu může na základě regulace ve smyslu prozánětlivé odpovědi docházet k přehnané manifestaci známek zánětu (např. horních cest dýchacích apod.) (Cohen et al., 2012).

### **2.3 Používané protokoly a hodnocení stresu v preklinických studiích**

Jak již bylo zmíněno výše, pro hodnocení vlivu stresu na organismus jsou v preklinických studiích používány zvířecí modely. Nejčastěji se jedná o myši nebo laboratorní potkany. Výhodou těchto „malých“ zvířecích modelů je snadná dostupnost, nízké náklady na chov, krátké reprodukční cykly a relativně velká reprodukční kapacita. Z „velkých“ zvířecích modelů jsou to pak prasata, obvykle miniprasata či méně často primáti, jejich výhodou je především anatomická a fyziologická podobnost člověku. V této kapitole se budu věnovat stručnému popisu protokolů a hodnocení vlivu stresu u zmiňovaných modelů.

Vzhledem k tomu, že v návrhu experimentů plánuji zařazení jen „malých“ zvířecích modelů, soustředím se tedy pouze na tyto protokoly.

## **2.3.1 Protokoly používané k indukci stresu**

### **2.3.1.1 Imobilizační stres**

Imobilizace je komplexním stresorem. Má jak fyzické, tak psychosociální dimenze. Procedura imobilizace spočívá ve fixaci všech čtyř končetin a hlavy k podložce. Vzpírání se a svalová práce ve snaze osvobodit se z fixace představuje fyzickou komponentu. Na druhé straně omezená možnost pohybu v imobilizační pozici při expozici volnému prostoru je psychologickým stresem. Imobilizace je laboratorními zvířaty relativně dobře tolerována a je používána a ve studiích zabývajících se chronickým stresem. Tento typ stresu efektivně aktivuje systémovou odpověď na stres včetně HPA osy a sympatického nervového systému. Tento typ indukce stresu je vhodný především pro studie týkající se stresem indukované neurodegenerace, posttraumatických poruch a deregulace imunitního systému. Také je zmiňována u testování látek s potenciálním protistresovým účinkem. Imobilizace může být také kombinována s jinými typy stresorů (Bali & Jaggi, 2015b; Bhatia, Jaggi, Singh, Anand, & Dhawan, 2011; Jaggi et al., 2011).

Pro indukci akutního stresu je typicky používána jedna epizoda imobilizace v délce trvání 120-150 minut. Konkrétní trvání imobilizace je závislé na zaměření studie, pro kterou je používána. U chronického imobilizačního stresu jsou zmiňována rozmezí celkového trvání experimentů 5-30 dní. Expozice stresu se pohybuje od 60 do 150 minut denně v průběhu výše zmíněného trvání experimentu (Bali & Jaggi, 2015b).

### **2.3.1.2 Omezovací stres**

Omezovací stres je modifikovanou formou imobilizačního stresu. Zvíře je omezeno v pohybu po určenou dobu. Neurální a endokrinologické studie ukazují, že omezovací stres je méně intenzivní stresor než imobilizační. Často je využíván pro indukci jak akutního, tak chronického stresu u laboratorních potkanů. Zvíře je umístěno do dobře větraného, nejčastěji plastového válce. Ačkoli možnost pohybu je výrazně omezena, končetiny nejsou v tomto případě fixovány. Pro indukci akutního stresu jsou v závislosti na typu studie zmiňována omezení v trvání 15 minut až 3,5 hodiny. U chronického stresu se délka

experimentů pohybuje od 7 do 60 dnů, expozice stresu denně během experimentu pak od 1 do 6 hodin. Nejčastěji je používána expozice na 1 hodinu denně (Bali & Jaggi, 2015b).

### **2.3.1.3 Stres indukovaný elektrickými impulsy (angl. electric foot shock-induced stress)**

Stres indukovaný elektrickými impulsy zahrnuje jak fyzickou, tak emocionální komponentu a je užíván jednak jako přímý stresor (fyzický stres), tak i jako nepřímý stresor (psychologický stres). Je využíván k indukci akutního i chronického stresu o různé intenzitě od mírného po závažnější. Pro studium různých aspektů stresu jsou využívány různé intenzity, trvání a frekvence impulzů. Aplikace probíhá prostřednictvím podložky, na které zvíře stojí. Do tlapek jsou takto aplikovány impulsy, které jsou pro zvíře nepříjemné, ale nikoli bolestivé. Je sledována a hodnocena lokomoce zvířete ve snaze se impulzu vyhnout. Tento model je často využíván pro experimenty zabývající se pamětí (Bali & Jaggi, 2015a, 2015b).

Při využití jakožto fyzického stresoru jsou pro indukci akutního stresu uváděny intenzity 0,15-3 mA v trvání od 200 ms do 5 s. Velká variabilita je ve frekvenci aplikace (pohybuje se v řádech desítek sekund až hodin) a trvání série impulzů. Pro indukci chronického stresu existuje řada protokolů různě se lišících ve všech parametrech. Intenzity aplikovaného elektrického pole se pohybují v rozmezí 0,15 – 1 mA v trvání od 750 ms do 6 s. Frekvence aplikace a trvání aplikované série jsou v jednotlivých protokolech značně odlišné. Používají se dvě rozdílná nastavení. U prvního se jedná o aplikaci série pulzů v pravidelných intervalech, u druhého je aplikace pulzu v náhodných nepředvídatelných intervalech. Jak již bylo zmíněno, model indukce stresu elektrickými impulsy je využíván i pro navození psychologického stresu. V tomto případě se jedná o nepřímé působení prostřednictvím vizuálních, čichových a sluchových vjemů na jedince, kterým nejsou přímo aplikovány elektrické impulsy, zvířaty, která jsou stresu vystavována. V tomto případě jsou též uváděny různé protokoly lišící se v intenzitách, délkách a frekvencích aplikace (Bali & Jaggi, 2015b; Jaggi et al., 2011).



### **2.3.1.4 Další protokoly používané pro indukci stresu**

O dalších možnostech indukce stresu se již zmíním pouze stručněji, protože se jedná o metody, jejichž využití pro své experimenty nepředpokládám. Specifickým typem stresu je stres vyvolaný sociální izolací, který je využíván pro hodnocení stresu vyvolaného separací zvířete od matky v časném neonatálním období. Tento model je přínosný při hodnocení vlivu negativních událostí v časném novorozeneckém věku na další vývoj jedince (Bali & Jaggi, 2015b).

Další modely jsou založeny na modelování fyzického stresu. Do této skupiny patří např. pobyt v chladném prostředí, kombinace chladu s omezovacím stresem a stres vyvolaný nuceným plaváním. Pro pobyt v chladném prostředí je nejčastěji používána teplota 4 °C, ale jsou popisovány i modely pro chronický mírný chladový stres, kdy např. u tzv. nahých myší, které jsou bezsrsté je již teplotní gradient o 4 °C oproti jejich běžné chovné teplotě (cca 25-26 °C), tj. 22 °C považován za stresující a je schopen vyvolat při dlouhodobém působení poměrně závažné změny imunitních parametrů (konkrétně v zastoupení lymfoidních subpopulací a tvorby protilátek) (Cervinkova, Smetana, Holub, Sima, & Funda, 1998; Jaggi et al., 2011; Sima, Cervinkova, Funda, & Holub, 1998). Pro kombinaci chladu a omezovacího stresu je zmiňována teplota prostředí 5 °C nebo voda o teplotě 22 °C v kombinaci s imobilizací zvířete. Stres vyvolaný nuceným plaváním je založen na situaci, kdy je zvíře umístěno do válce o průměru 30 cm, naplněného do výše 20 cm vodou, ve kterém zvíře plave ve snaze z nádoby uniknout (Jaggi et al., 2011).

Pro specifické výzkumné otázky jsou využívány i další možnosti indukce stresu či modifikace zmíněných schémat, o kterých se vzhledem k celkovému rozsahu práce již podrobněji zmiňovat nebudu.

### **2.3.2 Hodnocení stresu v preklinických studiích**

K hodnocení ovlivnění jedince stresem jsou v preklinických studiích využívány behaviorální, biochemické a fyziologické parametry.

### **2.3.2.1 Behaviorální testy**

Z behaviorálních testů jsou běžně používány „Open field exploration test“, „Hole board test“ a „Social interaction test“ (pozn. autorky: *názvy testů jsou cíleně ponechány bez překladu v anglickém originále pro zachování jednotnosti, protože u prvních dvou zmiňovaných testů se české překlady standardně nepoužívají*) (Bali & Jaggi, 2015b).

Open field exploration test je založen na hodnocení explorační v novém prostředí. Standardní aréna nejčastěji používaná pro testování u myši je čtvercová, o délce stěn 44 x 44 cm a výšce 30 cm, ačkoli jsou uváděny i jiné rozměry v závislosti na typu experimentu. Je hodnocen spontánní pohyb zvířete (počet přechodů přes arénu), explorační prostředí (vyplašení) a strach či úzkost (držení se při stranách arény, defekace) (Bali & Jaggi, 2015b).

