

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů - Neurobiologie



**Michaela Kalivodová**

Vliv antagonistů NMDA receptorů na aktivitu mozku ryb druhu *Gnathonemus petersii*  
Effect of NMDA receptor antagonists on the brain activity of the fish species *Gnathonemus petersii*

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Karel Valeš, PhD.

Praha 2025

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 29.4.2025

*Kalivodová*  
.....

Poděkování:

Ráda bych vyjádřila upřímné poděkování svému školiteli, RNDr. Karlu Valešovi, Ph.D., a Mgr. Veronice Kubáčové Langové za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnovali při zpracování této diplomové práce. Dále děkuji doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D., a všem kolegům z Národního ústavu duševního zdraví, kteří mi poskytli podporu v náročných situacích a byli vždy ochotni pomoci či poradit. V neposlední řadě patří mé poděkování rodině a blízkým za jejich podporu během celého procesu psaní této práce.

## Abstrakt

Cílem této práce je zkoumat mozkovou aktivitu ryby *Gnathonemus petersii* v reakci na NMDA receptorové antagonisty, konkrétně ketamin, který je běžně využíván jako modelová látka pro indukci psychotických stavů. Výběr této ryby jako modelového organismu je podmíněn její schopností komplexní bioelektrické komunikace a navigace, které lze snadno zaznamenávat a dále kvantitativně i kvalitativně analyzovat. Díky těmto vlastnostem a zároveň zohlednění principů 3R (replacement, reduction, refinement) představuje *G. petersii* vhodný model pro studium neurofyzilogických procesů souvisejících s kognicí a psychotickými symptomy, čímž umožňuje hlubší porozumění jejich biologickým základům.

Abstraktní myšlení se vyvinulo jako součást vyšších kognitivních a jazykových schopností, které poskytují evoluční výhody, avšak zároveň zvyšují predispozici k rozvoji schizofrenie. Přestože tímto onemocněním trpí výhradně člověk, jeho evoluční a biologické základy jsou přítomné i u ostatních obratlovců. Pro hlubší pochopení těchto základů je schizofrenie v této práci farmakologicky modelována právě na rybě *G. petersii*.

Hlavní hypotézou této práce je, že podání ketaminu vyvolá změnu mozkové aktivity, přičemž tato změna bude korelovat s alteracemi v jejich behaviorálních projevech a elektrofyziologické aktivitě. Za účelem ověření konstruktivní validity tohoto modelu bude provedena kvantifikace transkripčního faktoru c-Fos ve vybraných mozkových strukturách, přičemž c-Fos poslouží jako marker neuronální aktivace po expozici ketaminu.

Ketamin signifikantně ovlivnil behaviorální parametry, zatímco změny v elektrické signalizaci nebyly pozorovány. Expres c-Fos nebyla v cílených modelových oblastech jasně detekována, ačkoli pozitivní značení bylo zaznamenáno při zavádění metody. Míra detekovaného signálu může souviset s biologickou variabilitou i metodickými omezeními. Navržený protokol tak představuje výchozí bod pro další optimalizaci.

Díky svému výrazně rozvinutému sociálnímu chování, vysoké míře kognitivních schopností a možnosti neinvazivního sledování elektrické aktivity se však *G. petersii*, i přes výše zmíněná omezení, jeví jako perspektivní modelový organismus pro studium neurobiologických mechanismů, nejen psychotických poruch.

Klíčová slova: NMDA receptory, ketamin, *Gnathonemus petersii*, c-Fos, schizofrenie

## Abstract

The aim of this thesis is to investigate the brain activity of the fish *Gnathonemus petersii* in response to NMDA receptor antagonists, specifically ketamine, which is commonly used as a model compound for inducing psychotic states. The selection of this fish as a model organism is based on its ability for complex bioelectric communication and navigation, which can be easily recorded and subsequently analyzed both quantitatively and qualitatively. Thanks to these characteristics, and while adhering to the 3R principles (replacement, reduction, refinement), *G. petersii* represents a suitable model for studying neurophysiological processes related to cognition and psychotic symptoms, thereby enabling a deeper understanding of their biological foundations.

Abstract thinking evolved as part of higher cognitive and language abilities, which provide evolutionary advantages but also increase the predisposition to developing schizophrenia. Although this disorder affects only humans, its evolutionary and biological foundations are present in other vertebrates as well. To better understand these foundations, schizophrenia is pharmacologically modeled in this study using *G. petersii*.

The main hypothesis of this work is that ketamine administration will induce changes in brain activity, which will correlate with alterations in behavioral manifestations and electrophysiological activity. To verify the construct validity of this model, quantification of the transcription factor c-Fos, serving as a marker of neuronal activation after ketamine exposure, will be performed in selected brain structures.

Ketamine significantly affected behavioral parameters, while no changes in electrical signaling were observed. c-Fos expression was not clearly detected in the targeted model regions, although positive cellular labeling confirmed the successful establishment of the staining protocol for the fish model. The extent of the detected signal may be related to both biological variability and methodological limitations. The proposed protocol thus represents a starting point for further optimization.

Thanks to its highly developed social behavior, advanced cognitive abilities, and the possibility of non-invasive monitoring of electric activity, *G. petersii*, despite the aforementioned limitations, appears to be a promising model organism for studying the neurobiological mechanisms of psychotic disorders.

Keywords: NMDA receptors, ketamine, *Gnathonemus petersii*, c-Fos, schizophrenia

## Obsah

Abstrakt .....	3
Abstract .....	4
Seznam zkratek .....	7
<b>1. Úvod .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Cíle práce .....</b>	<b>11</b>
<b>2. <i>Gnathonemus petersii</i> .....</b>	<b>11</b>
2.1 Neuroanatomie .....	13
2.2 Srovnání neuroanatomie s ostatními druhy používanými v neurobiologii .....	17
<b>3. NMDA antagonisté, jejich vliv na mozkovou aktivitu, neuroplasticita .....</b>	<b>22</b>
3.1 NMDA receptory .....	22
3.2 NMDA antagonisté .....	24
3.3 Projevy chování vyvolané NMDA antagonisty .....	26
3.3.1 U člověka - NMDA antagonisté ve vztahu ke schizofrenii .....	28
3.3.2 U modelových druhů schizofrenii podobné symptomy .....	29
<b>4 Metody sledování mozkové aktivity .....</b>	<b>31</b>
4.1 Histologické metody a jejich využití pro detekci neuronálních markerů .....	31
4.1.1 Immediate early genes IEGs .....	33
4.1.1.1 c-Fos .....	34
4.1.2 Ostatní markery mozkové aktivity .....	35
4.2 Elektrofyziologické metody .....	37
4.3 Behaviorální metody .....	38
<b>5. Materiál a metody .....</b>	<b>39</b>
5.1 Laboratorní zvířata a podmínky chovu .....	39
5.2 Design experimentu .....	40
5.3 Farmakologická expozice .....	41
5.4 Behaviorální testování .....	41
5.5 Elektrosignalizace .....	41
5.6 Odběr mozkové tkáně a histologická příprava .....	42
5.7 Imunohistochemická detekce a montáž vzorků .....	42
5.7.1 Protokol I. .....	43
5.7.2 Protokol II. .....	44
5.8 Mikroskopická analýza .....	44
5.9 Statistická analýza .....	45

<b>6. Výsledky</b> .....	45
6.1 Imunohistochemie.....	45
6.1.1 Počet detekovaných částic .....	48
6.2 Behaviorální testování.....	49
6.3 Elektrosignalizace .....	52
<b>7. Diskuse</b> .....	53
<b>8. Závěr</b> .....	56
<b>9. Seznam použité literatury</b> .....	58

