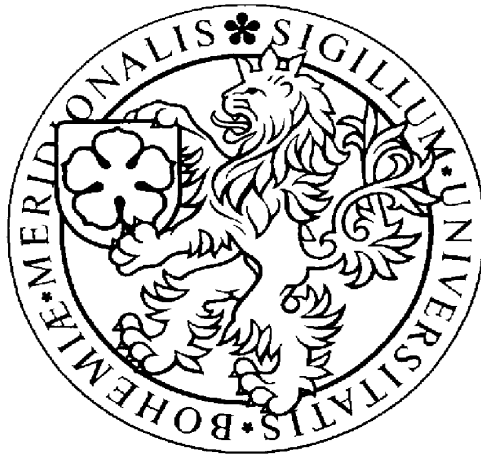


BIOLOGICKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



Bakalářská diplomová práce

**INDIKACE STRESOVÉHO STAVU POMOCÍ ZMĚN
HLADINY STEROIDNÍCH HORMONŮ**

Marie Heczková

2007

Vedoucí práce: prof. RNDr. L. Janský, DrSc.

Bakalářská diplomová práce

Heczková M., 2007: Indikace stresového stavu pomocí změn hladiny steroidních hormonů. [Glucocorticoids as indicators of the stress state.] – 23 str.

Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

Effects of whole body and local cold water immersion on salivary cortisol content was examined. Cortisol content in saliva began to increase 15 min after cold water immersion and declined immediately after the end of cooling. Whole body immersion increased cortisol content by 135 %, while immersion of legs increased cortisol content by 80 %.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

.....

Marie Heczková

V Českých Budějovicích 7. 5. 2007

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala všem, kteří mi pomohli vypracovat tuto práci. Děkuji prof. L. Janskému, za odborné vedení a personálu Odd. steroidních hormonů Endokrinologického ústavu v Praze za pomoc při stanovení vzorků, zejména pak Mgr. L. Křížovi za uvedení do metodiky. Děkuji také všem, kteří mi radami a milým slovem pomohli zachovat klid a rozvahu. Díky Vám.

1	ÚVOD	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1	OSA HYPOTHALAMUS – HYPOFÝZA – NADLEDVINY	2
2.2	STEROIDNÍ ODPOVĚĎ NA CHLADOVÝ STRES	4
2.3	ANALÝZA HORMONŮ VE SLINÁCH	6
3	CÍL PRÁCE	8
4	MATERIÁL A METODY	9
4.1	USPOŘÁDÁNÍ EXPERIMENTŮ	9
4.2	STANOVENÍ KORTIZOLU	10
4.3	STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	12
5	EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY	13
5.1	OVĚŘENÍ DENNÍHO RYTMU	13
5.2	CELOTĚLOVÉ CHLAZENÍ PŘI TEPLOTĚ LÁZNĚ 11°C PO DOBU 30 MINUT	13
5.3	CELOTĚLOVÉ CHLAZENÍ PŘI TEPLOTĚ LÁZNĚ 11°C PO DOBU 45 MINUT	13
5.4	LOKÁLNÍ CHLAZENÍ DOLNÍCH KONČETI) PŘI TEPLOTĚ LÁZNĚ 14°C PO DOBU 20 MINUT.....	15
5.5	LOKÁLNÍ CHLAZENÍ DOLNÍCH KONČETIN PŘI TEPLOTĚ LÁZNĚ 11°C PO DOBU 30 MINUT.....	15
5.6	SROVNÁNÍ CELOTĚLOVÉHO A LOKÁLNÍHO CHLAZENÍ	16
6	DISKUZE	17
7	ZÁVĚR	19
8	POUŽITÁ LITERATURA	20
9	PŘÍLOHY	23

1 ÚVOD

Pokud na organismus působí nějaký stresový podnět, ať už fyzického nebo psychického charakteru, dochází k víceméně stereotypní, nespecifické reakci, kterou Selye nazval „the general adaptation syndrome“ (Tsigos a ost., 2002). Tato odpověď zahrnuje aktivaci humorální osy (hypothalamus – hypofýza – nadledviny) projevující se zvýšením hladiny glukokortikoidů (kortizolu) v krvi.

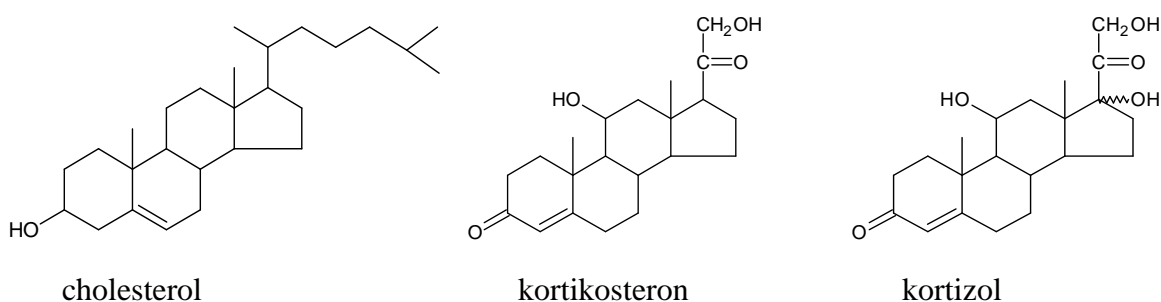
Protože je při studiu stresových stavů důležité brát ohled na sílu stresového podnětu, je nutné zvolit druh stresoru, který se dá snadno dávkovat a měřit. Těmto požadavkům velmi dobře vyhovují změny teploty prostředí, například působení chladu. Proto bylo v mých pokusech použito chladových podnětů různé intenzity a délky – jmenovitě ponoření různě velkých ploch povrchu lidského těla do studené vody o různé teplotě (14°C a 11°C), na různě dlouhou dobu.

Ke sledování změn aktivity humorální osy v průběhu chladového zatížení lidského organismu bylo nutné použít neinvazivní způsob odběru vzorků. Z tohoto důvodu byla zvolena metoda měření koncentrace glukokortikoidů ve slinách, čímž také byl umožněn rychlý sled odběru vzorků.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Osa hypothalamus – hypofýza – nadledviny

Finálními efekty stresové osy hypothalamus – hypofýza – nadledviny jsou glukokortikoidy (GC). Jedná se o steroidy vylučované kůrou nadledvin (*zona fasciculata* a *z. reticularis*). Hlavním lidským glukokortikoidem je kortizol, u některých živočichů ale převládá kortikosteron – viz obr. č. 1. Společným prekursorem, stejně jako pro ostatní adrenální steroidy (mineralokortikoidy, androgeny), je cholesterol (Murray a ost., 1998).



Obrázek č. 1: Chemická struktura cholesterolu, kortikosteronu a kortizolu. (Převzato a upraveno dle Murray a ost., 1998)

2.1.1 Syntéza glukokortikoidů

Cholesterol pro syntézu GC je většinou vychytáván z plasmy, ale malá část se syntetizuje v adrenokortikálních buňkách z acetátu. Je uschován v esterifikované formě v tukových kapénkách a při jeho potřebě je hydrolyzován na volný, přenesen do mitochondrií a přeměněn na pregnenolon odštěpením postranního řetězce (Ganong, 1999). Tyto kroky jsou společné pro syntézu všech adrenálních steroidů. Tvorba kortizolu dále probíhá sérií tří reakcí, při nichž hydroxylázy postupně přidávají hydroxyly na pozice C₁₇, C₂₁ a C₁₁. Při těchto krocích probíhá opakovaný přesun substrátu do mitochondrií a do cytoplasmy (Murray a ost., 1998).