Hole board test využívá desku s otvory, do kterých zvíře při exploraci prostředí ponoří hlavu. Vychází se z předpokladu, že počet a hloubka ponoření hlavy do otvoru negativně koreluje s anxiózitou zvířete. Standardní doba testování je 10 minut. Tento test je používán u myši a laboratorních potkanů (Bali & Jaggi, 2015b).

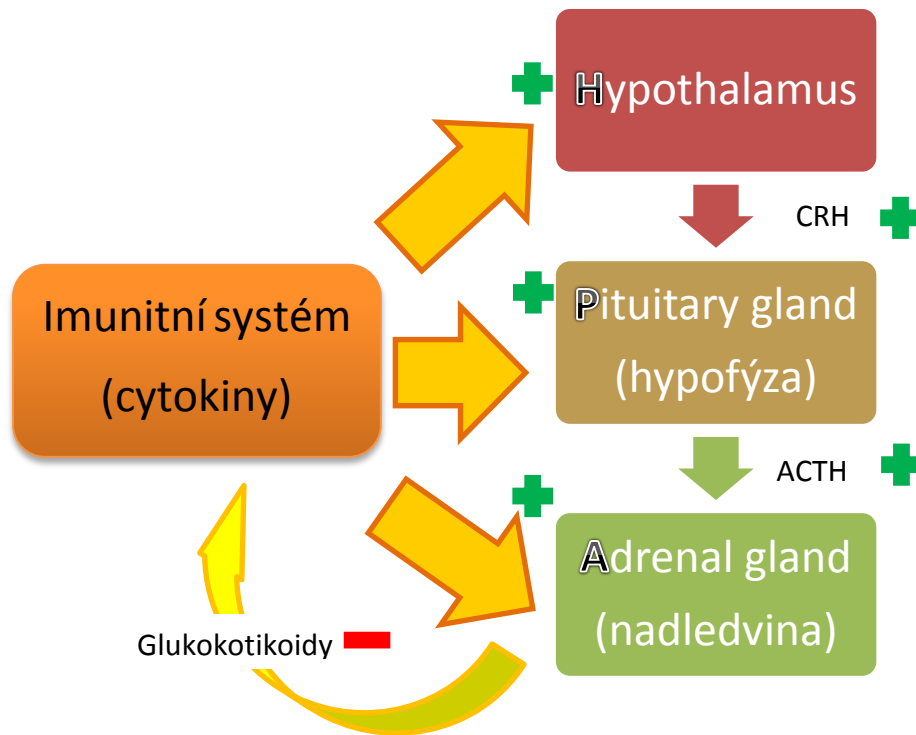
Social interaction test je prováděn v aréně používané u Open field exploration test. Principem je hodnocení interakce hodnoceného zvířete s jiným, jemu doposud neznámým zvířetem. Je sledován celkový počet, délka a typ kontaktů za dobu 10 minut (Bali & Jaggi, 2015b).

### **2.3.2.2 Biochemické parametry**

Pro hodnocení vlivu stresu jsou v preklinických studiích sledovány hladiny kortikosteronu a ACTH (produkt HPA osy). Jsou popisovány různé změny u obou sledovaných markerů v závislosti na typu a trvání stresu.

Uvolňování kortikosteronu z nadledvin je odpovědí na stoupající hladiny ACTH. Plazmatické hladiny kortikosteronu jsou považovány za vnější marker aktivity CNS (zejména limbicko-hypothalamické aktivity), přičemž HPA osa je regulována zpětnovazebně prostřednictvím limbického systému. Ačkoli je kortikosteron dobrým

markerem pro hodnocení působícího stresu, má výpovědní hodnotu pouze u mírných a středních stresorů z důvodu regulace cirkulujícím ACTH. Při opakovaných expozicích stresu dochází obecně k poklesu hladin kortikosteronu v důsledku adaptace HPA osy (Bali & Jaggi, 2015b). Systém regulací v rámci HPA osy ukazuje obrázek č. 2.



Obrázek č. 2. Systém regulací uplatňující se v rámci hypothalamo-pituitárně-adrenální (HPA) osy. CRH – kortikotropin uvolňující hormon (z angl. corticotropine releasing hormone), ACTH – adrenokortikotropní hormon (z angl. adrenocorticotropic hormone); + - pozitivní odpověď, - - negativní odpověď. (Pozn. autorky: názvy *pituitary* a *adrenal gland* jsou ponechány v angličtině a český překlad uveden v závorce, protože z jejich počátečních písmen vychází název HPA osa, který je v této podobě používán i v češtině).

Plazmatické hladiny ACTH jsou zmiňovány jako významný a reliabilní marker stresu. Je přímý vztah mezi intenzitou stresu a uvolňováním ACTH. Ačkoli jak kortikosteron, tak ACTH jsou uvolňovány v průběhu stresu jako důsledek aktivace HPA osy a ACTH stimuluje uvolňování kortikosteronu, hladiny těchto dvou hormonů nemusí vždy pozitivně korelovat. Disociace mezi jejich uvolňováním je poměrně častá. Byla popsána např. u některých psychických onemocnění (Bali & Jaggi, 2015b).

### **2.3.2.3 Fyziologické parametry**

Při působení stresu na organismus se přirozeně projevují také změny fyziologických parametrů. Běžně jsou v preklinických studiích sledovány příjem potravy a změny tělesné hmotnosti, hmotnost nadledvin a přítomnost žaludečních vředů.

Příjem potravy je stresem významně ovlivňován. Čím intenzivnější a delší je působení stresu, tím výrazněji je omezen příjem potravy a dochází též k významnějšímu poklesu hmotnosti. V preklinických studiích vykazovaly výraznější odpověď na emoční stres v tomto směru samice oproti samcům.

Nadledviny jsou hlavním orgánem odpovídajícím na působení stresu. Jsou součástí jak HPA osy, tak sympato-adrenomedulárního systému. Rozšíření kůry nadledvin, nárůst objemu dřene a ev. také zvýšený obsah katecholaminů je popisováno u různých typů chronického stresu. Chronickým stresem indukovaná hypertrofie dřene nadledvin je výsledkem aktivace sympatického nervového systému. Hypertrofie a hyperplazie zona fasciculata kůry je součástí změn nastávajících v rámci působení chronického stresu a výsledného nárůstu hmotnosti nadledvin. Na druhé straně u chronického stresu dochází spíše ke ztenčení zona glomerulosa. Za stimulaci a hypertrofii zona fasciculata a hypotrofii zona glomerulosa jsou patrně zodpovědné zvýšené plazmatické hladiny ACTH v průběhu chronického stresu.

Vředy žaludku jsou často pozorovány jako důsledek chronického a chronického nepředvídatelného stresu. Vznikají v důsledku zvýšeného uvolňování glukokortikoidů v průběhu chronického stresu čímž je narušena funkční homeostáza organismu a je vyšší susceptibilita ke vzniku ulcerací. Dalším působícím mechanismem je zde aktivace sympato-adrenomedulárního systému stresovým stimulem, v jehož důsledku dojde ke snížení průtoku krve žaludeční sliznicí a následné lokální ischemii a hypoxii. Pro posouzení vlivu stresu jsou vyšetřovány vzorky žaludeční sliznice (Bali & Jaggi, 2015b).

## **2.4 Stres a neurodegenerativní onemocnění**

### **2.4.1 Vliv stresu u jednotlivých neurodegenerativních onemocnění**

Předpokládaný vztah mezi stresem a neurodegenerativními chorobami je založen na poznatcích o provázanosti funkcí nervového, endokrinního a imunitního systému (Besedovsky & Sorkin, 1977). Různé typy stresu jsou považovány za možný etiologický faktor neurodegenerativního onemocnění. Je např. uváděno, že mechanický stres způsobený opakovanými traumaty mozku či chronický psychologický stres může být predisponujícím pro vznik Alzheimerovy nemoci (Ermak, Pritchard, Dronjak, Niu, & Davies, 2011).

Další studie uvádějí negativní vliv psychologického stresu a na druhé straně pozitivní vliv cvičení jako faktory působící také na neurovaskulární úrovni. Předpokládá se, že efekt je zde zprostředkován jak ovlivněním rizikových faktorů pro cévní onemocnění, jako hypertenze, diabetes, pružnost aorty, tak přímým vlivem na mozkovou vaskulaturu, včetně ovlivnění krevního průtoku, angiogeneze a postižení cév (Garcia-Mesa et al., 2011; Nation et al., 2011). Jsou však publikovány také práce, které upozorňují na to, že vzhledem k tomu, že etiopatogenetické faktory nejsou dodnes dobře známy, je třeba vzít v úvahu, že stres nemusí být vyvolávajícím činitelem, ale že situace je složitější a je třeba vzít v úvahu, zda příčinou probíhajících dějů je působení stresu či neurodegenerativní onemocnění samotné, ačkoli dosud nejsou rozvinuty klinické příznaky. Nabízí se tedy otázka, zda je primární působení stresu nebo je ovlivněna vnímavost ke stresu již přítomným neurodegenerativním onemocněním (Pastore & Adinolfi, 2014).