## Seznam zkratek

<b>NMDA</b>	N-metyl-D-aspartát	<b>LTP</b>	dlouhodobá potenciace (long term potentiation)
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-metyl-4- isoxazolepropionová kyselina	<b>LTD</b>	dlouhodobá deprese (long term depression)
<b>cAMP</b>	cyklický adenosinmonofosfát	<b>IEGs</b>	geny okamžité odpovědi (immediate early genes)
<b>CREB</b>	protein vázající se na cAMP odpovědní prvek (cAMP-response- element-binding-protein)	<b>Syb2</b>	synaptobrevin-2
<b>ERK1/2</b>	kinázy regulované extracelulárním signálem 1/2 (extracellular signal- regulated kinase 1/2)	<b>SNARE proteiny</b>	proteiny zodpovědné za vezikulární fúzi (soluble NSF attachment protein receptor)
<b>CaMKIV</b>	Kalcium/kalmodulin-dependentní proteinkináza typu IV (calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV)	<b>NSF</b>	N-ethylmaleimid sensitivní faktor
<b>bcl-2</b>	B-buněčný lymfom (B-cell lymphoma)	<b>GECIs</b>	indikátory vápníku (genetically encoded calcium indicators)
<b>IC50</b>	minimální koncentrace antagonisty potřebná k inhibici 50 % receptorů	<b>VGLUT</b>	vezikulární glutamátový transportér
<b>mTOR</b>	savčí cíl rapamycinu (mammalian target of rapamycin)	<b>COX</b>	cytochrom C oxidáza
<b>BDNF</b>	mozkový neurotrofický faktor	<b>2-DG</b>	2-deoxyglukóza
<b>CNS</b>	centrální nervová soustava	<b>PET</b>	pozitronová emisní tomografie
<b>GABA</b>	kyselina gama-aminomáselná	<b>EEG</b>	elektroencefalografie
<b>ASD</b>	poruchy autistického spektra (autism spectrum disorder)	<b>LFPs</b>	lokální pole potenciálů (local field potentials)
<b>ADHD</b>	porucha pozornosti s hyperaktivitou (attention deficit hyperactivity disorder)	<b>ITFs</b>	indukovatelné transkripční faktory (inducible transcription factors)
<b>DEE</b>	vývojová a epileptická encefalopatie (developmental and epileptic encephalopathies)	<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>TOR</b>	temporal order object recognition task	<b>AP-1</b>	aktivační protein 1
		<b>mRNA</b>	messengerová ribonukleová kyselina
		<b>IRES</b>	interní ribozomální místa (internal ribosome entry site)
		<b>5' UTR</b>	5' nepřekládaná oblast (5'- untranslated region)

<b>MEK-ERK</b>	MAPK/ERK kináza	<b>ERE</b>	Egr responsní element
<b>ERK</b>	extracelulární signálně-regulovaná kináza (extracellular signal-regulated kinase)	<b>EOD</b>	electric organ discharge
<b>KO</b>	knockout	<b>ELL</b>	elektrosenzorický lalok postranní čáry (electrosensory lateral line lobe)
<b>FISH</b>	fluorescenční in situ hybridizace	<b>nELL</b>	Jádro elektrosenzorického laloku postranní čáry (nucleus of electrosensory lateral line lobe)
<b>CANE</b>	zachycení aktivovaných neuronálních souborů (capturing activated neural ensemble)	<b>DAB</b>	3,3'-diaminobenzidin
<b>Arc</b>	protein asociovaný s cytoskeletem regulovaným aktivitou (activity-regulated cytoskeleton-associated protein)	<b>1° AB</b>	primární protilátka
		<b>2° AB</b>	sekundární protilátka
<b>Egr1</b>	časný růstový faktor 1 (early growth response 1)	<b>TH</b>	tyrosin hydroxyláza
<b>CA1</b>	Cornu Ammonis 1		

## 1. Úvod

Studium vlivu NMDA antagonistů na neuronální aktivitu mozku ryb druhu *G. petersii* představuje významný krok k hlubšímu porozumění evolučním podkladům a rozvoji psychiatrických poruch, jako je například schizofrenie. Tento druh byl pro výzkum zvolen především díky své schopnosti generovat slabé bioelektrické signály a výrazně specializované nervové soustavě, což lze pozorovat na mimořádně vyvinutém sociálním chování (Sukhum et al., 2016). Díky těmto vlastnostem umožňuje detailní sledování neurofyziologických procesů a činí z *G. petersii* jedinečný modelový organismus.

Podle glutamátové hypotézy schizofrenie, hraje dysfunkce NMDA receptorů zásadní roli v narušení rovnováhy mezi excitačními a inhibičními procesy v mozku. Tyto receptory jsou esenciální pro synaptickou plasticitu, a tedy i pro procesy učení a paměti. Jejich snížená funkce je spojována s narušením rovnováhy mezi inhibičními a excitačními mechanismy v mozku, což může vést k rozvoji psychotických symptomů (Pafundo et al., 2021).

Schizofrenie je chronické neuropsychiatrické onemocnění, které se vyskytuje výhradně u člověka, avšak její základní mechanismy lze zkoumat i na jednodušších experimentálních modelech. Jedním z nejjednodušších přístupů je farmakologická modelace, při níž jsou použity látky ovlivňující nervový systém. NMDA antagonist ketamin se běžně využívá k modelaci schizofrenie u zvířat, neboť mimikuje některé její projevy, například narušenou kognici nebo behaviorální změny (Spark et al., 2024). Studie prováděná na potkanech ukázala, že intoxikace ketaminem ovlivňuje expresi proteinu mTOR v hipokampu a prefrontálním kortexu, což odráží neurobiologické změny spojované se schizofrenií (Xie et al., 2020). Podobně aplikace MK-801, dalšího antagonisty NMDA receptorů, byla použita na modelu sladkovodní ryby *Danio rerio* (česky dánío pruhované, anglicky zebrafish) pro hodnocení změn v sociální interakci a lokomočním chování (Gallas-Lopes et al., 2020). Studie tedy dokazují, že i jednodušší modelové organismy jsou cenným nástrojem pro výzkum schizofrenie.

Ketamin, jako antagonist NMDA receptorů, působí primárně na GABAergní interneurony, které za fyziologických podmínek tlumí aktivitu excitačních glutamátergních neuronů. Jejich blokáda vede k disinhibici těchto excitačních neuronů a ke zvýšení jejich aktivity, což narušuje rovnováhu mezi inhibičními a excitačními procesy v mozku. Tento mechanismus je považován za jeden z klíčových v rozvoji psychotických symptomů. Výslednou neuronální hyperaktivitu lze nepřímo sledovat prostřednictvím exprese proteinu c-Fos, jenž slouží jako marker aktivovaných neuronů. Jeho kvantifikace a prostorová distribuce umožňuje identifikovat mozkové oblasti, v nichž došlo k následné postsynaptické aktivaci, a které se mohou podílet na patofyziologii psychotických stavů (Gerhard et al., 2020).

K porozumění mozkové aktivitě lze využít *in vivo* a *in vitro* metody, které se vzájemně doplňují, každá s vlastními specifickými výhodami a omezeními. *In vivo* techniky umožňují sledování dynamiky mozkové

činnosti u živých jedinců, zatímco *in vitro* přístup nabízí detailní pohled na buněčné a molekulární procesy v izolované tkáni (Misgeld and Kerschensteiner, 2006). Histologické a cytochemické *in vitro* metody jsou obzvláště vhodné pro kvantitativní hodnocení biologických markerů a studium patologických změn na mikroskopické úrovni (Dunstan et al., 2011; Makki, 2016). Jejich hlavní omezení spočívá v absenci kontextu celého organismu, což může snižovat schopnost zachytit dynamické procesy v přirozeném biologickém prostředí. V této práci byly použity oba přístupy, elektrofyziologické měření elektrické aktivity *in vivo* a imunohistochemická analýza markeru c-Fos *in vitro*, které jsou popsány v dalších kapitolách.