2.1.2 Sekrece, transport a metabolismus glukokortikoidů

Steroidní hormony se dostávají do oběhu téměř ihned po jejich syntéze. Za normálních okolností nastává uvolňování kortizolu periodicky a je regulováno denním rytmem sekrece hypofýzárního adrenokortikotropního hormonu (ACTH). Uvolňování ACTH je řízeno kortikotropin releasing hormon (CRH) z hypothalamu. Do něj vedou vlákna ze suprachiasmatických jader, jež přenášejí podněty pro denní rytmy. Vedle fyzické stresové

zátěže (včetně pocitů bolesti) se do hypothalamu přenášejí i emoční stresy přes limbický systém. To vše vede k uvolnění CRH a následnému zvýšení hladiny ACTH a kortizolu. Vylučování CRH, ale i ACTH je také ovlivněno negativní zpětnou vazbou samotným kortizolem.

Glukokortikoidy v plazmě cirkulují ve dvou formách – vázané na bílkoviny a volné. Hlavním plazmatickým vazebným proteinem kortizolu je transkortin (kortikosteroid vázající globulin – CBG) a v menší míře i albumin. Volná frakce kortizolu (nevázaná na bílkoviny) činí asi 8 % z celkového množství a představuje jejich biologicky účinnou frakci - novější studie však prokázaly, že i po navázání transkortinu na membránový receptor dojde ke zvýšené tvorbě cAMP v buňce (Breuner a Orchinik, 2002). Podíl volné frakce kortizolu v krvi se může v některých případech (např. v zanícených tkáních) zvýšit uvolněním steroidu z transkortinu, nebo může dojít k lokálnímu ovlivnění exprese transkortinu v hypofýze (Buckingham, 2006).

Hlavním místem katabolismu GC jsou játra, kde se většina kortizolu redukuje na dihydro- a následně tetrahydrokortizol. Navíc probíhá konjugace s glukuronovou kyselinou a v menší míře i se sulfátem. Další možnou degradační dráhou je jeho přeměna na kortizon, ta ale probíhá jen v přítomnosti enzymu 11- β -hydroxysteroid-dehydrogenázy. Kortizon také podléhá redukcii a konjugaci na glukuronid. Takto upravené GC (již biologicky neaktivní) jsou více hydrofilní, takže mohou být snáze vyloučeny z těla. Asi 70 % se vyloučí močí, 20 % stolicí a zbytek kůží.

2.1.3 Účinky glukokortikoidů

Za nejvýznamnější účinky GC jsou považovány (Beck a McGarry, 1962):

➤ **ovlivnění intermediálního metabolismu**, zvláště cukrů, ale i tuků a bílkovin – jedná se hlavně o proteokatabolismus (vznik aminokyselin jako substrátu pro glukoneogenezi) a následné zvýšení jaterní glykogenozy a glukoneogenezy (hlavně zvýšením aktivity potřebných enzymů); GC také zvyšují plazmatickou hladinu volných mastných kyselin snížením lipogenezy v játrech a naopak zvýšením lipolýzy v periférii,

➤ **potlačení imunitní reakce** – snižují počty lymfocytů (vyvolávají jejich druhově i buněčně specifickou lýzi) – a **zánětlivých reakcí** snížením počtu basofilních a eosinofilních leukocytů v krvi, inhibicí proliferace leukocytů a indukci tvorby lipokortinů (což vede k útlumu tvorby prostaglandinů a leukotrienů),

Glukokortikoidy také pomáhají udržet normální krevní tlak a srdeční výdej, podílejí se na udržení normální rovnováhy vody a elektrolytů, zřejmě omezováním sekrece ADH a

zvýšením hladiny angiotenzinu a spolu s katecholaminy jsou nezbytnou součástí systému odpovídajícího za **rezistenci vůči stresu** – zde se projevuje hlavně permisivní účinek na katecholaminy: GC jsou nezbytné pro jejich kalorigenní a lipolytický účinek (volné mastné kyseliny jsou důležitým zdrojem energie při zátěži), rovněž zvyšují citlivost hladkých svalů cév na adrenalin a noradrenalin.

Glukokortikoidy tedy svými rozličnými účinky pomáhají udržovat vnitřní rovnováhu organismu a umožňují mu připravit se, odpovídat a zvládat fyzický i emoční stres (Sapolsky a ost., 2000).

2.1.3.1 Molekulární mechanismy účinku glukokortikoidů

Steroidní hormony jsou lipofilní, proto mohou volně difundovat přes membrány do cytoplasmy, kde se spojí se svým receptorem a ovlivňují buněčné děje, většinou ovlivněním exprese genů (Alberts a ost., 1998).

Glukokortikoidový receptor (GR) je umístěn v cytoplazmě buněk a je řazen do skupiny jaderných receptorů (Prigent a ost., 2004). Po navázání kortizolu disociuje z multiproteinového komplexu, dimerizuje se a vstupuje do jádra, kde se naváže na transkripční faktory a enhancery. Tím dojde k aktivaci či represi specifických genů a následně se mění syntéza bílkovin v buňce.

Kromě tohoto účinku, trvajících většinou hodiny až dny, mají GC i účinky nengenomové, ke kterým využívají membránové receptory. Ty mohou být buďto modifikované jaderné GR (Lösel a ost., 2003, Wehling & Lösel, 2006), nebo membránové receptory spadající do jiných rodin (působící aktivaci druhých posílů v buňce).

2.2 Steroidní odpověď na chladový stres

V dostupné literatuře se vyskytuje poměrně málo informací o změnách hladiny GC v krvi u lidí vystavených chladu. Pokusy, při nichž byli lidé vystaveni chladovým podnětům, se lišily ve svých provedeních, ať už se jednalo o denní dobu pokusů, použitý stresor (voda a vzduch) nebo intenzitu podnětu (použitá teplota, délka chladové expozice a plocha těla vystavovaná chladu). Výsledky těchto experimentů se liší. Oproti očekávání byl nejčastěji zaznamenán lehký pokles či žádná změna ve vylučování kortizolu, jen v několika případech došlo ke zvýšení jeho hladiny v krvi.

Aby odlišil vliv samotného ponoření do vody od vlivu chladu, provedl Šrámek a ost. (2000) pokus, jenž se zabýval odpověďmi mladých mužů při jejich ponoření do vody o různé teplotě (32°C, 20°C a 14°C) po dobu jedné hodiny. Vzorky krve byly odebírány před

započetím chlazení, v polovině a na konci chlazení a hodinu po skončení chlazení. Výsledek studie prokázal signifikantní pokles plazmatického kortizolu v čase, a to jak v případě termoneutrální, tak chladné vody. Vzhledem k tomu, že pokus byl proveden v dopoledních hodinách, přičítali autoři tento pokles běžnému dennímu rytmu vylučování kortizolu.

Goldstein-Golaire a ost. (1970) ve své studii vystavili 13 lidí (mužů i žen) chladnému vzduchu (4°C) na dobu 2 hodin. Krevní vzorky byly odebírány v intervalech -30, 0 (začátek pobytu v chladném prostředí), 15, 30, 60, 120 (konec chladové expozice) a 240 minut. V 15. minutě došlo ke vzrůstu koncentrace plazmatického kortizolu, který nebyl průkazný, o 15 minut později ale došlo k signifikantnímu poklesu koncentrace kortizolu. Hodnoty koncentrace kortizolu v kontrolním pokusu (bez chlazení) se nelišily od hodnot získaných při chlazení.

Leppäluoto a ost. ve své práci z roku 1988 dospěli k obdobnému výsledku. Koncentrace plazmatického kortizolu byla na konci dvouhodinového pobytu v místnosti s 10°C u 15 mužů z 20 průkazně nižší než před zahájením pobytu v chladném prostředí. Autoři však porovnávali pouze hodnoty před expozicí chladu a po jejím skončení, takže nejsou známy případné změny v koncentraci hormonu v průběhu pokusu.