Také u Parkinsonovy nemoci je uváděn stres jako ovlivňující faktor. Jednak je zmiňován jakožto rizikový pro následný výskyt depresí u PN, ale také jako predisponující pro onemocnění PN samotnou. Stresové a afektivní poruchy jsou uváděny jako faktory ovlivňující rozvoj neurodegenerativního onemocnění. I zde je tedy otázkou, co je v tomto případě primární, zda působení stresu či neurodegenerativní onemocnění (Hemmerle, Herman, & Seroogy, 2012).

Podobných výsledků bylo dosaženo při výzkumu týkajícím se Huntingtonovy choroby. Při působení chronického stresu je popisováno zhoršení motorických, kognitivních, psychických a sexuálních funkcí u myšího HCH modelu. Zhoršení bylo

popisováno i u zdravých kontrol, ale v mnohem menší míře. U HCH je též ve vyšší míře popisován výskyt anxiózních a depresivních poruch. Také zde tedy z výsledků vyplývá, že nelze jednoznačně říci, zda stres je primární příčinou či nikoli (Du et al., 2015; Mo, Renoir, & Hannan, 2014).

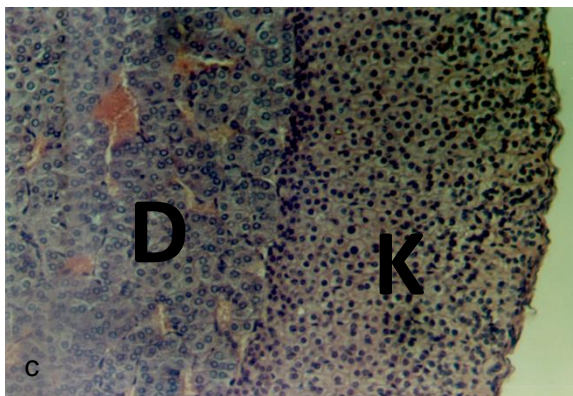
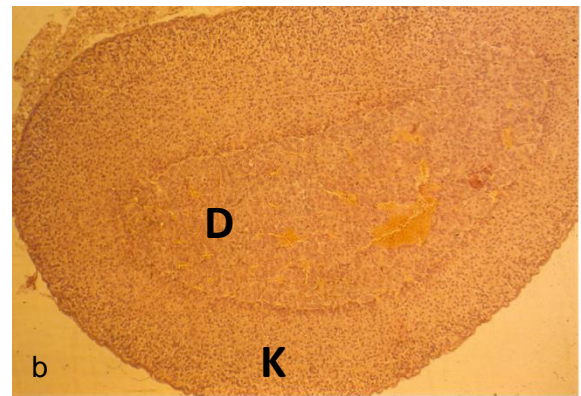
Ačkoli jsou u Amyotrofické laterální sklerózy popisovány deregulace HPA osy ve smyslu cirkadiálního kolísání hladin kortizolu, nenalezla jsem u této choroby práce, které by se přímo zabývaly vlivem stresu na nástup choroby. Přičemž je publikována řada prací, které uvádějí emocionální labilitu a zvýšený výskyt anxiózních a depresivních symptomů, což je dle mého zcela pochopitelné v důsledku rozvíjejícího se motorického postižení, které je pro postiženého jistě psychicky značně zatěžující. Zvýšený výskyt anxiózních a depresivních symptomů je pravděpodobně také z tohoto důvodu uváděn také u osob pečujících o takto postižené (Chen et al., 2015; Mitchell & Borasio, 2007; Patacchioli et al., 2003).

#### **2.4.2 Vliv stresu u modelu *Lurcher* myši**

Tuto kapitolu jsem do přehledu zařadila proto, že se jedná o poznatky z mého vlastního výzkumu, který byl původně věnován tématu neurodegenerativních onemocnění, jejich příčin a zejména účasti imunitního systému. Při provádění experimentů jsem si povšimla, že *Lurcher* myši ve srovnání se zdravými kontrolami extrémně špatně reagují na jakoukoli manipulaci, a to i pouze při přemístování zvířete z jednoho akvária do jiného, bez jakékoli další intervence. Několikrát došlo i k tomu, tato pouhá manipulace dokonce vedla k náhlému úmrtí zvířete.

V dalším výzkumu jsme se tedy více soustředili i na parametry endokrinní, zejména v souvislosti s aktivitou HPA osy. U *Lurcher* myši byly pozorovány změny ve struktuře nadledviny. Nadledviny byly celkově menší a při preparaci bylo patrné, že korová vrstva je „křehčí“, častěji docházelo k odtržení kůry od dřene. Při mikroskopickém zhodnocení jsem zjistila, že jednotlivé korové zóny jsou redukovány a mají setřelou strukturu, ale jejich vzájemný poměr se neměnil. Dřeň nadledviny byla naopak hyperplastická. Poměr dřeň/kůra je tedy u *Lurcher* myši oproti zdravým kontrolám zvýšen. Domnívám se, že se jedná o relativní hypertrofii dřene s relativní hypotrofií kůry. Toto pozorování by mohlo

nepřímo ukazovat na zvýšenou produkci stresových hormonů katecholaminů a vysvětlovat zvýšenou excitabilitu a náchylnost tohoto kmene ke stresu (Cervinkova et al., 2006). Jednotlivé mikroskopické nálezy jsou ukázány na obrázku č. 3.



Obrázek č. 3. Srovnání relativního poměru kůry (K) a dřeně (D) u zdravé kontroly (a) a *Lurcher* myši (b) postižené mozečkovou degenerací. Oproti kontrole je patrná relativní hypotrofie kůry a hypertrofie dřeně. Dále je v detailu ukázána ztenčená korová část (c).

Dále byly u *Lurcher* myši nacházeny i změny ve struktuře orgánů imunitního systému, zastoupení lymfoidních subpopulací a apoptóze lymfoidních buněk, což může být též důsledkem změn v regulacích v rámci neuro-endokrino-imunitního systému. Těmto nálezům se již podrobněji věnovat nebudu, protože nejsou předmětem předkládané práce (Cervinkova et al., 2006).

### 2.4.3 Mechanizmy vysvětlující souvislost neurodegenerativních onemocnění a stresu a z toho vyplývající potenciální nové terapeutické intervence

U neurodegenerativních onemocnění včetně Alzheimerovy nemoci, Parkinsonovy nemoci, Huntingtonovy choroby i Amyotrofické laterální sklerózy je popisována častá asociace s diabetem II. typu. Nabízí se zde možnost propojení v souvislosti s deregulací

v oblasti procesů zahrnujících oxidativní stres, mitochondriální dysfunkci a microRNAs (Hassan, Sehgal, & Rashid, 2014).

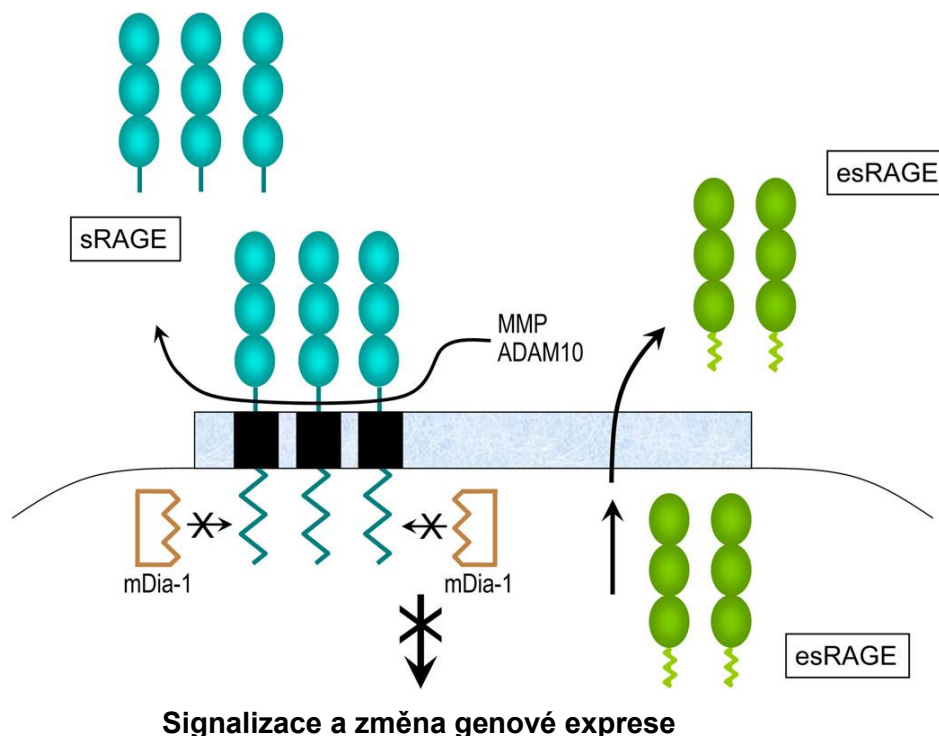
Doprovodné zánětlivé procesy v postižené tkáni jsou zmiňovány u všech výše zmíněných neurodegenerativních onemocnění. Buňkami, které jsou za tyto zánětlivé procesy v mozku zodpovědné, tj. astrocyty a mikroglíí jsou uvolňovány také odpovídající mediátory zánětu (cytokiny, chemokiny a reaktivní volné radikály). Není jednotný názor, zda provázející zánět je predisponujícím či facilitačním faktorem nebo naopak působí protektivně. Závěry jednotlivých studií se v tomto směru různí. Nabízí se tedy využití výše zmíněných procesů k potenciálním terapeutickým intervencím. V experimentálních studiích na zvířecích modelech byl např. popsán pozitivní efekt minocyklinu. Další slibnou oblastí jak pro diagnostické účely, tak i pro případnou možnost intervence se jeví detekce a případná modulace na úrovni produkovaných cytokinů. Jednalo by se tedy o biologickou léčbu na podobném principu, jak je dnes již běžně užívána např. u nespecifických střevních zánětlivých onemocnění (Ellrichmann, Reick, Saft, & Linker, 2013; Hsiao & Chern, 2010; Kotrcova et al., 2015).