Modelování schizofrenie pomocí modulace NMDA receptorů pomáhá k porozumění etiologie tohoto onemocnění, které je nutné pro následnou efektivní léčbu. Schizofrenie je široce rozšířeným duševním onemocněním, které vykazuje ve světové populaci rostoucí tendenci jak v prevalenci, tak v incidenci. Tento trend poukazuje na nutnost intenzivnějšího výzkumu a lepšího pochopení faktorů přispívajících k jejímu výskytu, aby bylo možné vyvíjet účinnější terapeutické strategie a intervenční programy (Solmi et al., 2023). Látkami řadícími se do kategorie antagonistů NMDA receptorů, včetně ketaminu, jsou dále například, ketaminu podobný methoxetamin, dále fencyklidin (PCP) (Mathews et al., 2018), memantin nebo dizocilpin (MK-801) (Chvojkova et al., 2024; Duda et al., 2016). Mají schopnost inhibovat funkci NMDA receptoru prostřednictvím kompetitivních, nekompetitivních či unkompetitivních mechanismů antagonismu. Některé z těchto látek se využívají na základě pozorování, že indukují symptomy podobné schizofrenii u lidí a analogy těchto symptomů u zvířat. NMDA receptor je velmi důležitý pro synaptickou plasticitu, učení a paměť (Alkadhi, 2021). Evolučně tvoří podklad pro vyšší kognitivní funkce, včetně schopnosti abstraktního myšlení, zároveň tak vytváří predispozici k rozvoji schizofrenie. Výzkumy například ukazují, že s tímto onemocněním souvisí úbytek dendritických struktur ve třetí vrstvě dorsolaterální prefrontální kůry (dlPFC), která je důležitá pro pracovní paměť a abstraktní myšlení (Arnsten et al., 2022; Braun et al., 2016).

Vliv NMDA antagonistů na mozek modelového organismu *G. petersii* bude zkoumán pomocí imunohistochemické metody, která umožňuje detekci neuronální aktivace prostřednictvím sledování transkripce nesespecifického markeru aktivity buněk, proteinu c-Fos. Ketamin, jakožto NMDA antagonist, indukuje aktivaci signálních drah v neuronálních buňkách, což iniciuje kaskádu událostí vedoucí k transkripci c-Fosu v cílových buňkách (Choi et al., 2020; Gerhard et al., 2020).

Pro farmakologické modelování schizofrenních stavů byl zvolen NMDA receptorový antagonist ketamin, jehož aplikace ve formě vodného roztoku je technicky nenáročná a zároveň eticky šetrná. Účinná látka byla přidána přímo do vody obsahující testovaného jedince. Tento způsob podání umožňuje rovnoměrnou expozici účinné látky a současně minimalizuje stresovou zátěž a eliminuje bolest, což je plně v souladu s principy 3R. Ve srovnání s injekční aplikací běžně používanou u savčích modelů, hlavně u hlodavců (Samizadeh et al., 2024), se tento způsob jeví jako výrazně šetrnější a méně invazivní.

Současné animální modely vykazují určité nedostatky, a proto je zde snaha je pořád dále zdokonalovat a hledat vhodnější alternativy pro budoucí výzkum. V posledních letech se otevírá možnost sledovat nové biologické předpoklady pro sociální chování i na jednodušších modelových organismech. Simplifikace těchto biologických fenoménů, s ohledem na prediktivní validitu, tak zároveň umožňuje pracovat ve větším souladu s konceptem 3R.

## 1.1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce je zjistit, jaký vliv má ketamin, jakožto nekompetitivní antagonist NMDA receptorů, na mozkovou aktivitu ryb druhu *G. petersii*. Důraz je kladen na sledování neuronální aktivity prostřednictvím imunohistochemického značení proteinu c-Fos ve vybraných modelových oblastech mozku. Součástí práce je také zavedení a optimalizace této metodiky pro použití u daného modelového organismu.

Dalším cílem je posoudit, zda expozice ketaminu ovlivňuje chování ryb a jejich elektrickou aktivitu, měřenou pomocí EOD. Práce se také zaměřuje na vyhodnocení možných souvislostí mezi změnami v mozkové aktivitě, chování a elektrofyziologických parametrech, a ověření vhodnosti tohoto modelu pro farmakologické studium neuropsychiatrických poruch.

## 2. *Gnathonemus petersii*

Druh *G. petersii* je zvolen jako modelový organismus díky své schopnosti generovat elektrické výboje, tzv. EOD, které se vyvinuly jako adaptace na prostředí s nízkou viditelností a dnes nám mohou sloužit jako indikátor neurobiologických změn (Von Der Emde and Schwarz, 2002). Experimentální studie ukazují, že farmakologická aplikace NMDA antagonistů, jako je ketamin, může u *G. petersii* vyvolat behaviorální změny připomínající symptomy schizofrenie. Nízké dávky ketaminu vedou ke zvýšené lokomotorické aktivitě a nepravidelným pohybovým vzorcům, které bývají považovány za analogii pozitivních symptomů. Naopak vyšší dávky snižují frekvenci EOD, což narušuje orientaci v prostoru a může odpovídat kognitivním deficitům typickým pro toto onemocnění (Langova et al., 2023).

Rybí modely se v neurovědách a farmakologii uplatňují pro svou schopnost vykazovat komplexní behaviorální vzorce, jako je komunikace, agrese, dominance nebo reakce na environmentální podněty, včetně utváření hierarchie v hejnu. Díky relativně jednoduchému, ale evolučně konzervovanému nervovému systému představují druhy jako *Danio rerio* a *G. petersii* výhodné modely pro mapování mozkových funkcí a studium mechanismů podílejících se na sociálním chování i neuropsychiatrických poruchách. Tato jednoduchost v kombinaci s vysokou podobností základních neurobiologických procesů s vyššími organismy z nich činí ideální nástroj pro neurovědní výzkum (Oliveira et al., 2011).

*G. petersii*, známý jako rypoun petersův, je sladkovodní ryba původem z řek západní a střední Afriky a patří mezi slabě elektrické ryby z čeledi *Mormyridae* (Alsenani et al., 2021). Tyto ryby jsou známé svým rozvinutým

sociálním chováním a vysokou inteligencí v porovnání s ostatními rybami. *G. petersii* využívá pro orientaci a komunikaci v prostředí elektrické signály EOD, které plní funkci analogickou k řečovým a zrakovým smyslům u člověka. Mozek těchto ryb vykazuje vysokou míru gyrifikace a encefalizace, což naznačuje pokročilé kognitivní schopnosti, korelující s jejich vysokou inteligencí v porovnání s jinými druhy ryb. Inteligenci těchto ryb můžeme pozorovat například při učení v bludištích a na složitosti jejich sociálního chování (Horka et al., 2024; Sukhum et al., 2016), kdy se jedinci mezi sebou rozpoznávají a utvářejí si tak hierarchii v hejnu (Terleph and Moller, 2003).