V experimentu provedeném Wilsonem a ost. (1970) byli probandi vystavováni chladnému vzduchu o teplotě -5°C až +2°C po dobu tří hodin. Vyplývá z nich, že ačkoli krátce po započatí chlazení došlo ke slabému poklesu koncentrace kortizolu v plasmě, po zbytek pobytu v chladné místnosti zůstávala tato hodnota nezměněna – na rozdíl od poklesu zaznamenaného v tutéž denní dobu týmiž pokusnými osobami v kontrolním dni (teplota prostředí byla 23°C), který odpovídá dennímu rytmu.

Podobná data poskytuje i studie Witterta a ost. (1992), zkoumající vliv chladového stresu mj. na systém hypofýza-nadledviny. Opět nebyla zjištěna žádná signifikantní změna během 30 minutového vystavení chladnému vzduchu o teplotě 4°C až 5°C.

Také Šimečková a ost. (2000) prokázala, že ponoření do vody o teplotě 12,5°C na dobu jedné hodiny nemělo vliv na hladinu kortizolu v krvi. Krevní vzorky byly odebrány na začátku, uprostřed a po skončení pokusu. Tyto výsledky tedy naznačují, že u lidí chladový podnět většinou nevede ke zvýšení hladiny kortizolu v krvi.

Následující autoři však ve svých studiích zvýšení hladiny kortizolu na chladový podnět prokázali. Wilkerson a ost. (1974) sledovali hormonální odpověď na chladový stres o různé intenzitě (teploty vzduchu při pokusech byly: 28, 25, 20, 15, 10 a 5°C) po dobu 2 hodin. Vzorky byly odebírány v dopoledních hodinách a v častých intervalech (každých 10 minut během první hodiny a každých 15 minut během druhé hodiny). Při 15°C zaznamenali snížení

koncentrace plazmatického kortizolu v souladu s denním rytmem, ale v průběhu druhé hodiny chladové expozice hodnoty pomalu rostly až k hodnotám před začátkem chlazení. Při vystavení 10°C došlo u jednoho ze subjektů k prudkému vzestupu koncentrace kortizolu během druhé hodiny pokusu. Data získána po expozici v 5°C zahrnovala výsledky pouze jednoho subjektu, kde koncentrace kortizolu stoupala v průběhu celých dvou hodin.

Zvýšenou sekreci kortizolu zaznamenal také Hiramatsu a ost. (1984), a to jak během expozice osmi mladých mužů, kteří se přemístili po jedné hodině v místnosti s pokojovou teplotou 22°C do místnosti s 4°C na dobu jedné hodiny, tak v pokusu, v němž osm probandů po jedné hodině v místnosti s pokojovou teplotou ponořili ruce do studené vody (0°C) na dobu deseti minut.

2.3 Analýza hormonů ve slinách

Ve všech výše uvedených experimentech byla pro stanovení steroidů využita krevní plazma. Vzhledem k tomu, že samotný odběr krve je stresujícím faktorem, nelze vyloučit negativní vliv tohoto způsobu získávání materiálu na přesnost výsledků měření.

V mých pokusech byly použity jako materiálu k analýzám hormonů sliny, hlavně proto, že tato metoda odběru vzorků je neinvazivní a neovlivňuje míru stresu v průběhu pokusu.

Produkty metabolismu se mohou do slin dostávat různými způsoby (Lac G. 2001): pasivní difúzí, ultrafiltrací plasmy přes těsné spoje epiteliálních buněk slinných žláz, či exsudací plasmy v ústní dutině a nakonec aktivní sekrecí samotnými slinnými žlázami. V případě steroidních hormonů, což jsou malé lipofilní molekuly, se jedná o prostou difúzi (Vining a ost. 1987).

Stanovení kortizolu ve slinách má tyto výhody:

- snadný sběr vzorků, ke kterému není zapotřebí školeného zdravotnického personálu a kterou může provádět i pokusná osoba,
- není potřeba separovat sérum,
- odráží biologickou aktivitu hormonu, protože odráží hladinu volné frakce hormonu v krvi,
- umožňuje odebírat vzorky častěji než v případě odběru krve a sledovat tak detailní změny hladiny hormonu v průběhu pokusu.

Relativní nevýhodou stanovení hormonů ve slinách je požadavek vysoké citlivosti analytické metody. Hladina kortizolu, a steroidních hormonů obecně, se ve slinách pohybuje v řádech jednotek procent (tradičně se udává 1-10%) celkové plazmatické koncentrace. Jako další

nevýhody lze uvést: počáteční odpor probandů vůči odběru vzorků slin, který je však pouze dočasný a metabolická konverze hormonů slinnými žlázami – ty obsahují 11- β -hydroxysteroid dehydrogenázu typu II, která přeměňuje kortizol na kortizon. Častou námitkou proti stanovení hormonů ve slinách je ovlivnění jejich koncentrace rychlostí průtoku slin – tato rychlost totiž ovlivňuje pH slin a tím i koncentraci mnoha hormonů. Vining a ost. (1983) však prokázali, že i když je koncentrace konjugovaných hormonů a některých nekonjugovaných steroidů (např. kortizonu) závislá na rychlosti průtoku slin, koncentrace kortizolu takto ovlivněna není.

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zjistit, zda jsou glukokortikoidy i u lidí vhodným indikátorem stresového stavu vyvolaného chladovým podnětem různé intenzity a zjistit časový průběh pozorovaných změn v koncentraci kortizolu ve slinách.

Pro tento účel byly provedeny pokusy s chlazením lidí, které se lišily velikostí chlazené plochy těla, teplotou chladicí lázně a také dobou působení chladového podnětu.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Uspořádání experimentů

Bylo provedeno pět sérií pokusů:

- ověření denního rytmu kortizolu,
- lokální chlazení dolních končetin při 14°C po dobu dvaceti minut,
- lokální chlazení dolních končetin při 11°C po dobu třiceti minut,
- celotělové chlazení při 11°C po dobu 30 minut,
- celotělové chlazení při 11°C po dobu 45 minut.

4.1.1 Ověření denního rytmu kortizolu

Pro ověření denního rytmu kortizolu jsem provedla pokus se čtyřmi pokusnými osobami, které poskytly vzorky slin pro analýzu kortizolu v denních hodinách 6, 10, 14, 18 a 22 po dobu dvou dnů.

4.1.2 Lokální chlazení při 14°C

Tento pokus byl proveden se 6 probandy, jejichž charakteristiky jsou uvedeny v tabulce č. 2. Denní doba začátku pokusu byla 11 až 13 hodin, samotný pokus trval hodinu. Prvních dvacet minut pokusu seděli probandi v letním oblečení v klidu na židli, poté na dvacet minut ponořili nohy po kolena do vody o teplotě 14°C a po skončení chlazení pokračoval odběr vzorků slin ještě dalších dvacet minut (viz tabulka č. 1). Někteří probandi však před začátkem pokusu absolvovali krátké fyzické cvičení.

4.1.3 Celotělová a lokální chlazení při 11°C

Pro tyto pokusy platí jednotnější podmínky. Zúčastnilo se jich 9 různých probandů. Základní charakteristiky pokusů a podmínek, za nichž se pokusy konaly, shrnuje tabulka č. 1, charakteristiky probandů jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Patnáct až dvacet minut před zahájením pokusu se probandi svlékli do plavek a seděli na židli, teplota v místnosti byla 24°C. Aby byl co nejvíce eliminován vliv denního rytmu, byly všechny pokusy zahájeny v 15:00. Prvních dvacet minut pokusu seděli probandi v klidu na židli, ve dvacáté minutě pokusu se ponořili po prsa (celotělové chlazení) nebo po kolena (lokální chlazení) do vody o teplotě 11°C, kde v sedě setrvali půl hodiny resp. 45 minut (viz tab.č.1). V padesáté, resp. v pětadesáté (v případě 45 minutového chlazení) minutě pokusu

bylo chlazení ukončeno a probandi se přemístili zpět na židle mimo vanu. Odběry vzorků pokračovaly ještě dalších dvacet, resp. 25 minut.