Jako možný mechanismus zprostředkující vliv faktorů vnějšího prostředí na organizmus a zároveň propojující procesy zánětu a stárnutí organismu se uvádějí RAGE (z angl. receptor for advanced glycation end products; pozn. autorky: *český překlad se nepoužívá*). Zvýšená exprese těchto receptorů je popisována u řady zánětlivých a nádorových onemocnění, včetně neurodegenerativních onemocnění. Uvádí se, že receptor přítomný na buňce po aktivaci spustí kaskádu dějů vedoucí k poškození buňky, resp. tkáně v místě zvýšené tvorby jejich ligandů AGEs (z angl. advanced glycation endproducts pozn. autorky: *český překlad se nepoužívá*). K tvorbě AGEs dochází zejména neenzymatickou glykací proteinů, nukleotidů a lipidů za patologických stavů, kdy jsou redukovány obranné mechanismy a narůstá buněčný stres. Za rizikový faktor je považována zvýšená glykémie. Následně AGEs prostřednictvím aktivace RAGE akcelerují procesy stárnutí, zánětu a další patologické důsledky (Levesque et al., 2011; Ramasamy, Yan, & Schmidt, 2012).

Kromě zmíněné membránové formy RAGE, která je přítomna na buněčném povrchu a spouští kaskádu dějů vedoucích k poškození tkáně, existují i solubilní formy sRAGE a es RAGE. esRAGE je produkován na základě alternativního sestřihu na úrovni mRNA. sRAGE vzniká odštěpením RAGE z buněčné membrány za pomoci enzymů



matrix metaloproteináz (MMP), v tomto případě konkrétně ADAM10. Procesy vedoucí ke vzniku solubilních forem RAGE jsou znázorněny na obrázku číslo 4.



Obrázek č. 4. Procesy vedoucí ke vzniku solubilních forem RAGE. MMP – matrix metaloproteináza (Převzato: Yan, Ramasamy, & Schmidt, 2010).

Solubilní formy jsou považovány za protektivní, protože mohou AGEs vyvázat v cirkulaci, dříve než se dostanou k cílové tkáni a zabránit tak tkáňovému poškození a následnému rozvoji či progresi choroby. I toto je tedy oblast, kde se nabízí případná možnost terapeutické intervence, ať již na úrovni exprese RAGE na buněčném povrchu, tak produkce solubilních forem např. ovlivněním aktivity matrix metaloproteináz (Yan, Ramasamy, & Schmidt, 2010).

### **3 Návrh výzkumného projektu**

Jak již bylo zmíněno v teoretické části práce, k posouzení vlivu stresu na organizmus jsou často používány zvířecí modely. Také ve své práci počítám s tím, že kromě prospektivních studií zahrnujících srovnání vlivu stresu u jedinců postižených neurodegenerativním onemocněním se skupinou zdravých lidí, budou zařazeny i experimenty využívající zvířecích modelů.

#### **3.1 Návrh studií u lidské populace**

##### **3.1.1 Návrh průřezové studie u probandů s již diagnostikovaným neurodegenerativním onemocněním**

Cílem této studie je odpovědět na otázku, zda je rozdíl ve vnímavosti ke stresu u jedinců postižených neurodegenerativním onemocněním ve srovnání se zdravými kontrolami. Vycházím z hypotézy, že míra vnímavosti ke stresu bude vyšší u postižených jedinců oproti kontrolám. Vzhledem k tomu, že stres je do značné míry otázka individuálního vnímání konkrétního stresoru, předpokládám, že rozdíly by se měly projevit spíše na úrovni subjektivního vnímání, než objektivně působícího stresu. Je také obtížné a prakticky téměř nemožné kvantifikovat míru působícího stresu v přirozených podmínkách.

Do této průřezové studie bude zařazena skupina jedinců s již diagnostikovaným neurodegenerativním onemocněním, v tomto případě Alzheimerovou chorobou. Jako kontrolní bude zařazena skupina zdravých jedinců odpovídající věkovým rozmezím a poměrem pohlaví ve sledované skupině. Protože se jedná o onemocnění zahrnující převážně vyšší věkové kategorie, nelze sestavit skupinu probandů tak, aby byly vyloučeny komorbidity, které mohou případně působit jako intervenující proměnné. Vzhledem k tomu, že by v tomto případě bylo velmi těžké tyto potenciální intervenující proměnné jakkoli vhodně ošetřit, volila bych tedy tu cestu, že bude odebrána pečlivá anamnéza a případné komorbidity zaznamenány pro případ, kdy by na základě výsledku bylo podezření, že může být ovlivněn ještě dalším faktorem. Tento přístup se mi v minulosti již osvědčil při výzkumu týkajícím se nádorových onemocnění, kde je také prakticky nemožné vyloučit komorbidity.

Vstupně budou pacienti vyšetřeni pro zhodnocení kognitivního deficitu, aby bylo ověřeno, zda nejsou i ve zdravé skupině jedinci s kognitivním deficitem a na druhé straně, aby bylo u skupiny s neurodegenerativním onemocněním ověřeno, zda kognitivní deficit není již natolik závažný, aby případně ovlivnil schopnost podstoupit následné testování ke zjištění míry vnímaného stresu. K tomuto účelu by bylo možné využít např. Mini Mental State Examination (MMSE) (Folstein, Folstein, & McHugh, 1975), který je v praxi běžně pro hodnocení používán.

Následně obě skupiny podstoupí vlastní testování týkající se míry vnímaného stresu. K tomuto účelu může být použito testu Stress profile, který je koncipován jako sebeposuzovací dotazník, případně PSS-10 (Perceived Stress Scale) pro rychlou základní orientaci (Nowack, 2006). Dalším vhodným testem by byla např. Beckova škála deprese – BDI-II (Beck, Steer, Ball, & Ranieri, 1996; Beck, Ward, Mendelson, Mock, & Erbaugh, 1961). Co se týká objektivně působícího stresu, jsem si vědoma, že naprosto objektivního zhodnocení zde nelze dosáhnout. Nepřímo by bylo možno usuzovat např. na základě disociace, která by mohla vypovídat spíše o dlouhodobě působícím stresu či koncentraci pozornosti, kde by mohl být patrný i vliv aktuálně působícího stresu. K hodnocení disociace by bylo možno využít např. testů DES-20 (škála disociačních zkušeností) a SDQ-20 (škála somatomorfni disociace) (Bernstein & Putnam, 1986; Nijenhuis, Spinhoven, Van Dyck, Van der Hart, & Vanderlinden, 1996). Stran koncentrace pozornosti by bylo možno využít např. i testu Číselný čtverec. Jedná se o velmi jednoduchý test, který byl původně vyvinut pro testování dětských pacientů, jeho jednoduchost by byla u pacientů, kde je předpokládán kognitivní deficit různého stupně, jistě s výhodou (Jirásek, 1975). Existuje i celá řada dalších testů, které by mohly být pro zmíněné účely použity, zde uvádím ty, které jsem měla možnost podrobněji prostudovat.

K objektivnímu posouzení působícího stresu by bylo také možno použít biologických markerů. Nejčastěji jsou zmiňovány sérové hladiny kortizolu. U člověka se nabízí i možnost neinvazivního testování z odebraných slin (Obayashi, 2013).

Získané výsledky budou porovnány mezi skupinou probandů a kontrolní skupinou. Bude také sledováno, zda subjektivní vnímání stresu koreluje s výsledky testů, které nepřímo ukazují na míru působícího stresu a hladinami biologických markerů. Případně se nabízí také možné srovnání mezi pohlavími, protože lze předpokládat, že vzhledem k interindividuálním rozdílům ve vnímání stresu budou i zde patrné rozdíly.