*G. petersii* detekuje změny v okolním prostředí pomocí elektroreceptorů rozprostřených po celém těle, přičemž hlavní roli v detailním zkoumání hrají receptory soustředěné na vysoce pohyblivém výběžku dolní čelisti, tzv. Schnauzenorganu (Von Der Emde et al., 2008). Tímto orgánem, který je inervován trigeminálním sensorickým a motorickým systémem, je schopen získávat informace z prostředí (Amey-Özel et al., 2019). Prostorové vnímání u *G. petersii* je zajišťováno pomocí elektroreceptorů, které detekují zpětné změny vlastního elektrického pole EOD. Výsledný „elektrický obraz“ okolí je pravděpodobně tvořen kombinací údajů o amplitudě a sklonu těchto signálů, což rybě umožňuje rozpoznávat tvar, velikost i vzdálenost objektů v prostředí (Von Der Emde et al., 1998). EOD mají tři fáze lišící se délkou trvání a jsou vždy odděleny různě dlouhými interpulsními intervaly (IPI) (Caputi and Budelli, 2006). Tento nový experimentální model psychiatrických onemocnění nám tak umožňuje získávat kvalitativní a kvantitativní data prostřednictvím měření EOD a IPI (Horka et al., 2024; Langova et al., 2023; Von Der Emde and Schwarz, 2002). Nová studie zabývající se elektronavigací *G. petersii* popisuje, jak tyto ryby dokážou až trojnásobně zvýšit schopnost detekovat okolí díky zaznamenávání EOD ostatních jedinců ve skupině. Tato schopnost výrazně zlepšuje jejich navigaci a orientaci v prostoru, což umožňuje efektivnější pohyb ve skupině. Mechanismus kolektivního vnímání tak umožňuje rybám získat mnohem více informací o okolí, než by byly schopny samostatně (Pedraja and Sawtell, 2024).

Přestože se ryba orientuje hlavně podle elektrosignalizace, studie ukazují, že zrak zde hraje také svou roli (Engelmann et al., 2009; Von Der Emde and Fetz, 2007). Sítnice *G. petersii* vykazuje komplexní organizaci tyčinek a čípků a je překryta strukturou zvanou *tapetum lucidum*, odrazivou vrstvou, která zvyšuje pravděpodobnost zachycení světla tyčinkami. Tím přispívá ke kvalitnější detekci pohybu a kontrastu, zejména za zhoršených světelných podmínek (Landsberger et al., 2008).

Sexuální dimorfismus se začíná projevovat u jedinců dosahujících velikosti přibližně 120 mm. V dospělosti je tento dimorfismus u samců charakterizován výraznou expanzí kostí v oblasti análních ploutví a vroubkováním ventrální stěny těla (Pezzanite and Moller, 1998). Ryby *G. petersii* ale nevykazují pohlavní dimorfismus po většinu svého života, s výjimkou krátkého období po skončení dešťů, kdy dochází k dočasným změnám spojeným s reprodukční aktivitou. Po tomto období pohlavní dimorfismus mizí. V zajetí mohou samice

vykazovat zvýšené hladiny androgenů, což může způsobit změny EOD (Landsman, 1993). Studie ukazují, že rozdíly v signálu mezi pohlavími jsou závislé na hladinách steroidních hormonů a odrážejí fyziologické změny spojené s reprodukční sezónou. V tomto období se EOD signál samic stává podobně dominantním jako u samců, což odráží dočasnou hormonální modulaci. V zajetí je však tento typ signálu častěji pozorován u samic než u samců, což naznačuje hormonálně řízenou plasticitu v EOD a vnější morfologii, kde androgenní hormony hrají zásadní roli (Landsman et al., 1990). *G. petersii* má schopnost vysílat a přijímat, jak vlastní, tak cizí signály díky specializovaným elektroreceptivním orgánům. Tyto orgány jsou klíčové pro jeho schopnost aktivní a pasivní elektrolokace a elektrokomunikace (Von Der Emde and Schwarz, 2002).

## 2.1 Neuroanatomie

Neuroanatomie je zásadní oblast výzkumu, která se zaměřuje na odhalování struktury a organizace nervového systému, včetně jeho funkčních souvislostí a patologických změn. Zejména u specifických modelových organismů, jako je *G. petersii*, hraje detailní mapování nervové soustavy důležitou roli při objasňování mechanismů odpovědných za chování, orientaci a komunikaci. Tento druh představuje jedinečný model pro hlubší porozumění nervovému systému a funkcím spojeným s elektrosenzorickým vnímáním a kognitivními procesy.

Mozek ryby *G. petersii* je z hlediska neuroanatomie mimořádně zajímavý, a to nejen svou velikostí, která je v poměru k tělesné velikosti výjimečná i v rámci této taxonomické skupiny, ale také svou vysokou energetickou náročností. Tento mozek spotřebovává přibližně 60 % celkového kyslíku těla, což představuje trojnásobek oproti ostatním zkoumaným obratlovcům, včetně člověka. Takto extrémní metabolická náročnost je mezi rybami naprosto výjimečná a odráží vysokou míru specializace tohoto druhu (Nilsson, 1996). Evoluce zvětšeného mozku vyžaduje buď snížení energetických nároků jiných orgánů, nebo zvýšení celkové energetické spotřeby. Studie na mormyridních rybách ukázala, že velikost mozku se mezi mormyridními druhy značně liší a že neexistuje výrazný kompromis ve velikosti jiných orgánů. Místo toho byla zjištěna korelace mezi velikostí mozku a klidovou spotřebou kyslíku. Větší mozek souvisí s nižší tolerancí k hypoxii. Tato zjištění naznačují, že extrémní encefalizace je spojena se zvýšenou celkovou energetickou spotřebou, což může omezovat evoluci velkých mozků na prostředí s dostatkem energie (Sukhum et al., 2016).

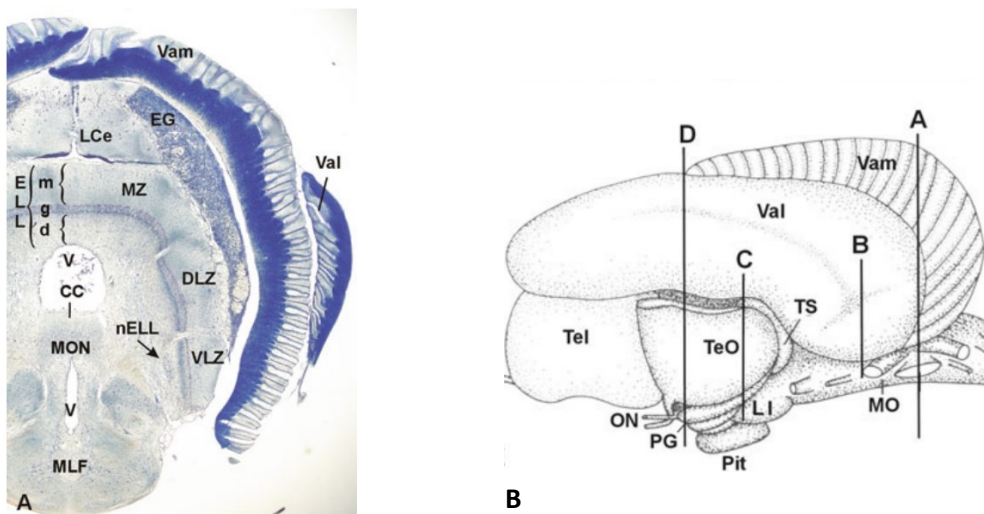
Anatomická specializace mozku *G. petersii* se však neprojevuje pouze jeho velikostí, ale také výrazným vývojem některých struktur, jako je například mozeček. Vysoce vyvinutý mozeček této ryby je charakteristický nápadně zvětšenou valvulární částí (*valvula cerebelli*), která přesahuje střední mozek a zasahuje až nad mezimozek a koncový mozek. Valvulární část mozečku je rozsáhle propojena s elektrosenzorickým jádrem *lateralis torus semicircularis* (*nucleus lateralis tori semicircularis*) a vizuálním optickým tektem (*tectum opticum*). Tyto oblasti jsou vzájemně propojeny topograficky organizovanými spoji, přičemž rostrální a kaudální části optického tekta se propojují odpovídajícím způsobem s rostrálními a kaudálními oblastmi jádra

lateralis torus semicircularis, zatímco dorzální a ventrální oblasti vykazují převrácené propojení. Toto uspořádání umožňuje multisenzorickou integraci informací z vizuálního a elektrosenzorického systému, což rybě poskytuje schopnost identifikovat objekty napříč různými smyslovými modalitami. Významnou úlohu v tomto okruhu hrají také bazální buňky valvulární části mozečku, které mají reciproční propojení jak s jádrem lateralis torus semicircularis, tak s optickým tektem (Zeymer et al., 2018).