Vzorky slin byly odebírány do plastových laviček (5 ml, Kartell, Italy), v průběhu experimentů dávány do nádoby s ledem, po skončení pokusů byly okamžitě zmrazeny při -18°C . Analýza vzorků proběhla v Endokrinologickém ústavu v Praze. Vzorky byly přepravovány s tepelnou izolací, nízká teplota během přepravy byla zajištěna mrazíci vložkami.

Tabulka č. 1: Charakteristika pokusů a podmínek pokusů chlazení

Typ chlazení	Doba chlazení	Teplota vody	Teplota vzduchu
celotělové (1)	45 min	11°C	24°C
celotělové (2)	30 min	11°C	24°C
lokální (3)	30 min	11°C	24°C
lokální (4)	20 min	14°C	

Tabulka č. 2: Charakteristika probandů

Typ chlazení	Počet probandů	Věk \pm SE	Váha [kg] \pm SE	Výška [cm] \pm SE
1	4	$21,8 \pm 0,41$	$94,8 \pm 7,44$	$187,0 \pm 2,32$
2	7	$22,1 \pm 0,65$	$83,3 \pm 5,58$	$181,7 \pm 2,48$
3	5	$21,8 \pm 0,44$	$84,8 \pm 6,68$	$182,0 \pm 3,01$
4	6	$21 \pm 0,40$	$70,14 \pm 3,20$	

4.2 Stanovení kortizolu

4.2.1 Příprava protilátky a její imobilizace

Pro stanovení kortizolu ve slinách byla použita polyklonální králičí protilátka. Imunogenem byl konjugát kortizol-3-karboxymethyloxim:BSA, připravený dvoufázovou syntézou (Erlanger a ost., 1959). Poměr steroid – albumin byl experimentálně stanoven na 8:1.

Pro imobilizaci protilátky byly použity polystyrénové zkumavky (5 ml, Grenier Bio-One, Germany). Do jednotlivých zkumavek bylo přidáno po 1 ml roztoku protilátky v 50 mM

uhličitanovém pufru (pH = 9.0) o výsledné koncentraci 8 µg/ml. Směs byla inkubována za třepání 120 min při 22°C.

Po odsátí roztoku protilátky byla neobsazená vazebná místa zablokována 1 ml roztoku kaseinu (4 µl.ml⁻¹) ve 20 mM fosfátovém pufru (pH = 7). Adsorpce probíhala po dobu 120 minut při 22°C.

4.2.2 Radioligand

Pro přípravu radioligandu byla použita dvoufázová metoda (Stanczyk a Goebelsman, 1981), značení proběhlo pomocí Na¹²⁵I. Vzniklý produkt je směs kortizol-3-karboxymethyloxim-L-tyrosinmethylesterů jodidovaných jedním nebo dvěma radioaktivními jódů v polohách ortho-. K purifikaci produktu byla použita chromatografie na tenké vrstvě (Bičíková a ost., 1987) v systému benzen:methanol:kyselina octová v objemovém poměru 75:24:1. Specifická radioaktivita získaného produktu činila 120 TBq.mol⁻¹. (Bičíková a ost. 1987).

4.2.3 Kalibrační křivka

Pro přípravu standardních roztoků byl použit roztok kortizolu a ředícího pufru, výsledná koncentrace kortizolu v kalibrační řadě je: 0.00, 0.6, 1.5, 3, 6, 12, 24 a 48 nmol.l⁻¹ (Bičíková a ost., 1987)

4.2.4 Radioimunoanalýza

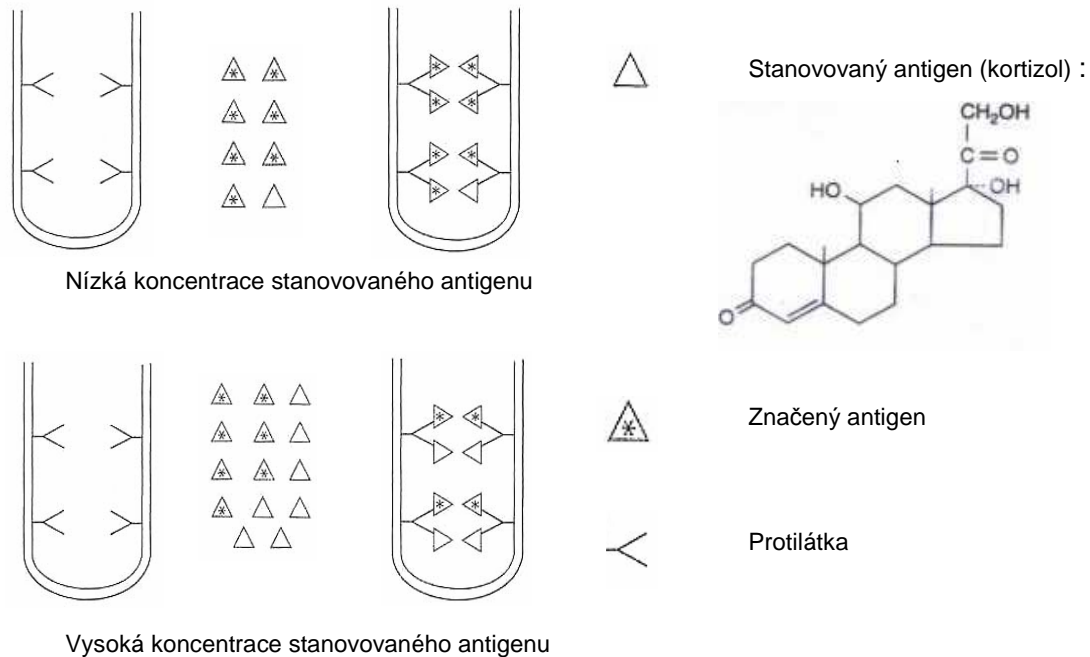
Tato metoda umožňuje přesně stanovit koncentraci různých antigenních látek, virů ap. nebo protilátek v tělesných tekutinách, zejména v krvi, za použití imunologických metod. Je druhem saturační analýzy. Při radioimunoanalýze se využívá možnost značit protilátky (nebo některé antigeny) radioaktivním atomem, případně skupinou. Značené ligandy poté soutěží se stanovovaným antigenem o vazebná místa na protilátkách, imobilizovaných na stěně zkumavky nebo jamky mikrotitrační destičky (obr. č. 2). Zachycená radioaktivita je potom nepřímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu. Umožňuje stanovovat některé látky o velmi nízkých koncentracích (pg.ml⁻¹).

4.2.4.1 Postup

Vzorky slin se nechaly roztát a centrifugovaly se při 2000g. Do mikrozkuvek se pipetovalo 250 µl slin a 250 µl citrátosfátového pufru (0,1 M)

Stanovení probíhalo na analyzátoru Stratec (Germany). Pro analýzu bylo odebráno 150 µl zředěného roztoku slin a společně se 150 µl radioligandu a 500 µl citrátosfátového pufru

přeneseny do zkumavek s imobilizovanou protilátkou. Inkubace probíhala 120 minut při 22°C. Poté byl obsah zkumavek dekantován a byla změřena zbytková radioaktivita.