### **3.1.2 Návrh prospektivní studie ke zjištění predispozice k neurodegenerativnímu onemocnění u rizikových skupin**

Cílem studie je odpovědět na otázku, zda stres a úroveň vnímaného stresu může ovlivnit nástup či progresi neurodegenerativního onemocnění. Vycházím z hypotézy, že míra působícího stresu bude rizikovým či facilitačním faktorem pro rozvoj onemocnění. Otázkou tedy je, zda bude rozdíl mezi jedinci s rizikovým faktorem v anamnéze a kontrolními subjekty a zda míra působícího stresu bude mít prediktivní hodnotu pro následný rozvoj onemocnění. Přičemž i zde předpokládám, že rozdíly by se měly projevit spíše na úrovni subjektivního vnímání. Uvedená otázka by měla přispět k objasnění, zda jsou pro rozvoj neurodegenerativního onemocnění rozhodující spíše genetické predispozice na straně jedince či faktory okolí. Na základě literárních údajů, uvedených v teoretické části, se dá nejspíše předpokládat, že se bude jednat o kombinaci obou zmíněných faktorů.

Do studie budou zařazeni probandi s rizikovým faktorem v anamnéze, v tomto případě výskytem Alzheimerovy choroby v rodinné anamnéze. Jako kontrolní subjekty budou zařazeni jedinci bez přítomného rizikového faktoru v anamnéze, případně by sledované skupiny mohly být rozděleny dále ještě dle pohlaví. Bude se jednat o longitudinální design, kdy bude předpokládán jednotný věk probandů na začátku sledování. V tomto případě bych zvolila 50 let, což je věk, kdy by měly být spolehlivě zachyceny i formy AN s časným nástupem. Ačkoli je v této studii předpokládán nižší věk probandů, než u předchozí, i zde je nutno počítat s komorbiditami, zejména pak v průběhu studie. Tak jako v předchozím případě, ani zde není prakticky možné je vyloučit. Bude tedy zvolen stejný postup, tj. budou pečlivě zaznamenávána anamnestická data v průběhu studie.

Obě skupiny budou před začátkem také vyšetřeny MMSE pro vyloučení ev. již přítomného kognitivního deficitu v obou skupinách. Na počátku studie budou obě skupiny testovány za použití stejných testů, jaké byly zmíněny v předchozí kapitole. Budou sledovány také stejné biomarkery. Na základě kombinace výsledků administrovaných testů a hladin sledovaných biomarkerů budou probandi v obou skupinách rozřazeni dle míry ovlivnění stresem na dvě další podskupiny. Jsem si vědoma, že v tomto případě by nejprve

musela být provedena předběžná studie, která by nastavila cut score pro jednotlivé skupiny.

Následně budou probandi testováni v pravidelných intervalech 2 let MMS pro zjištění případného kognitivního deficitu. Bude porovnáván výskyt onemocnění mezi skupinami. Dále bude hodnoceno, zda je doba, která uplyne od začátku sledování do nástupu klinických příznaků (kognitivní deficit), závislá na intenzitě vnímaného stresu a hladinách sledovaných biomarkerů. V případě zjištění kognitivního deficitu bude hodnoceno, zda existuje souvislost mezi mírou vnímaného stresu, hladinami biomarkerů a progresí onemocnění.

### **3.1.3 Předpokládané limity navržených studií**

Vzhledem k tomu, že se jedná o studie zahrnující probandy vyšších věkových kategoriích, nelze prakticky vyloučit komorbidity. Jak bylo navrženo, částečně je možným řešením důsledné zaznamenávání anamnestických dat. Nicméně i pokud jsou tyto údaje k dispozici a je podezření, že výsledek je u pacienta ovlivněn přítomnou komorbiditou, nelze s jistotou říci, zda je to skutečně jejím důsledkem, nebo se jedná o působení ještě dalšího dosud neidentifikovaného faktoru. Tímto může být např. jiná komorbidita, jejíž příznaky se dosud nerozvinuly, nebo celá řada dalších faktorů vycházejících z vnějšího prostředí.

Dalším úskalím je případně již rozvinutý výrazný kognitivní deficit, který u části pacientů pravděpodobně neumožní další testování, neboť zde by již nebyla jistota, zda pacient předkládané testy chápe správně a zda je schopen na otázky validně odpovědět. Dále je nutné brát na vědomí, že žádná z uváděných metod není schopna zhodnotit míru působícího stresu skutečně objektivně. Aby se dalo jakési částečné objektivitě alespoň přiblížit, patrně by bylo nutno zvolit kombinaci testů a několika biologických markerů na různých úrovních, což je v praxi vzhledem k náročnosti tohoto postupu v mnoha směrech neproveditelné.

U longitudinální studie by se zcela jistě projevil jev pro tento druh studie typický, tj. „opotrebení vzorku“. Také by byl limitující počet probandů, protože vzhledem k dělení skupiny na další podskupiny by bylo pravděpodobně dosti složité shromáždit dostatečný

počet sledovaných jedinců. Jak již bylo zmíněno nejprve by v tomto případě bylo nutné provést předběžnou studii, aby mohly být zvoleny cut score a nastaveny normy, na základě kterých by proběhlo zařazení do skupiny více či méně stresem ovlivněné. S výše zmíněnými úskalími souvisí i délka intervalu, ve které by měli být probandi sledováni. Při volbě příliš krátkého intervalu se dá předpokládat, že toto bude pro sledovaného jedince obtěžující. Při volbě příliš dlouhého intervalu by na druhé straně docházelo ke ztrátě dat ve smyslu zachycení nástupu onemocnění.

Vzhledem k velkému množství shromažďovaných dat a množství porovnávaných parametrů by navrhované studie byly jistě náročné i stran vyhodnocení a interpretace výsledků. Je pravděpodobné, že množství zpracovávaných dat by se vyžádalo využití pokročilejších metod multivariační analýzy.

Je pravděpodobné, že v průběhu navrhovaných studií by se objevily ještě další předem nepředpokládané limity či úskalí.

## **3.2 Návrh experimentu využívajícího zvířecí modely**

### **3.2.1 Experimentální design**

Vzhledem k tomu, že u člověka nelze objektivizovat působící stres v přirozených podmínkách je pro posouzení vlivu standardizovaného stresoru zařazen experiment využívající zvířecí modely pro neurodegenerativní onemocnění, konkrétně Alzheimerovu nemoc.

Cílem experimentu je zjistit zda existují rozdíly ve vnímavosti ke stresu mezi zvířecími modely, konkrétně myšimi pro Alzheimerovu nemoc a jejich zdravými kontrolami (jako kontroly jsou používány „wild type“ jedinci kmene, od kterého byl myší model odvozen, tedy mající stejné genetické pozadí). Další otázkou je, zda je pro vnímavost ke stresu rozhodující spíše genetický podklad nebo výsledné neurodegenerativní postižení.

Pro experiment budou použity 3xTg-AD myši, které jsou modelem pro AD formy AN. Druhou skupinou budou „wild type“ myši stejného kmene, u kterých bude kognitivní

deficit indukován aplikací  $\beta$ -amyloidu nebo neurotoxinu. Jako kontroly budou použity „wild type“ myši stejného kmene. Budou vytvořeny skupiny o 8-10 jedincích.

Zvířata budou exponována stresoru. V tomto případě bude zvolen imobilizační stres, který je uváděn jakožto vhodná forma pro studium neurodegenerativních onemocnění. Bude sledována odezva jak po expozici akutnímu, tak chronickému stresu. Expozice bude probíhat jednak ve smyslu přímého působení fyzického stresu, tak i nepřímého působení psychologického stresu. Délka expozice bude pro akutní stres 120 minut, pro chronický stres 120 minut denně při celkové délce trvání experimentu 30 dní. Konkrétní protokoly používané pro tyto účely byly popsány v předchozí kapitole. Pro přehlednost jsou jednotlivé skupiny experimentálních zvířat a typy působícího stresu sumarizovány v tabulce č. 2.

skupina	typ stresu	
kontrola	akutní	přímý
		nepřímý
	chronický	přímý
		nepřímý
3xTg-AD	akutní	přímý
		nepřímý
	chronický	přímý
		nepřímý
indukovaný model	akutní	přímý
		nepřímý
	chronický	přímý
		nepřímý

Tabulka č. 2. Sumarizace dle experimentálních skupin a typů působícího stresu.

Na začátku experimentu budou zvířata podrobena behaviorálnímu testování. Budou použity „Open field exploration test“, „Hole board test“ a „Social interaction test“. Konkrétní provedení testů odpovídá tomu, jak je popsáno v předchozí kapitole. Po tomto budou zvířata exponována stresoru dle odpovídajících protokolů pro imobilizační stres (Bali & Jaggi, 2015b). Následné testování bude probíhat v různých intervalech po expozici, přičemž první proběhne bezprostředně po ukončení experimentu. Další časové intervaly budou: 3 dny, 1 týden, 2 týdny a 1 měsíc.