Mozeček je rozdělen do čtyř laloků označovaných jako C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> (C z latinského *cerebellum*). Jejich struktura a propojení podporují specifické funkce spojené s elektrosenzorickým vnímáním a motorickou kontrolou. Tyto adaptace umožňují rybě efektivně využívat její unikátní schopnosti k prostorové orientaci a interakci v jejím přirozeném prostředí. Laterální jádro valvuly (*nucleus lateralis valvulae*), velké jádro v dorzálním tegmentu středního mozku u *G. petersii* obsahuje 9 subdivizí, kdy hlavně rostrální, kaudální a exterolaterální část promítá do C<sub>1</sub> laloku. Do C<sub>1</sub> laloku také promítají větší neurony v dorzálním středním mozkovém tegmentu a pravděpodobně mezencefalické trigeminální neurony. Ze zadního mozku vycházejí aferenty do laloku C<sub>1</sub> z prvního funikulárního jádra, laterálního retikulárního jádra a inferiorní olivy. Eferenty laloku C<sub>1</sub> vycházejí z buněk vrstvy eurydendroidních neuronů (funkčně ekvivalentní Purkyňovým buňkám savců) a promítají hlavně do jádra *fasciculus longitudinalis medialis*, jádra *reticularis superius* a *medius* a do trigeminálního motorického jádra (*trigeminal motor nucleus*) (Meek et al., 1986). Trigeminélní motorické jádro, které ovládá pohyby Schnauzenorganu, vykazuje bilaterální reciproční propojení mezi oběma trigeminálními motorickými jádry a mezi trigeminálním sensorickým a motorickým jádrem. Hlavní aferentní vstupy do trigeminálního motorického jádra pocházejí z laterálního jádra valvuly, jádra *dorsalis mesencephali*, mozečkového laloku C1, retikulární formace a jader raphe. Další aferentní signály pocházejí také z centrálního pretektálního jádra, optického tekta, ventroposteriorního jádra *torus semicircularis*, z chuťových sensorických a motorických jader a z hypotalamu. Přestože nebylo prokázáno přímé propojení mezi elektrosenzorickým systémem a trigeminálním motorickým jádrem, obě dráhy vykazují funkční propojení (Amey-Özel et al., 2019). Propojení laloku C<sub>1</sub> jsou poměrně omezená a specializovaná. Spojení s trojklanným nervem je uzpůsobeno prostřednictvím prvního funikulárního jádra, mezencefalického trojklanného jádra a trigeminálního motorického jádra. Dále byla popsána absence centrálních mozečkových jader interkalovaných v eferentních mozečkových spojích a přítomnost paracerebelárního jádra laterální valvuly zapojeného do aferentních mozečkových spojení (Meek et al., 1986).

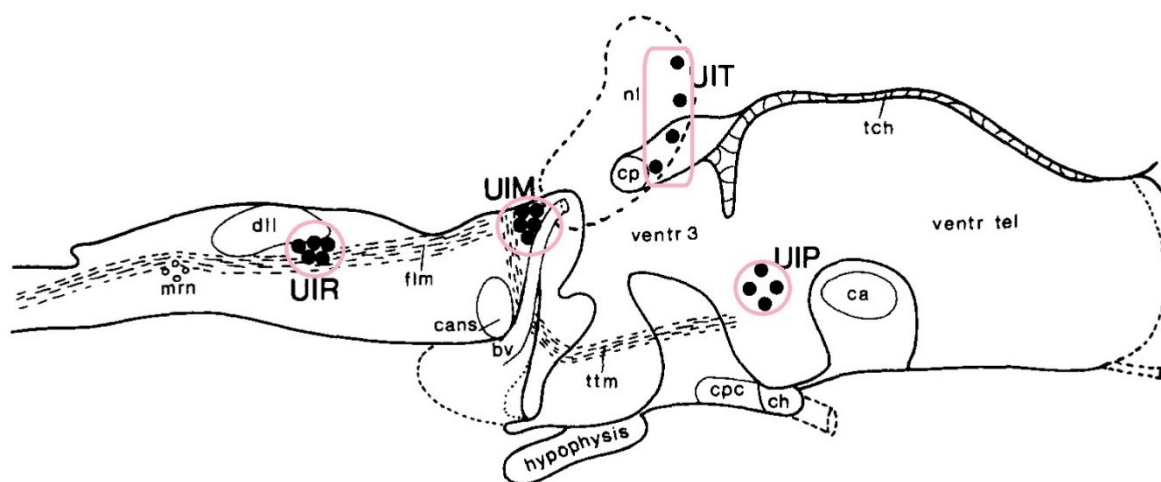
Neuronální aktivita v elektrosenzorických oblastech mozku ryb *G. petersii*, jako je elektrosenzorický lalok postranní čáry ELL (electrosensory lateral line lobe), vyznačeno na transverzálním řezu mozkiem na obázku č. 1, koreluje s různými sensorickými stimuly a chováním ryb (Fechner et al., 2018). ELL je zásadní strukturou pro zpracování elektrických signálů z prostředí. Tato oblast mozku slouží jako centrální integrační místo pro aferentní signály přicházející z elektroreceptorů. ELL se skládá z kortexu a jádra ELL (nELL), kde jsou aferentní informace z ELL dále zpracovávány (Wullimann and Grothe, 2013). Kortex ELL se dělí do tří zón, na dorzo-

laterální DLZ, ventro-laterální VLZ a medio-laterální MZ, z nichž každá má specifické zapojení a funkční úlohu při dekódování různých typů elektrických signálů. Díky této organizaci je ryba schopna identifikovat přítomnost objektů v okolí, a zároveň rozlišovat jejich tvar, vzdálenost či vodivost. Zóna ELL přijímá jak amplitudové informace, tak fázové informace, čímž jsou ryby schopny rozlišovat elektrické impedance (Fechner et al., 2018). Studium těchto oblastí poskytuje cenné poznatky nejen o fungování elektrorecepce, ale i o obecnějších principech sensorického zpracování a neuronální plasticity (Wullimann and Grothe, 2013).



**Obrázek č. 1:** Levý panel (A): Transverzální řez mozkem *G. petersii*. Barvený histologický řez mozkem ukazuje detailní architekturu jednotlivých komponent ELL. Tento řez odpovídá rovině A na pravém schématu B. ELL elektrosenzorický lalok postranní čáry (electrosensory lateral line lobe) je hlavní sensorická struktura zpracovávající signály z elektroreceptorů. Dělí se na: d: dorzální zóna, g: granulační zóna, m: mediální zóna, l: laterální zóna, nELL: jádro ELL, zpracovává přicházející signály ze smyslových aferentů. DLZ, VLZ, MZ: různé laterální zóny, které tvoří funkčně odlišné části ELL zpracovávající různé typy podnětů. MON: Medullary Octavolateral Nucleus, přijímá vstupy z elektroreceptorů. MLF: Medial Longitudinal Fasciculus, významný pro koordinaci pohybu. Vam: Valvula cerebelli, pars medialis, Val: Mozečková valvula (Valvula cerebelli), EG: Eminentia granularis, Lce: laterální část mozečku (Corpus cerebelli lateralis), další části mozečku a laterální mozečkové struktury, zapojené do motorické integrace a korekce, CC: centrální kanál míchy. Pravý panel (B): Schéma mozku ukazující orientaci řezu A a lokalizaci ELL ve vztahu k celému mozku *G. petersii*. Čáry A–D označují různé roviny histologických řezů mozkem. Tel: koncový mozek (telencephalon), TeO: optické tektum (tectum opticum), TS: torus semicircularis, součást sluchových a elektrosenzorických drah, MO: medulla oblongata, PG: preglomerulární komplex, ON: optický nerv, Pit: hypofýza, L.I.: lemniscal input (dráhy), (upraveno dle Wullimann and Grothe, 2013).