Obrázek č. 2: Princip radioimunoanalýzy (Převzato (a upraveno) ze stránek www.austincc.edu/kotrla/serImmunoassays.ppt)

4.3 Statistické zpracování výsledků

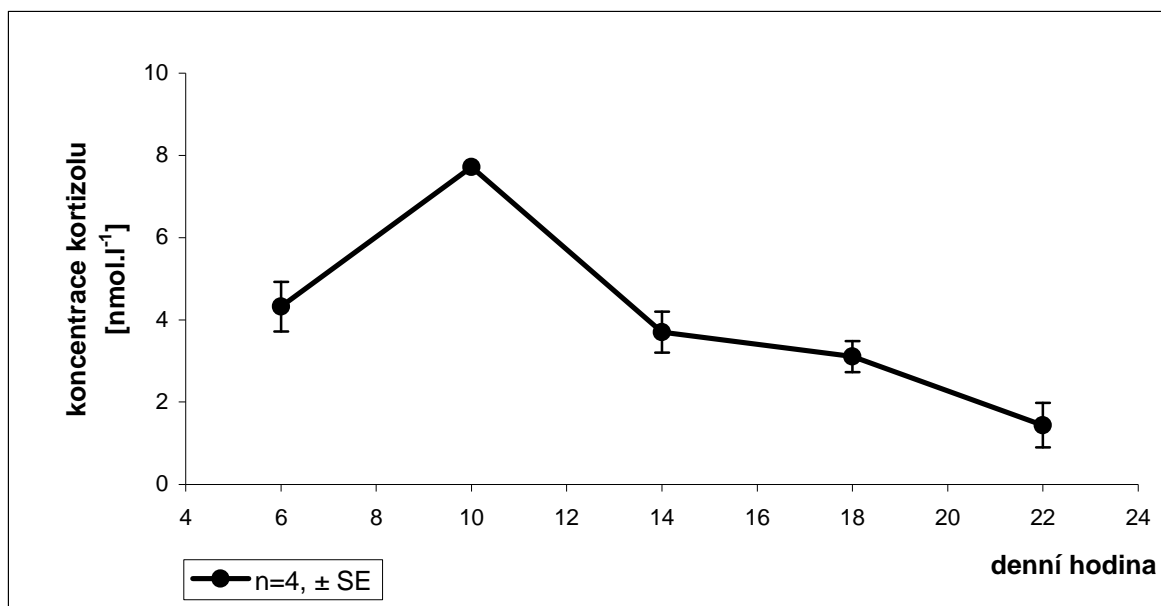
Data získaná při celotělovém pětáctyřicetiminutovém chlazení nebyla statisticky testována, z důvodu malého množství pozorování. Rovněž data pro ověření denního rytmu nebyla testována.

Ostatní výsledky byly testovány takto: Data získaná při celotělovém třicetiminutovém chlazení byla testována párovým t-testem (vždy každá minuta po započítí chlazení oproti dvacáté minutě pokusu). Data získaná při lokálním chlazení byla testována nepárovým t-testem (hodnoty po 20. minutě pokusu oproti hodnotám před chlazením).

5 EXPERIMENTÁLNÍ VÝSLEDKY

5.1 Ověření denního rytmu

Tímto pokusem byla ověřena použitelnost stanovení kortizolu ve slinách. Klidové hodnoty kortizolu se pohybovaly mezi 2 až 8 nmol.l⁻¹. Byl zaznamenán dopolední nárůst hladiny kortizolu a její odpolední pokles, zmírňující se mezi 14. a 18. hodinou (obr. č. 3).



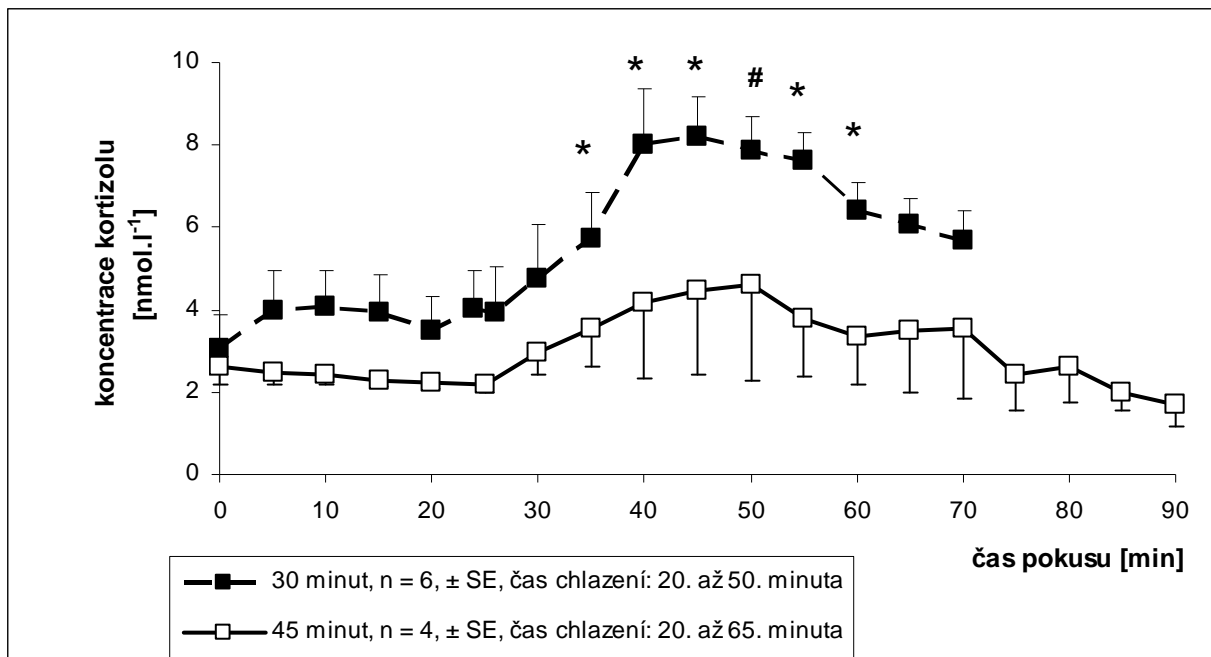
Obrázek č. 3 Denní rytmus vylučování kortizolu. (SE je střední chyba průměru.)

5.2 Celotělové chlazení při teplotě lázně 11°C po dobu 30 minut

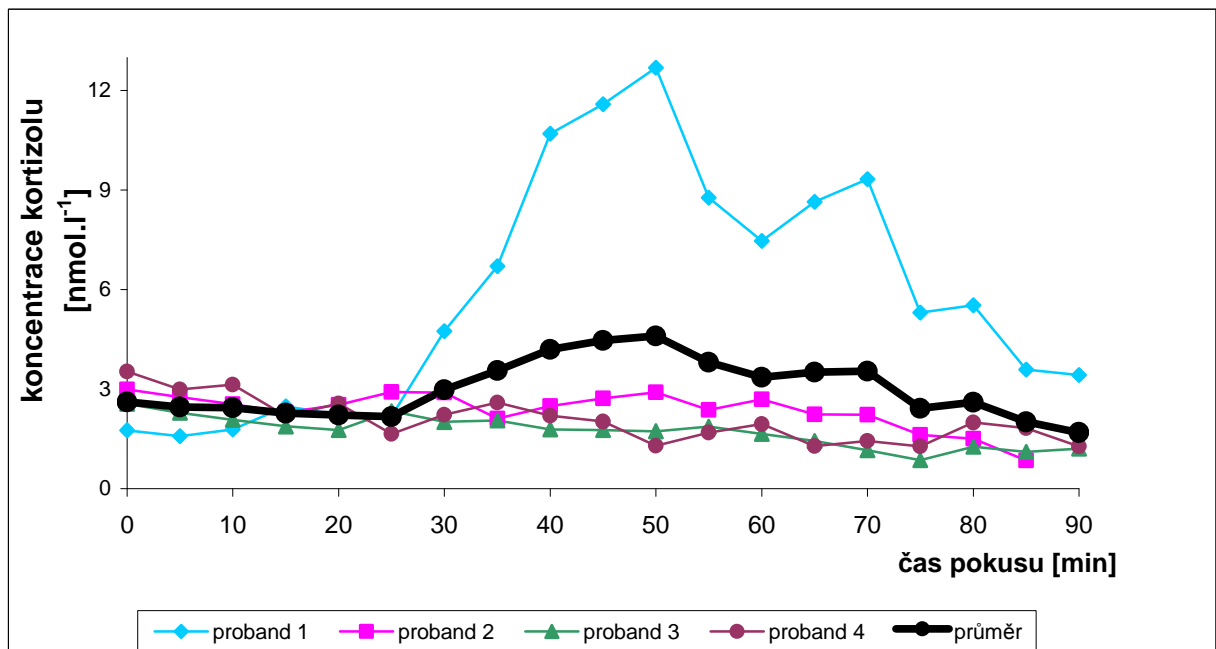
Během třicetiminutového chlazení došlo k průkaznému zvýšení hladiny kortizolu (obr. 4). Hladina kortizolu se začala zvyšovat od 15. minuty chlazení, maxima dosáhla v 25. minutě chlazení (45. minuta pokusu), kdy vzrostla o 135 % oproti 20. minutě pokusu, a po ukončení chlazení začala hladina kortizolu plynule klesat.