V uvedených intervalech budou zvířata nejprve opět podrobena behaviorálním testům. Po té budou zvířata usmrcena a odebrán biologický materiál na biochemické testy

(krev) a k histologickému vyšetření (nadledviny, žaludek). U odebraných nadledvin bude nejprve zaznamenána jejich velikost a hmotnost a případné makroskopické změny. Eventuální makroskopické změny budou zaznamenávány i na žaludku. Materiál pro histologické vyšetření bude zpracován odpovídajícími metodami a vyhodnocen. U nadledvin bude kromě celkové velikosti hodnocen poměr kůry a dřeně a také případné změny v tloušťce jednotlivých korových vrstev. Na žaludeční sliznici bude hodnocen počet a rozsah přítomných ulcerací.

Po celou dobu experimentu bude zaznamenávána také hmotnost pokusných zvířat pro následné vyhodnocení kolísání hmotnosti v průběhu experimentu.

Srovnání bude provedeno mezi experimentálními skupinami v jednotlivých časových intervalech. Také budou mezi sebou srovnávány skupiny dle toho, zda se jednalo o akutní nebo chronický stres. Dále budou srovnávány výsledky v různých časových intervalech k zhodnocení změn vyvolaných působením stresu v čase.

Jako další varianta experimentu by mohlo být v budoucnu navrženo sledování změn v závislosti na typu působícího stresu. Zde by se nabízela celá řada modifikací experimentálního schématu.

### **3.2.2 Předpokládané limity navrženého experimentu**

Experiment na zvířecím modelu nabízí možnost ověření hypotéz, které není možné testovat u lidí, např. umožňuje podrobit zvíře standardizovanému stresoru, stejnému pro všechny testované jedince či dovoluje hodnotit změny v morfologii vnitřních orgánů. Přes uvedené výhody má však na druhé straně také mnohá omezení a nevýhody.

Pro navržený experiment je limitujícím faktorem, stejně jako pro všechny experimenty využívající zvířecí modely, problematická aplikace poznatků na lidskou populaci a tedy výsledná validita získaných výsledků. Vzhledem k tomu, že je použit myší model, je zde limitující velikost experimentálního zvířete a související anatomické a fyziologické rozdíly. Velmi omezené jsou zde možnosti odběru biologických materiálů. Konkrétně u myšího modelu je problémem nemožností získání dostatečného množství krve k hodnocení biochemických parametrů v průběhu experimentu bez usmrcení zvířete. S tímto souvisí také krátká doba života a rychlé stárnutí zvířete, které neumožňuje



sledování dlouhodobých změn. Je zde i omezení ve smyslu možnosti hodnocení kognitivního deficitu. Oproti lidské populaci zde zcela chybí možnost zhodnocení subjektivního vnímání stresu, což je poměrně velkým nedostatkem, pokud předpokládáme, že interindividuální rozdíly v lidské populaci budou dány především na úrovni subjektivního vnímání.

Z výše zmíněného vyplývá také problematická analogie s lidským onemocněním. Žádný ze zvířecích modelů nerekapituluje zcela odpovídající lidské onemocnění. V tomto konkrétním případě je použit model 3xTg-AD myši, která je modelem pouze pro AD formu onemocnění, která je však v lidské populaci velmi vzácná. Pro lepší srovnatelnost s lidským onemocněním by bylo spíše vhodnější zařadit apoE knock-in myši. Jedná se však o poměrně nový model, která ještě není běžně používán. Jeho použití by tedy vyžadovalo vyprodukování knock-in myši od konkrétního požadovaného kmene myši za použití transgenních technologií. Jedná se o postup, který je jak časově, tak finančně značně náročný a momentálně prakticky nereálný.

V tomto případě se tedy nejedná o experiment, který by měl být založen na analogii se situací v lidské populaci, ale měl by spíše přinést poznatky, které u člověka nelze získat. Dá se říci, že navržené studie u lidí a experiment na zvířecím modelu by měly přinést spíše komplementární poznatky. Zdali by tomu tak bylo by bylo nutno posoudit na základě předběžných výsledků studií a experimentu, eventuálně by bylo vhodné na základě tohoto poznatku upravit experimentální design, případně na druhé straně i znovu zvážit schémata navržených studií.

V důsledku nemožnosti odběru krve pro biochemická vyšetření bez usmrcení zvířete je také nemožné koncipovat experiment jako longitudinální. Je tedy nutné pro každý interval vytvořit samostatnou skupinu zvířat a srovnávat tyto skupiny mezi sebou. K provedení experimentu je tedy nezbytný velký počet experimentálních zvířat a v jednotlivých časových intervalech jsou srovnávány skupiny různých jedinců nikoli stejná skupina v průběhu času.

I zde by vzhledem k velkému množství sbíraných dat a následně porovnávaných parametrů byla velká náročnost stran vyhodnocení a interpretace výsledků. Také se dá předpokládat, že využití pokročilejších metod multivariační analýzy by bylo nezbytné.

## 4 Závěr

V předkládané práci jsem se snažila ukázat na vztah mezi neurodegenerativními onemocněními a stresem. Soustředila jsem se především na mechanismy, které by tuto provázanost mohly vysvětlovat. V první části literárního úvodu jsou charakterizována neurodegenerativní onemocnění. Je uvedena jen stručná charakteristika, a dále jsem se soustředila spíše na etiopatogenetické mechanismy, které jsou probrány i v souvislosti ze zvířecími modely. Další část je věnována obecným poznatkům o stresu a jeho působení na organismus. Zmiňuji se pouze o základních mechanismech a zpětných vazbách, protože tato problematika je sama o sobě velmi rozsáhlá. Více jsou v následující části rozebrány konkrétní poznatky týkající se vlivu stresu u neurodegenerativních onemocnění. Toto je dnes aktuální oblast výzkumu, a ačkoli bylo publikováno mnoho prací na toto téma, jejich závěry nejsou jednoznačné. Stále není zodpovězena otázka, zda je pro vznik neurodegenerativních onemocnění stres rizikovým faktorem či zda je naopak vnímavost ke stresu ovlivněna již přítomným onemocněním.

V kapitole, která je věnována mechanismům, které by mohly vysvětlovat spojitost mezi neurodegenerativními onemocněními a stresem, jsem se snažila ukázat i potenciální terapeutické intervence vyplývající ze znalosti těchto mechanismů. Toto je dnes velmi intenzivně se rozvíjející oblast výzkumného zájmu, právě proto, že by mohla nabídnout nové terapeutické postupy. Přes všechny dosavadní snahy je však možnost terapie neurodegenerativních onemocnění stále velmi omezená.

Vzhledem k tomu, že řada poznatků v oblasti vlivu stresu na organismus byla a je získávána experimenty na zvířecích modelech a i já jsem v empirické části je zařadila experiment tyto modely využívající, je do předkládané práce včleněna i přehledná kapitola, která sumarizuje protokoly pro indukci a hodnocení stresu v preklinických studiích. V empirické části jsou navrženy jednak studie v lidské populaci, tak i zmíněný experiment na zvířecím modelu. Snažila jsem se nastínit i limity, které se u navrhovaných studií a experimentu dají předpokládat.

Práce je pojata jako stručný náhled do problematiky a není možné, ani se neklade za cíl obsáhnout celou oblast komplexně. Byly vybrány pouze poznatky vztahující se ke konkrétně studovanému problému. V budoucnu bych se tomuto tématu věnovala i nadále a zpracovala na toto téma i diplomovou práci.

## 5 Seznam použité literatury

- Bali, A., & Jaggi, A. S. (2015a). Electric foot shock stress adaptation: Does it exist or not? *Life Sci*, 130(1), 97-102.
- Bali, A., & Jaggi, A. S. (2015b). Preclinical experimental stress studies: protocols, assessment and comparison. *Eur J Pharmacol*, 746, 282-292.
- Baxa, M., Hruska-Plochan, M., Juhas, S., Vodicka, P., Pavlok, A., Juhasova, J., et al. (2013). A transgenic minipig model of Huntington's Disease. *J Huntingtons Dis*, 2(1), 47-68.
- Baxter, G. D., Kumar, S., & Lavin, M. F. (1989). T cell receptor gene rearrangement and expression in ataxia-telangiectasia B lymphoblastoid cells. *Immunol Cell Biol*, 67 ( Pt 1), 57-62.
- Beck, A. T., Steer, R. A., Ball, R., & Ranieri, W. (1996). Comparison of Beck Depression Inventories -IA and -II in psychiatric outpatients. *J Pers Assess*, 67(3), 588-597.
- Beck, A. T., Ward, C. H., Mendelson, M., Mock, J., & Erbaugh, J. (1961). An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry*, 4, 561-571.
- Bernstein, E. M., & Putnam, F. W. (1986). Development, reliability, and validity of a dissociation scale. *J Nerv Ment Dis*, 174(12), 727-735.
- Besedovsky, H., & Sorkin, E. (1977). Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol*, 27(1), 1-12.
- Bezard, E., Yue, Z., Kirik, D., & Spillantini, M. G. (2013). Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov Disord*, 28(1), 61-70.
- Bhatia, N., Jaggi, A. S., Singh, N., Anand, P., & Dhawan, R. (2011). Adaptogenic potential of curcumin in experimental chronic stress and chronic unpredictable stress-induced memory deficits and alterations in functional homeostasis. *J Nat Med*, 65(3-4), 532-543.
- Bissette, G. (2009). Does Alzheimer's disease result from attempts at repair or protection after transient stress? *J Alzheimers Dis*, 18(2), 371-380.
- Blandini, F. (2013). Neural and immune mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8(1), 189-201.
- Blandini, F., & Armentero, M. T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*, 279(7), 1156-1166.
- Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S. (2012). Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 845618.
- Bluthe, R. M., Michaud, B., Delhaye-Bouchaud, N., Mariani, J., & Dantzer, R. (1997). Hypersensitivity of lurcher mutant mice to the depressing effects of lipopolysaccharide and interleukin-1 on behaviour. *Neuroreport*, 8(5), 1119-1122.
- Bridges, B. A., & Harnden, D. G. (1981). Untangling ataxia-telangiectasia. *Nature*, 289(5795), 222-223.