Mozek *G. petersii* vykazuje odlišné zastoupení používaných neurotransmiterů v různých mozkových oblastech, zvláště mezi různými částmi hypertrofické mozečkové valvuly. Tyto odlišnosti byly pozorovány s důrazem na oblasti zodpovídající za recepci, přenos a zpracování elektrosensorických modalit (Bissoli et al., 1987). V mozku ryb *G. petersii* byly identifikovány nescpecificky imunoreaktivní (UI) neurony, které se nacházejí ve čtyřech oblastech vyznačených černými tečkami na obrázku č. 2. Tyto buňky vykazují typickou neuronální morfologii a ultrastrukturu, přičemž nescpecificky reagují na různé typy sekundárních a terciárních protilátek používaných v imunohistochemických metodách. Jedna z těchto skupin buněk je v oblasti koncového mozku, konkrétně rostralaterálně od eferentního oktaválního jádra, mezi *fasciculus longitudinalis medialis* a křížením laterálního lemnisku. Další skupina se nachází v dorzálním tegmentu středního mozku, v blízkosti *tractus telencephalo-mesencephalicus*. Rozptýlené UI neurony byly také pozorovány v jádře lateralis torus semicircularis a také v preoptické oblasti nad optickým chiasmatem. Tyto buňky se však neobjevují konzistentně, zatímco v některých mozcích byly nalezeny, v jiných nebyly vůbec detekovány. Tato zjištění poukazují na specifické komplikace chemické neuroanatomie, jejichž biologický význam dosud není znám (Meek et al., 1992).



**Obrázek č. 2:** Kresba mozku ryby *G. petersii* (bez zobrazení struktur mozečku), ukazující polohu nescpecificky imunoreaktivních (UI) buněk (černé tečky orámovány růžově). Tyto buňky jsou zobrazeny v preoptické (UIP), torální (UIT), mezencefalické (UIM) a rombencefalické (UIR) oblasti. Zkratky: bv: krevní céva, ca: přední komisura, cans: komisura ansulata, ch: optické chiasma, cp: zadní komisura, cpc: postchiasmatická komisura, dll: dekuzace laterálního lemnisku, flm: mediální longitudinální fascikl, mfn: medulární relay jádro, nl: laterální jádro (torus semicircularis), ttm: telencefalicko-mezencefalická dráha, ventr tel: telencefalická komora, ventr 3: třetí mozková komora v diencefalu (upraveno dle Meek et al., 1992).

Výzkumy ukazují odlišnou distribuci katecholaminergních neuronů v mozku kostnatých ryb, konkrétně teleostů, jako je *G. petersii*. TH-imunoreaktivní (tyrosin hydroxyláza-imunoreaktivní) neurony byly identifikovány v dopaminergních regionech, jako je suprachiasmatické jádro, magnocelulární hypothalamické

jádro a area postrema. Také byly nalezeny v noradrenergických regionech, například v locus coeruleus a v inferiorní retikulární skupině buněk. Kromě toho byly TH-imunoreaktivní neurony lokalizovány i v dalších oblastech bez dopaminergní či noradrenergí imunoreaktivity, jako jsou ventrální a intermediární koncový mozek, anteriorní a posteriorní preoptické skupiny buněk, ventromediální thalamus, pretektální region a jádro solitárního traktu. Tato zjištění naznačují, že tyto neurony mohou reprezentovat buď vyčerpané dopaminergní buňky, nebo buňky produkující dihydroxyfenylalanin (DOPA) jako hlavní metabolit. Charakteristickým rysem teleostů je absence TH-imunoreaktivních neuronů v tegmentu středního mozku, což se liší od savců, u nichž jsou přítomny dopaminergní skupiny buněk v této oblasti a souvisejí mezencefalicko-telencefalickými projekcemi. Tato absence naznačuje jedinečné neuroanatomické a funkční adaptace u teleostů (Meek and Joosten, 1993).

*G. petersii* tak představuje fascinující modelový organismus pro neuroanatomický výzkum díky svému mimořádně velkému a komplikovanému mozku. Schopnost sociální interakce, spolu s jedinečnými elektrosignalizačními vlastnostmi, jej činí zajímavějším modelovým organismem pro studium nervového systému a chování ve srovnání s běžně používaným *Danio rerio* (Sukhum et al., 2016). Zatímco *Danio rerio* je ceněno pro své genetické a vývojové vlastnosti (Dudziak et al., 2022), *G. petersii* nabízí hlubší vhled do neurobiologických mechanismů spojených se složitým sociálním chováním a elektrokomunikací.

## 2.2 Srovnání neuroanatomie s ostatními druhy používanými v neurobiologii

Evoluce mozku je komplexní proces, který odráží adaptace organismů na jejich prostředí a životní styl. Zahrnuje jak zvýšení velikosti mozku, tak i diferenciaci a specializaci mozkových struktur, což umožňuje organismům efektivněji reagovat na své prostředí a adaptovat se na nové výzvy. Tento proces je poháněn jak genetickými faktory, tak i environmentálními tlaky, které formují funkční a strukturální charakteristiky mozku (Eifert et al., 2015). I přes tuto diferenciaci a specializaci jednotlivých druhů jsou principy fungování neuronálních sítí vysoce konzervované, což umožňuje používat různé druhy organismů k modelování různých nemocí a fyziologických stavů. Hlodavci, zejména myši a potkani, jsou díky své anatomické, fyziologické a genetické podobnosti s člověkem, krátkému životnímu cyklu a nízkým nárokům na chov preferovanými modelovými organismy v biomedicíně výzkumu (Bryda, 2013). Jednou z jejich výhod je možnost manipulace s gestačním obdobím a rodičovskou péčí, což u organismů vyvíjejících se vně nelze tak efektivně využít (Ezran et al., 2017). Dalším často využívaným modelem je ryba *Danio rerio*, která představuje výhodný modelový organismus díky své vysoké plodnosti, rychlému vývoji a průhlednosti embryí, což umožňuje neinvazivní pozorování neurálního vývoje využitelné například pro vývojovou biologii. Stejně jako u modelů hlodavců, behaviorální profil *Danio rerio* neumožňuje adekvátní modelování některých vysoce specifických symptomů, jako jsou například verbální aspekty pozitivních, negativních nebo kognitivních symptomů u

schizofrenie, což představuje významnou nevýhodu. Navzdory těmto omezením však lze u *Danio rerio* studovat neverbální behaviorální projevy, jako je hyperlokomoce, stereotypie, snížená tigmotaxe, omezená explorace nebo snížené sociální chování, které mohou být relevantní při modelování vybraných neuropsychiatrických symptomů. Díky vysoce konzervovaným behaviorálním vzorcům a predikovatelným reakcím na neuroaktivní látky, včetně agonistů trace-aminových receptorů, je *Danio rerio* hojně využívaným experimentálním organismem v oblasti neurovědního výzkumu (Galstyan et al., 2025; Tordjman et al., 2007).