5.3 Celotělové chlazení při teplotě lázně 11°C po dobu 45 minut

V průběhu pětáctyřicetiminutového chlazení došlo k navýšení hladiny kortizolu u jednoho ze čtyř probandů. U ostatních probandů nedošlo vůbec k žádné změně hladiny kortizolu (obr. č. 5). Důvodem mohl být výběr pokusných osob, které již měly s podobnými podmínkami zkušenosti a uplatnily se u nich adaptační mechanismy (probandi č. 3 a č. 4.).



Obrázek č. 4: Časový průběh změn v obsahu kortizolu ve slinách během celotělového chlazení po různě dlouhou dobu. 30 minutové chlazení je zobrazeno plnými čtverci (n = 6), 45 minutové chlazení prázdnými čtverci (n = 4). Pro testování dat získaných při 30 minutovém chlazení byl použit párový t-test. * - hodnota je vyšší než ve dvacáté minutě, $p < 0,5$; # - hodnota je vyšší než ve dvacáté minutě $p < 0,01$. (SE je střední chyba průměru.)



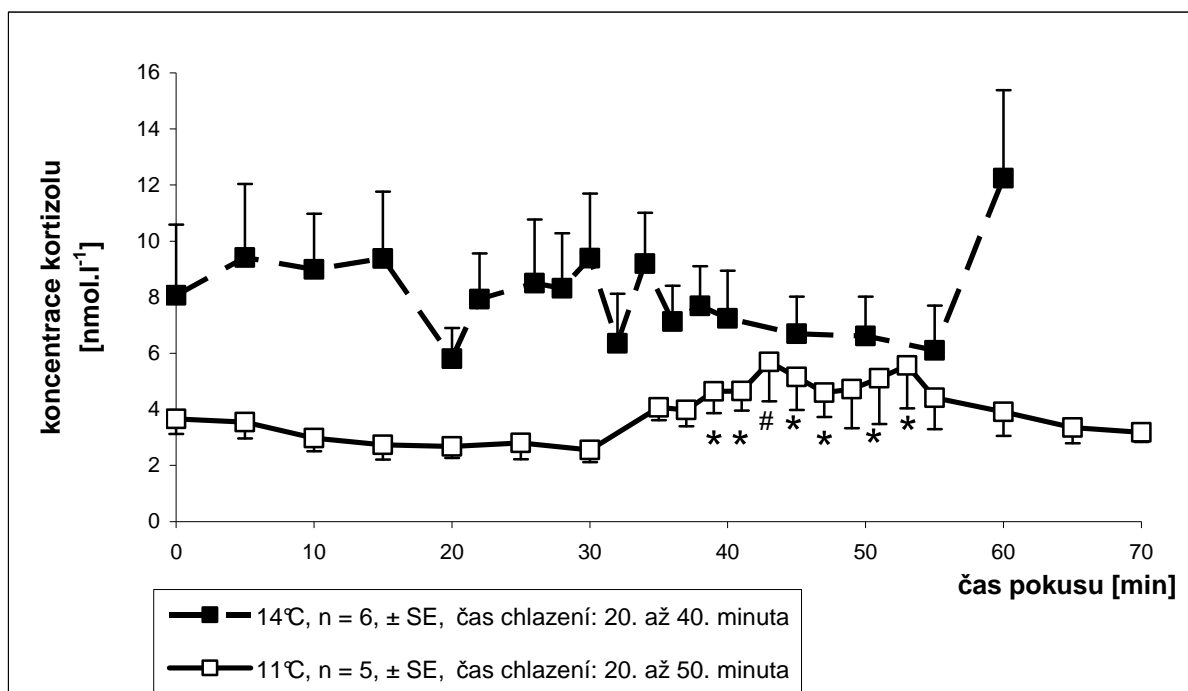
Obrázek č. 5: Časový průběh změn v obsahu kortizolu ve slinách během pětáctyřicetiminutového chlazení při 11°C. Změny byly zaznamenány u 4 probandů před chlazením (0. až 20. minuta), v průběhu (20. až 65. minuta) a po skončení chlazení (65. až 90. minuta). Černá linie je průměrná hodnota.

5.4 Lokální chlazení dolních končetí při teplotě lázně 14°C po dobu 20 minut

Při lokálním chlazení dolních končetin s teplotou lázně 14°C trvající 20 minut nedošlo k žádnému nárůstu hladiny kortizolu (obr. č. 6). Vyšší, až dvojnásobné hodnoty koncentrací kortizolu při jednotlivých odběrech oproti pokusu s lokálním chlazením dolních končetin při 11°C jsou zřejmě dány podmínkami při pokusu – viz metodika.

5.5 Lokální chlazení dolních končetin při teplotě lázně 11°C po dobu 30 minut

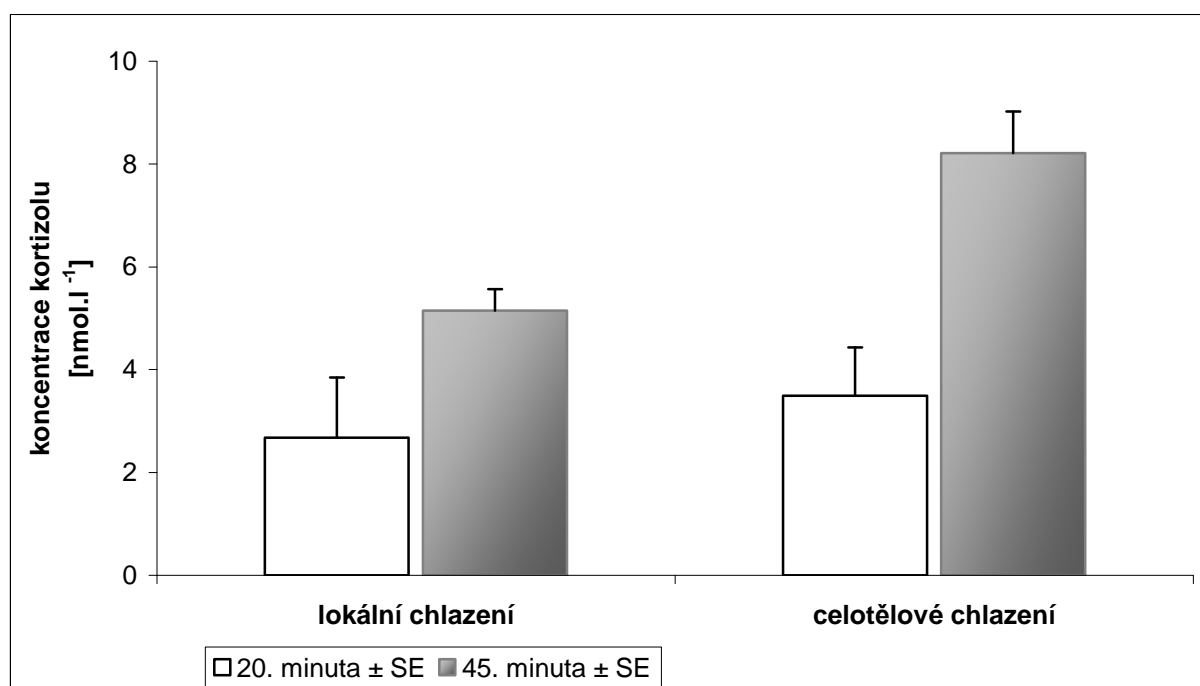
Při lokálním chlazení dolních končetin s teplotou lázně 11°C trvající 30 minut došlo k nárůstu hladiny kortizolu oproti pre-expozičnímu stavu (0. až 20. minuta), a to od 39. minuty po 53. minutu s výjimkou 49. minuty. Svého maxima dosáhly hodnoty po 27 minutách chlazení (47. minuta pokusu), kdy koncentrace kortizolu stoupla o více než 80% vzhledem k hodnotám získaných před chlazením. Po skončení chlazení hladina kortizolu opět postupně klesala (obr. č. 6).