- Bugos, O., Bhide, M., & Zilka, N. (2009). Beyond the rat models of human neurodegenerative disorders. *Cell Mol Neurobiol*, 29(6-7), 859-869.
- Caddy, K. W., & Biscoe, T. J. (1975). Preliminary observations on the cerebellum in the mutant mouse Lurcher. *Brain Res*, 91(2), 276-280.
- Caddy, K. W., & Vozeh, F. (1997). The effect of 3-acetylpyridine on inferior olivary neuron degeneration in Lurcher mutant and wild-type mice. *Eur J Pharmacol*, 330(2-3), 139-142.
- Cervinkova, M., Mandakova, P., & Sima, P. (2006). Changes in proliferation activity and relative distributions of lymphoid cell subpopulations in congenitally athymic nu/nu mice and Lurcher mice with spontaneous olivopontocerebellar degeneration. *Folia Microbiol (Praha)*, 51(5), 497-505.
- Cervinkova, M., Smetana, K., Holub, M., Sima, P., & Funda, D. P. (1998). Shifts of lymphoid and phagocytic cell populations during mild cold acclimation in hairless mice. *Folia Microbiol (Praha)*, 43(5), 481-482.
- Chen, D., Guo, X., Zheng, Z., Wei, Q., Song, W., Cao, B., et al. (2015). Depression and anxiety in amyotrophic lateral sclerosis: correlations between the distress of patients and caregivers. *Muscle Nerve*, 51(3), 353-357.
- Chieppa, M. N., Perota, A., Corona, C., Grindatto, A., Lagutina, I., Vallino Costassa, E., et al. (2014). Modeling amyotrophic lateral sclerosis in hSOD1 transgenic swine. *Neurodegener Dis*, 13(4), 246-254.
- Cohen, S., Janicki-Deverts, D., Doyle, W. J., Miller, G. E., Frank, E., Rabin, B. S., & Turner, R. B. (2012). Chronic stress, glucocorticoid receptor resistance, inflammation, and disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(16), 5995-5999.
- Crabtree, D. M., & Zhang, J. (2012). Genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res Bull*, 88(1), 13-32. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.07.019
- Do Carmo, S., & Cuello, A. C. (2013). Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol Neurodegener*, 8, 37.
- Doughty, M. L., De Jager, P. L., Korsmeyer, S. J., & Heintz, N. (2000). Neurodegeneration in Lurcher mice occurs via multiple cell death pathways. *J Neurosci*, 20(10), 3687-3694.
- Du, X., Pang, T. Y., Mo, C., Renoir, T., Wright, D. J., & Hannan, A. J. (2015). The influence of the HPG axis on stress response and depressive-like behaviour in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Exp Neurol*, 263, 63-71.
- Ejaz Ahmed, M., Khan, M. M., Javed, H., Vaibhav, K., Khan, A., Tabassum, R., et al. (2013). Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Neurochem Int*, 62(4), 492-501.
- Ellrichmann, G., Reick, C., Saft, C., & Linker, R. A. (2013). The role of the immune system in Huntington's disease. *Clin Dev Immunol*, 2013, 541259. doi: 10.1155/2013/541259

- Epis, R., Gardoni, F., Marcello, E., Genazzani, A., Canonico, P. L., & Di Luca, M. (2010). Searching for new animal models of Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*, 626(1), 57-63.
- Ermak, G., Pritchard, M. A., Dronjak, S., Niu, B., & Davies, K. J. (2011). Do RCAN1 proteins link chronic stress with neurodegeneration? *FASEB J*, 25(10), 3306-3311.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E., & McHugh, P. R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, 12(3), 189-198.
- Frautschy, S. A., Yang, F., Calderon, L., & Cole, G. M. (1996). Rodent models of Alzheimer's disease: rat A beta infusion approaches to amyloid deposits. *Neurobiol Aging*, 17(2), 311-321.
- Frederic, F., Chautard, T., Brochard, R., Chianale, C., Wollman, E., Oliver, C., et al. (1997). Enhanced endocrine response to novel environment stress and endotoxin in Lurcher mutant mice. *Neuroendocrinology*, 66(5), 341-347.
- Frost, B., Hemberg, M., Lewis, J., & Feany, M. B. (2014). Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation. *Nat Neurosci*, 17(3), 357-366.
- Gaillard, R. C. (1994). Neuroendocrine-immune system interactions The immune-hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab*, 5(7), 303-309.
- Gama Sosa, M. A., De Gasperi, R., & Elder, G. A. (2012). Modeling human neurodegenerative diseases in transgenic systems. *Hum Genet*, 131(4), 535-563.
- Garcia-Mesa, Y., Lopez-Ramos, J. C., Gimenez-Llort, L., Revilla, S., Guerra, R., Gruart, A., et al. (2011). Physical exercise protects against Alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J Alzheimers Dis*, 24(3), 421-454.
- Hall, A. M., & Roberson, E. D. (2012). Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*, 88(1), 3-12.
- Harvey, B. K., Richie, C. T., Hoffer, B. J., & Airavaara, M. (2011). Transgenic animal models of neurodegeneration based on human genetic studies. *J Neural Transm*, 118(1), 27-45.
- Hassan, M., Sehgal, S. A., & Rashid, S. (2014). Regulatory cascade of neuronal loss and glucose metabolism. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 13(7), 1232-1245.
- Hemmerle, A. M., Herman, J. P., & Seroogy, K. B. (2012). Stress, depression and Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 233(1), 79-86.
- Hsiao, H. Y., & Chern, Y. (2010). Targeting glial cells to elucidate the pathogenesis of Huntington's disease. *Mol Neurobiol*, 41(2-3), 248-255.
- Jackson-Lewis, V., Blesa, J., & Przedborski, S. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1, S183-185.
- Jackson, S. P. (1995). Cancer predisposition. Ataxia-telangiectasia at the crossroads. *Curr Biol*, 5(11), 1210-1212.

- Jacobsen, J. C., Bawden, C. S., Rudiger, S. R., McLaughlan, C. J., Reid, S. J., Waldvogel, H. J., et al. Snell, R. G. (2010). An ovine transgenic Huntington's disease model. *Hum Mol Genet*, *19*(10), 1873-1882.
- Jaggi, A. S., Bhatia, N., Kumar, N., Singh, N., Anand, P., & Dhawan, R. (2011). A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurol Sci*, *32*(6), 993-1005.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *79*(4), 368-376.
- Jirásek, J. (1975). *Číselný čtverec*. Bratislava: Psychodiagnostické a didaktické testy.
- Kato, S. (2008). Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*, *115*(1), 97-114.
- Kiecolt-Glaser, J. K., Garner, W., Speicher, C., Penn, G. M., Holliday, J., & Glaser, R. (1984). Psychosocial modifiers of immunocompetence in medical students. *Psychosom Med*, *46*(1), 7-14.
- Kojis, T. L., Gatti, R. A., & Sparkes, R. S. (1991). The cytogenetics of ataxia telangiectasia. *Cancer Genet Cytogenet*, *56*(2), 143-156.
- Kotrcova, E., Jarkovska, K., Valekova, I., Zizkova, M., Motlik, J., Gadher, S. J., & Kovarova, H. (2015). Challenges of Huntington's disease and quest for therapeutic biomarkers. *Proteomics Clin Appl*, *9*(1-2), 147-158.
- Kuljis, R. O., Chen, G., Lee, E. Y., Aguila, M. C., & Xu, Y. (1999). ATM immunolocalization in mouse neuronal endosomes: implications for ataxia-telangiectasia. *Brain Res*, *842*(2), 351-358.
- Leon, W. C., Canneva, F., Partridge, V., Allard, S., Ferretti, M. T., DeWilde, A., . . . Cuello, A. C. (2010). A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*, *20*(1), 113-126.
- Levesque, S., Taetzsch, T., Lull, M. E., Kodavanti, U., Stadler, K., Wagner, A., . . . Block, M. L. (2011). Diesel exhaust activates and primes microglia: air pollution, neuroinflammation, and regulation of dopaminergic neurotoxicity. *Environ Health Perspect*, *119*(8), 1149-1155.
- Lunney, J. K. (2007). Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci*, *3*(3), 179-184.
- McGonigle, P. (2014). Animal models of CNS disorders. *Biochem Pharmacol*, *87*(1), 140-149.
- Mead, R. J., Bennett, E. J., Kennerley, A. J., Sharp, P., Sunyach, C., Kasher, P., et al. (2011). Optimised and rapid pre-clinical screening in the SOD1(G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *PLoS One*, *6*(8), e23244.
- Mitchell, J. D., & Borasio, G. D. (2007). Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, *369*(9578), 2031-2041.