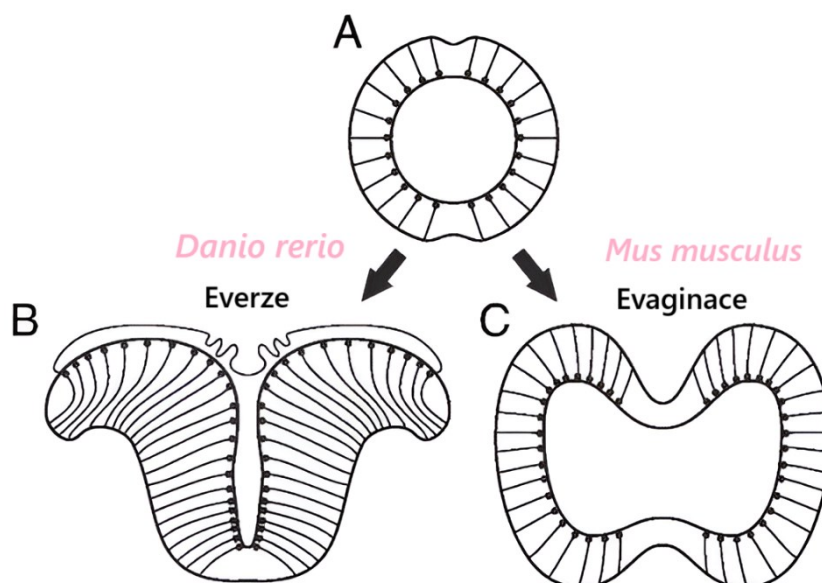
Při porovnávání laboratorních modelů je důležité zohlednit jejich specifické výhody a nevýhody, přičemž klíčovým kritériem pro jejich využití je možnost kvantitativního a kvalitativního měření relevantních parametrů. Mezi takové příklady patří například sledování ultrazvukové vokalizace u potkanů nebo elektrické signalizace u *G. petersii*, které slouží jako objektivní ukazatele behaviorálních a komunikačních projevů.

Vokalizace u potkanů jsou často studovány jako způsob komunikace a indikátor emocionálních a fyziologických stavů. Ultrazvuková komunikace potkanů poskytuje efektivní prostředek pro přenos informací na větší vzdálenosti a je méně náchylná k rušení z vnějšího prostředí. Tento způsob komunikace však vyžaduje pokročilé technologie pro detekci a analýzu, což může být technicky i finančně náročné. Potkani využívají ultrazvukovou komunikaci v souvislosti s prostředím, které obývají, a to jsou nory. Ultrazvuková vokalizace je tak vhodná pro krátkodobou komunikaci ve stísněných prostorech, jako jsou podzemní nory, kde je díky svým fyzikálním vlastnostem efektivně směřována a méně ovlivňována vnějším rušením ve srovnání se slyšitelnými zvuky pro člověka. Tato komunikace tak minimalizuje šanci na detekci predátorem (Bruzynski and Fletcher, 2010).

Ultrazvuková vokalizace slouží zejména k vyjádření emočních stavů a ke komunikaci uvnitř skupiny, což je zásadní pro sociální interakci (Premoli et al., 2023; Simola and Granon, 2019). Zvukové vokalizace byly také zaznamenány u potkanů během REM fáze spánku (Squarcio et al., 2023). Nicméně, studium vokalizace v laboratorních experimentech má své limity, zejména kvůli nízké frekvenci vokalizací v některých situacích.

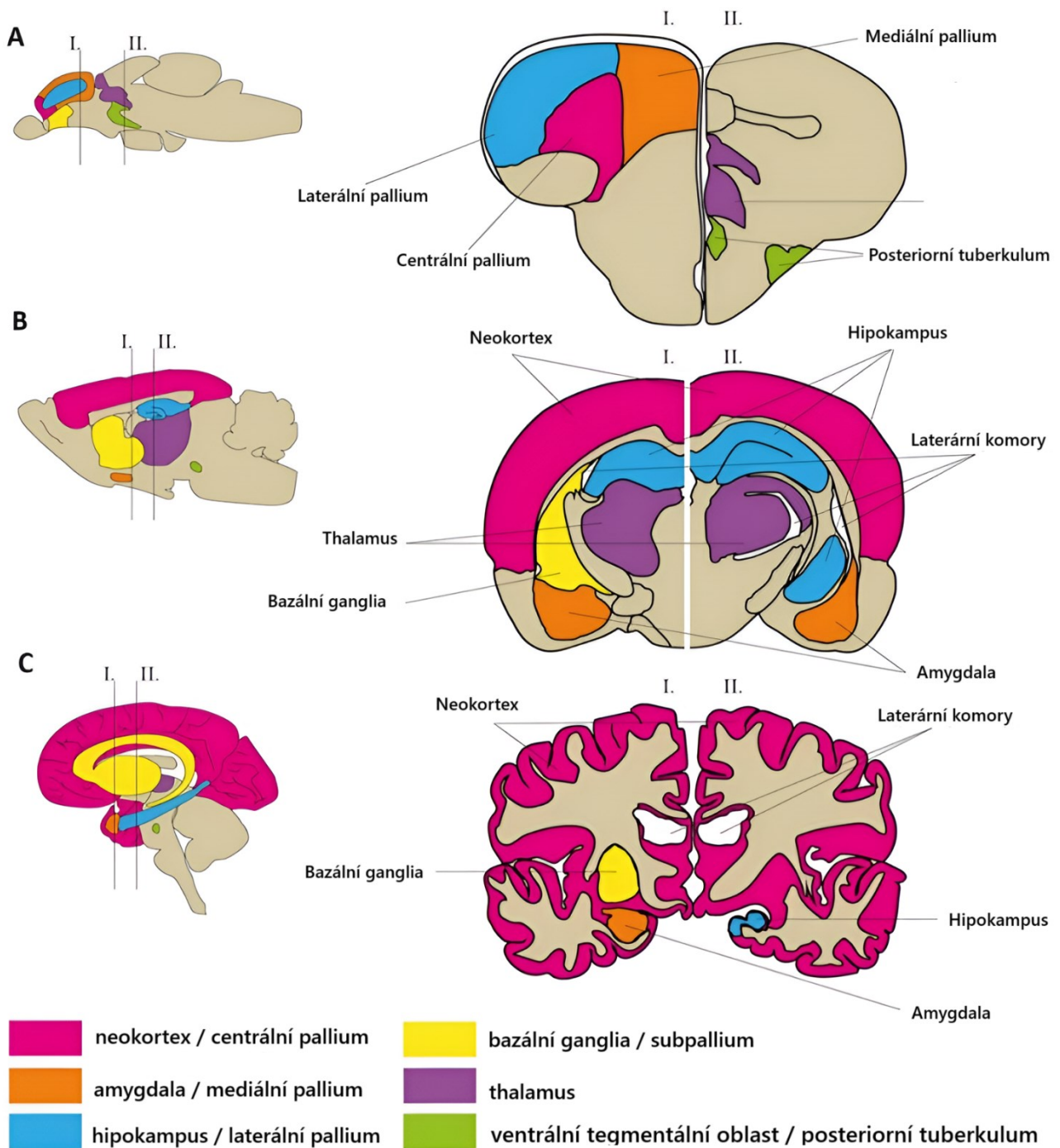
Elektrická signalizace *G. petersii* má oproti tomu sice kratší dosahovou vzdálenost než vokalizace potkanů, poskytuje však okamžitou a přesnou informaci i přes překážky ve vodním prostředí. Příjem signálu je ale podmíněn správnou funkcí elektroreceptorů (Pedraja et al., 2021). Při porovnání těchto dvou komunikačních forem je patrné, že zatímco u potkanů slouží ultrazvuková vokalizace primárně k vyjádření emočních stavů, elektrické signály u *G. petersii* představují sofistikovaný nástroj cílené komunikace. Tyto mechanismy mají pravděpodobně různé evoluční základy, kdy vokalizace u potkanů vychází z potřeby sdělovat emocionální stavy, zatímco elektrosignalizace u ryb se vyvinula jako adaptace na prostředí, kde je vizuální a zvuková komunikace omezená.