Obrázek č. 6: Časový průběh změn v obsahu kortizolu ve slinách během lokálního chlazení při různých teplotách lázně. 14°C lázeň je vynesena plnými čtverci, 11°C lázeň prázdnými čtverci. Pro testování dat byl použit nepárový t-test. * - hodnota je vyšší než v pre-expoziční fázi pokusu (0. až 20. minuta), $p < 0,05$; # - hodnota je vyšší než v pre-expoziční fázi pokusu, $p < 0,01$. (SE je střední chyba průměru.)

5.6 Srovnání celotělového a lokálního chlazení

Pro zjištění, zda je navýšení koncentrace kortizolu stejná při celotělovém i lokálním chlazení jsem srovnala hodnoty ve 20. a 45. minutě lokálního a celotělového třicetiminutového chlazení s teplotou lázně 11°C (obr. 7). Rozdíl mezi těmito navýšeními byl patrný, ale nebyl statisticky průkazný.



Obrázek č. 7: Srovnání koncentrací kortizolu při celotělovém a lokálním třicetiminutovém chlazení při teplotě lázně 11°C. Byly porovnávány hodnoty před vstupem do lázně a 25 minut poté u probandů účastnícího se celotělového chlazení (n = 6) a lokálního chlazení (n = 5). Použitým testem byl nepárový t-test ($t = -1,51$, $df = 9$, $p = 0,165$) (SE je střední chyba průměru.)

6 DISKUZE

Tato práce se zabývá změnami v produkci kortizolu během lokálního a celotělového chlazení lidí, k jejichž sledování bylo jako materiálu použito lidských slin. V předchozích studiích, zabývajících se fyziologickými reakcemi člověka na chlad, byla použita pro stanovení stresových hormonů krevní plazma.

Bylo prokázáno, že chladový podnět o teplotě 11°C trvající 30 minut zvyšuje hladinu kortizolu ve slinách jak při lokálním chlazení dolních končetin, tak během celotělového chlazení (ponořením po prsa). Výsledky této práce nepotvrzují nálezy, které uvádějí, že produkce kortizolu se po vystavení lidí chladovému stresu nemění (Wilson a ost. 1970, Wittert a ost. 1992, Šimečková a ost. 2000), či dokonce klesají (Šrámek a ost., 2000, Leppäluoto a ost. 1988, Goldstein-Golairé a ost., 1970) – tyto výsledky mohly být způsobeny nevhodnou denní donou odběru, zvoleným intervalem odběru vzorků, ale mohl se zde také uplatnit stresový faktor při samotném odběru vzorků.

Aby nedocházelo ke zkreslení výsledků vlivem denního rytmu, byly mé pokusy naplánovány tak, aby výsledky byly co nejméně ovlivněny denním rytmem změn hladiny kortizolu ve slinách, a to na základě výsledků pokusu (4.1.1), v němž byly sledovány klidové hladiny kortizolu během dne. Nálezy z tohoto pokusu jsou v souladu s výsledky Alfonsiho a ost. (2002).

Nežádoucí stresové faktory, které by mohly negativně ovlivnit průběh měření, byly eliminovány jednak použitou neinvazivní metodou odběru vzorků slin a také tím, že probandi před samotným začátkem pokusu s chlazením seděli 15 minut v klidu v místnosti, kde pokus probíhal. Odběry jednotlivých vzorků se prováděly ve dvou– až pětiminutových intervalech (viz příloha).

Vzestup koncentrace kortizolu byl během třicetiminutového celotělového chlazení větší než v průběhu lokálního třicetiminutového lokálního chlazení (obr. č. 7). Statisticky však tato závislost produkce kortizolu na velikosti chlazené plochy nebyla prokázána, zřejmě kvůli malému počtu pozorování.

Hladina kortizolu ve slinách v průběhu chlazení začala stoupat až 15 minut po začátku působení chladového podnětu. Důvodem je pravděpodobně pomalá difúze kortizolu z plasmy do slin (Lac G., 2001).

Po skončení třicetiminutového chladového podnětu začala koncentrace kortizolu ve slinách postupně klesat (obr. č. 4 a č. 6). Není však možné spolehlivě určit, zda je tento pokles

způsoben ukončením chladového podnětu nebo zda dochází k útlumu produkce kortizolu již během působení stresových podnětů. První teorii podporují pokusy, které provedl Hiramatsu a ost. (1984). Ti zaznamenali již během lokálního 10 minutového chlazení rukou nárůst koncentrace kortizolu v plazmě, který ale přetrvával ještě 15 minut po skončení chlazení. V téže práci měli probandi během hodinového celotělového chlazení zvýšenou koncentraci kortizolu v plazmě i po skončení chlazení. Stejně tak Wilkerson a ost. (1970) zaznamenali při vystavení 5°C vzduchu nárůst koncentrace kortizolu po celou dobu dvouhodinové chladové expozice. Pokud by ale bylo pozdější vylučování kortizolu do slin způsobeno jeho difúzí z plazmy, měla by být jeho hladina ve slinách zvýšená i nějakou dobu po ukončení chlazení.

Naopak práce provedená Bošťíkem a ost. (1979) na krysách podporují teorii o útlumu produkce již během chladového podnětu. V tomto případě došlo k nárůstu kortikosteronu v plazmě krys jen v prvních hodinách a v průběhu 24 hodin pak jeho hladina klesla na určitou hladinu, která se již neměnila. Protože však zvířata byla chladnému prostředí vystavována po několik dní, časový rámec těchto prací není možné srovnávat.

Jak je patrné z obrázku č. 5, také při 45 minutovém celotělovém chlazení docházelo u jednoho probanda ze čtyř k mírnému poklesu hladiny kortizolu již během pobytu ve vodě (11°C), po vynoření došlo k ještě razantnějšímu poklesu. U ostatních tří probandů tohoto pokusu ale nedošlo k žádným změnám v koncentraci kortizolu. To mohlo být způsobeno tím, že někteří probandi (č. 3 a č. 4) se s chladovými podněty setkávali v rámci svého studia. Nelze ovšem říci, že za tuto reakci může chladová adaptace, protože proband č. 2 odpovídal na chladový podnět při pokusu s třicetiminutovým celotělovým chlazením, stejně jako proband č. 3 při pokusu s lokálním chlazením v lázni 11°C lázní. Nicméně kvůli malému množství pozorování jsem tento pokus statisticky nehodnotila.