- Mo, C., Renoir, T., & Hannan, A. J. (2014). Effects of chronic stress on the onset and progression of Huntington's disease in transgenic mice. *Neurobiol Dis*, *71*, 81-94.
- Nation, D. A., Hong, S., Jak, A. J., Delano-Wood, L., Mills, P. J., Bondi, M. W., & Dimsdale, J. E. (2011). Stress, exercise, and Alzheimer's disease: a neurovascular pathway. *Med Hypotheses*, *76*(6), 847-854.
- Neha, Sodhi, R. K., Jaggi, A. S., & Singh, N. (2014). Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci*, *109*(2), 73-86.
- Nijenhuis, E. R., Spinhoven, P., Van Dyck, R., Van der Hart, O., & Vanderlinden, J. (1996). The development and psychometric characteristics of the Somatoform Dissociation Questionnaire (SDQ-20). *J Nerv Ment Dis*, *184*(11), 688-694.
- Norman, D. J., Fletcher, C., & Heintz, N. (1991). Genetic mapping of the lurcher locus on mouse chromosome 6 using an intersubspecific backcross. *Genomics*, *9*(1), 147-153.
- Nowack, K. M. (2006). *Stress profile*. Praha: Testcentrum - Hogrefe.
- Obayashi, K. (2013). Salivary mental stress proteins. *Clin Chim Acta*, *425*, 196-201.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P., & LaFerla, F. M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *24*(8), 1063-1070.
- Pastore, A., & Adinolfi, S. (2014). Chronochemistry in neurodegeneration. *Front Mol Neurosci*, *7*, 20.
- Patacchioli, F. R., Monnazzi, P., Scontrini, A., Tremante, E., Caridi, I., Brunetti, E., et al. (2003). Adrenal dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Endocrinol Invest*, *26*(12), RC23-25.
- Platzer, M., Rotman, G., Bauer, D., Uziel, T., Savitsky, K., Bar-Shira, A., et al. (1997). Ataxia-telangiectasia locus: sequence analysis of 184 kb of human genomic DNA containing the entire ATM gene. *Genome Res*, *7*(6), 592-605.
- Porcelli, A. J., Lewis, A. H., & Delgado, M. R. (2012). Acute stress influences neural circuits of reward processing. *Front Neurosci*, *6*, 157.
- Ramasamy, R., Yan, S. F., & Schmidt, A. M. (2012). Advanced glycation endproducts: from precursors to RAGE: round and round we go. *Amino Acids*, *42*(4), 1151-1161.
- Ramaswamy, S., McBride, J. L., & Kordower, J. H. (2007). Animal models of Huntington's disease. *ILAR J*, *48*(4), 356-373.
- Ribeiro, F. M., Camargos, E. R., Souza, L. C., & Teixeira, A. L. (2013). Animal models of neurodegenerative diseases. *Rev Bras Psiquiatr*, *35 Suppl 2*, S82-91. doi: 10.1590/1516-4446-2013-1157
- Rivier, C., & Rivest, S. (1991). Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod*, *45*(4), 523-532.
- Schreiber, V. (1992). *Lidský stres* (1. Ed.). Praha: Academia.

- Sima, P., Cervinkova, M., Funda, D. P., & Holub, M. (1998). Enhancement by mild cold stress of the antibody forming capacity in euthymic and athymic hairless mice. *Folia Microbiol (Praha)*, 43(5), 521-523.
- Smith, D. H., Chen, X. H., Nonaka, M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Saatman, K. E., et al. (1999). Accumulation of amyloid beta and tau and the formation of neurofilament inclusions following diffuse brain injury in the pig. *J Neuropathol Exp Neurol*, 58(9), 982-992.
- Stankovic, T., Byrd, P. J., Cooper, P. R., McConville, C. M., Munroe, D. J., Riley, J. H., et al. (1997). Construction of a transcription map around the gene for ataxia telangiectasia: identification of at least four novel genes. *Genomics*, 40(2), 267-276.
- Stumm, M., Gatti, R. A., Reis, A., Udar, N., Chrzanowska, K., Seemanova, E., et al. (1995). The ataxia-telangiectasia-variant genes 1 and 2 are distinct from the ataxia-telangiectasia gene on chromosome 11q23.1. *Am J Hum Genet*, 57(4), 960-962.
- Swift, M., Reitnauer, P. J., Morrell, D., & Chase, C. L. (1987). Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med*, 316(21), 1289-1294.
- Udar, N. S., Xu, S., Bay, J. O., Dandekar, S. S., Patel, N., Chen, X., et al. (1999). Physical map of the region surrounding the ataxia-telangiectasia gene on human chromosome 11q22-23. *Neuropediatrics*, 30(4), 176-180.
- Uschold-Schmidt, N., Nyuyki, K. D., Fuchsl, A. M., Neumann, I. D., & Reber, S. O. (2012). Chronic psychosocial stress results in sensitization of the HPA axis to acute heterotypic stressors despite a reduction of adrenal in vitro ACTH responsiveness. *Psychoneuroendocrinology*, 37(10), 1676-1687.
- Venkova, K., Christov, A., Kamaluddin, Z., Kobalka, P., Siddiqui, S., & Hensley, K. (2014). Semaphorin 3A signaling through neuropilin-1 is an early trigger for distal axonopathy in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 73(7), 702-713.
- Vernet-der Garabedian, B., Lemaigre-Dubreuil, Y., Delhaye-Bouchaud, N., & Mariani, J. (1998). Abnormal IL-1beta cytokine expression in the cerebellum of the ataxic mutant mice staggerer and lurcher. *Brain Res Mol Brain Res*, 62(2), 224-227.
- Vogel, M. W., Sunter, K., & Herrup, K. (1989). Numerical matching between granule and Purkinje cells in lurcher chimeric mice: a hypothesis for the trophic rescue of granule cells from target-related cell death. *J Neurosci*, 9(10), 3454-3462.
- Watters, D., Khanna, K. K., Beamish, H., Birrell, G., Spring, K., Kedar, P., et al. (1997). Cellular localisation of the ataxia-telangiectasia (ATM) gene product and discrimination between mutated and normal forms. *Oncogene*, 14(16), 1911-1921.
- Wetts, R., & Herrup, K. (1983). Direct correlation between Purkinje and granule cell number in the cerebella of lurcher chimeras and wild-type mice. *Brain Res*, 312(1), 41-47.



- Yan, S. F., Ramasamy, R., & Schmidt, A. M. (2010). Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol*, 79(10), 1379-1386.
- Yang, D., Wang, C. E., Zhao, B., Li, W., Ouyang, Z., Liu, Z., et al. (2010). Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum Mol Genet*, 19(20), 3983-3994.
- Yang, S. H., Cheng, P. H., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J. J., Cheng, E. C., et al. (2008). Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature*, 453(7197), 921-924.
- Zuccato, C., Valenza, M., & Cattaneo, E. (2010). Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease. *Physiol Rev*, 90(3), 905-981.
- Zuo, J., De Jager, P. L., Takahashi, K. A., Jiang, W., Linden, D. J., & Heintz, N. (1997). Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature*, 388(6644), 769-773.

## 6 Seznam použitých zkratek

ACTH – adrenokortikotropní hormon (z angl. adrenocorticotropic hormone)

AD – autozomálně dominantní

ALS – Amyotrofická laterální skleróza

AN – Alzheimerova nemoc

APP – protein, který je podkladem pro tvorbu amyloidu (z angl. amyloid precursor protein)

ATP – adenosin trifosfát

CNS – centrální nervový systém

CRH – kortikotropin uvolňující hormon (z angl. corticotropine releasing hormone)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

HCH – Huntingtonova choroba

HPA – hypothalamo-pituitárně-adrenální

HPG – hypothalamo-pituitárně-gonadální

IL – interleukin

NEI – neuro-endokrino-imunitní

PN – Parkinsonova nemoc

*Poznámka: zkratky v názvech jednotlivých myších modelů uváděny nejsou, protože vzhledem k účelu práce nemají hlubší význam.*