Ponoření nohou po kolena do vody o teplotě 14°C nezpůsobilo žádné změny v hladině kortizolu (obr. č. 6). Není ale jisté, zda se jednalo o nedostatečně silný podnět, nebo zda na výsledek měly vliv podmínky pokusu. Ty neumožňovaly odběr skutečně klidových hodnot před ponořením nohou do lázně – někteří z probandů před pokusem prodělali krátké fyzické cvičení, které se pravděpodobně projevilo v pre-expoziční fázi pokusu a je příčinou vysokých hodnot na začátku pokusu. Rovněž nebylo možné dodržet nejvhodnější dobu pro provedení pokusu, vyplývající z obr. č. 3 – jednotlivé pokusy začínaly mezi 11:00 a 13:00, což zřejmě způsobilo vyšší variabilitu koncentrací kortizolu mezi jednotlivci.

7 ZÁVĚR

Byl sledován vliv ponoření různě velkých ploch lidského těla do vody o různé teplotě a na různě dlouhou dobu na změny hladiny kortizolu ve slinách.

Během lokálního chlazení dolních končetin ve vodě o teplotě 14°C nedošlo ke změně koncentrace kortizolu ve slinách.

Lokální chlazení dolních končetin ve vodě o teplotě 11°C zvýšilo hladinu kortizolu ve slinách a více než 80%. Koncentrace kortizolu začala stoupat až po 19 minutách působení chladového podnětu a po skončení chlazení plynule poklesala.

Celotělové chlazení ponořením po prsa do vody o teplotě 11°C navýšilo koncentraci kortizolu ve slinách o 135 %, časové změny v koncentraci kortizolu měly obdobný trend jako u lokálního chlazení, ale koncentrace kortizolu začala stoupat o 4 minuty dříve.

Koncentrace kortizolu ve slinách při lokálním a celotělovém chlazení v 11°C lázni se od sebe statisticky nelišila.

8 POUŽITÁ LITERATURA

ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. (1998) *Základy buněčné biologie, nakl. Espero Publishing, s. r. o., 630 str.*

ALFONSI L., TOZZI C., GIOVANNOLI C., BAGGIANI C., GIRAUDI G. (2002): Development of a non-competitive immunoassay for cortisol and its application in the analysis of saliva. *Analytica Chimica Acta* 468 (2): 315-321

BECK . C., MYGARRY E. E. (1962): Physiological importance of cortisol. *British Medical Bulletin* 18 (2): 134-140

BIČÍKOVÁ M., HAMPL R., PUTZ Z., STÁRKA L. (1987): Comparison of isotope and nonisotope variants of direct cortisol immunoassay. *Proceedings of the Symposium on the Analysis of Steroids*: 101-106, Sopron, Hungary.

BOŠTÍK J., KVĚTŇANSKÝ R., JANSKÝ L. (1979): Plasma corticosterone and catecholamine levels during the course of cold adaptation in rats. *Acta Universitatis Carolinae - Biologica*: 257-261

BREUNER C. W., ORCHINIK M. (2002): Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. *Journal of Endocrinology* 175 (1): 99-112

BUCKINGHAM J. C. (2006): Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *British Journal of Pharmacology* 147: S258-S268

ERLANGER B. F., BOREK F., BEISER S. M., LIEBERMAN S. (1959): Steroid-protein conjugates. II. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with progesterone, deoxycorticosterone and estrone. *Journal of Biological Chemistry* 234 (5): 1090-1094

GANONG W. F. (1999): Přehled lékařské fyziologie. *nakl. H&H*, 681 str.

GOLDSTEIN-GOLAIRE J., VANHAELST L., BRUNO O. D., LECLERCQ R., COPINSCHI G. (1970): Acute effect of cold on blood levels of growth hormone, cortisol, and thyrotropin in man. *Journal of Applied Physiology* 29 (5): 622-626

HIRAMATSU K., YAMADA T., KATAKURA M. (1984): Acute effects of cold on blood pressure, renin-angiotensin-aldosterone system, catecholamines and adrenal steroids in man. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 11 (2): 171-179

LAC G. (2001): Saliva assays in clinical and research biology. *Pathologie Biologie* 49 (8): 660-667

LEPPÄLUOTO J., KORHONEN I., HUTTUNEN P., HASSI J. (1988): Serum levels of thyroid and adrenal hormones, testosterone, TSH, LH, GH, and prolactin in men after a 2-h stay in a cold room. *Acta Physiologica Scandinavica* 132 (4): 543-548

LÖSEL R. M., FALKENSTEIN E., FEURING M., SCHULTZ A., TILLMANN H.-C., ROSSOL-HASEROTH K., WEHLING M (2003): Nongenomic Steroid Action: Controversies, Questions and Answers. *Physiological Reviews* 83 (3): 965-1016

MURRAY R. K., GRANNER D. K., MAYES P. A., RODWELL V. W. (1998): Harperova biochemie. *nakl. H&H*, 872 str.

PRIGNET H., MAXIME V., ANNANE D. (2004): Science review: Mechanisms of impaired adrenal function in sepsis and molecular action of glucocorticoids. *Critical Care* 8 (4): 243-252

SAPOLSKI R. M., ROMERO L. M., MUNCK A. U. (2000): How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory and Preparative Action. *Endocrine Reviews* 21 (1): 55-89

ŠIMEČKOVÁ M., JANSKÝ L., LESNÁ I., VYBÍRAL S., ŠRÁMEK P. (2000): Role of beta adrenoreceptors in metabolic and cardiovascular responses of cold exposed humans. *Journal of Thermal Biology* 25 (6): 437-442

ŠRÁMEK P., ŠIMEČKOVÁ M., JANSKÝ L., ŠAVLÍKOVÁ J., VYBÍRAL S. (2000): Human physiological responses to immersion into water of different temperatures. *European Journal of Applied Physiology* 8 (5): 436-442

TSIGOS C., CHROUSOS G.P. (2002): Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53 (4): 865-871

VINING R. F., MCGINLEY R. A., SYMONS R. G. (1983): Hormones in Saliva: Mode of Entry and Consequent Implications for Clinical Interpretation. *Clinical Chemistry* 29 (10): 1752-1756

VINING. R. F., MCGINLEY R. A. (1987): The measurement of hormones in saliva: possibilities and pitfalls. *Journal of Steroid Biochemistry* 27 (1-3): 81-94

WEHLING M., LÖSEL R (2006): Non-genomic steroid hormone effect: Membrane or intracellular receptors? *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102 (1-5): 180-183

WILKERSON J. E., RAVEN P. B., BOLDUAN N. W., HORVATH S. M. (1974): Adaptations in man's adrenal function in response to acute cold stress. *Journal of Applied Physiology* 30 (2): 183-189

WILSON O., HEDNER P., LAURELL S., NOSSLIN B., RERUP C., ROSENGREN E. (1970): Thyroid and adrenal response to acute cold exposure in man. *Journal of Applied Physiology* 28 (5): 543-548

WITTERT G. A., OR H. K., LIVESEY J. H., RICHARDS A. M., DONALD R. A., ESPINER E. A. (1992): Vasopresin, Corticotropin-Releasing Factor, and Pituitary Adrenal Responses to Acute Cold Stress in Normal Humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 75 (3): 750-755

9 PŘÍLOHY

9.1.1 Příloha č. 1: Časový interval odběru vzorků slin při jednotlivých typech chlazení

Vzorky pro analýzu kortizolu		
A	B	C
0	0	0
5	5	5
10	10	10
15	15	15
20	20	20
24	25	25
26	30	30
30	35	35
35	37	40
40	39	45
45	41	50
50	43	55
55	45	60
60	47	65
65	49	70
70	51	75
	53	80
	55	85
	60	90
	65	
	70	

A celotělové chlazení - 30 min
B lokální chlazení - 30 min
C celotělové chlazení - 45 min
barevně zvýrazněná oblast odpovídá expozici chladu