Tento rozdíl v komunikačních strategiích odráží i základní evoluční rozdíly ve vývoji mozku mezi rybami a savci. Mozek ryb a savců se vyvíjí odlišným způsobem, což je patrné z rozdílů mezi evaginací a everzí během embryonálního vývoje. U savců a některých dalších skupin obratlovců, jako jsou plazi a ptáci, dochází k evaginaci mozkových hemisfér, což vede ke vzniku vnitřních mozkových komor, jak je znázorněno na obrázku číslo 3. Naopak u paprskoploutvých ryb (*Actinopterygii*) a některých dalších skupin ryb probíhá proces zvaný everze, při kterém se hemisféry skládají směrem ven, jak je vidět na obrázku č.3. Tento rozdíl v morfogenezi vede k tomu, že mozkové hemisféry *Actinopterygii* mají jedinečné uspořádání s vnějšími mozkovými komorami oddělenými tenkou membránou, což je výrazně odlišné od struktury mozku většiny ostatních obratlovců. Navzdory těmto morfologickým rozdílům je základní organizace předního mozku mezi obratlovci poměrně zachována, což podporuje vysoce konzervované kognitivní funkce napříč různými skupinami, včetně mechanismů prostorového poznávání, které jsou založeny na homologních neurálních mechanismech u různých skupin obratlovců, včetně savců, ptáků, plazů a teleostních ryb (Kimmel et al., 1990; Mueller et al., 2011).



**Obrázek č.3:** Rozdíl ve vývoji CNS u ryby *Danio rerio* (zástupce *Actinopterygii*) a myši *Mus musculus* (zástupce savců). **A:** Koronární pohled na anteriorní neurální trubici obratlovců, ze které vzniká koncový mozek. **B:** Everze neurální trubice. **C:** Evaginace neurální trubice (Mueller et al., 2011).

Základní principy fylogenetického vývoje mozku jsou napříč živočišnými druhy vysoce konzervované díky sdíleným molekulárním mechanismům, i když samotný průběh vývoje se může mezi jednotlivými taxony výrazně lišit. Funkční homologie mozkových struktur tak zůstává zachována, přestože se jejich morfologie může během vývoje měnit (Murakami et al., 2005). Díky těmto evolučně sdíleným vlastnostem lze v určitých případech využít zvířecí modely k modelaci lidských neuropsychiatrických poruch, jako je tomu i v této práci, kde je ryba *G. petersii* použita ke studiu neurobiologie symptomů.



**Obrázek č.4:** Srovnání morfologické struktury mozku tří zástupců obratlovců s vyznačením homologních oblastí nejčastěji postižených schizofrenií. Měřítko velikosti jednotlivých mozků se liší. Obrázek znázorňuje transverzální řezy mozem **A:** mozek *Danio rerio*, **B:** mozek potkana *Rattus norvegicus*, **C:** lidský mozek *Homo sapiens*. U každého organismu jsou zvýrazněny odpovídající homologní oblasti: neokortex (centrální pallium, růžově), amygdala (mediální pallium, oranžově), hipokampus (laterální pallium, modře), bazální ganglia (subpallium, žlutě), thalamus (fialově) a ventrální tegmentální oblast/posteriorní tuberkulum (zeleně). Obrázek demonstruje evoluční rozdíly v uspořádání a relativní velikosti mozkových struktur, zejména výrazný rozvoj neokortexu a hipokampu směrem od ryb přes savce k primátům (Langova et al., 2020).

Obrázek číslo 4 porovnává mozky dvou zástupců savců a jednoho zástupce ryb, *Danio rerio*. Mozek všech tří je tvořen dvěma hemisférami označenými I. a II., přičemž hemisféry *Danio rerio* jsou při ontogenezi ohnuty směrem ven, což vede k odlišné morfologii a uspořádání struktur. Mozek *Danio rerio* je zároveň delší a užší oproti mozku savců. V důsledku evaginace je například neokortex u savců na povrchu mozku, zatímco u *Danio rerio* je ve formě centrálního pallia uvnitř. Dalším rozdílem je přítomnost vnitřních komor u savců a vnějších komor u ryb (Kimmel et al., 1990; Mueller et al., 2011).

Koncový mozek *Danio rerio* je možné funkčně rozčlenit na dorsální a ventrální oblast, což koresponduje s palliem a subpalliem (obr. 4 žlutě). Pallium se dále člení na centrální pallium (obr. 3 růžově), laterální pallium (obr. 3 modře), mediální pallium (obr. 3 oranžově), posteriorní a ventrální oblasti, které funkčně odpovídají isokortexu, hipokampu, amygdale a pyriformnímu kortexu u savců. Subpallium je pak analogické ke subkortikálnímu oblastem mozku savců (Ganz et al., 2015; Vargas et al., 2009). *G. petersii* je zařazena do třídy *Aktinopterygii*, a proto její mozek nejvíce koresponduje s nákresem mozku *Danio rerio* A na obrázku č. 3. Přes existující nesrovnalosti v porovnání mozku savců a ryb, základní morfologie je výrazně konzervovaná, což zajišťuje dobrou konstruktivní validitu daného modelu.

U člověka jako zástupce savců probíhají nejsignifikantnější změny v mozkové architektuře u pacientů se schizofrenií na zvětšení laterálních komor, v redukci v šedé a bílé hmoty v kortikálních a subkortikálních regionech (Li et al., 2025; Melicher et al., 2015). Tyto změny byly v posledních letech potvrzeny a dále rozpracovány díky pokročilým zobrazovacím technikám a novým klinickým přístupům. Ztráty šedé hmoty se neobjevují izolovaně, ale šíří se napříč specifickými mozkovými sítěmi. Tento fenomén byl označen jako síťově podmíněné šíření změn šedé hmoty "*network-based spreading of gray matter changes*", přičemž nejpostiženější byly frontotemporální oblasti, které jsou zásadní pro vyšší kognitivní funkce. Předpokládá se, že počáteční mozková patologie začíná v přední části hipokampu, odkud se může dále rozšiřovat a ovlivňovat další propojené oblasti (Chopra et al., 2023). Atrofie určitých mozkových struktur a drah může být do jisté míry reverzibilní, studie využívající elektrošokovou terapii ECT (electroconvulsive therapy) a magnetickou záchvatovou terapii MST (magnetic seizure therapy) prokázaly, že tyto intervence vedou k nárůstu tloušťky mozkové kůry, zejména v prefrontálních oblastech, což podporuje hypotézu o zachované schopnosti mozkové plasticity i u pacientů se schizofrenií (Li et al., 2025). Retrogradní neuroplastické změny jsou zkoumány i u farmak, jako je paliperidon palmitate, avšak současné nálezy spíše naznačují jeho schopnost zpomalit úbytek mozkové tkáně a zachování tloušťky mozkové kůry (Tishler et al., 2023; Wang et al., 2023). Vedle farmakologických přístupů jsou předmětem zkoumání také nefarmakologické intervence, jako je aerobní fyzická aktivita, která může přispět ke zvětšení objemu hipokampu a zlepšení jeho vaskularizace (Woodward et al., 2018).

### 3. NMDA antagonisté, jejich vliv na mozkovou aktivitu, neuroplasticita

Myšlenka, že patofyziologie schizofrenie může souviset se změnami v glutamátergním systému, byla poprvé formulována na základě pozorování účinků nekompetitivních NMDA antagonistů, jako je PCP (fencyklidin), které u zdravých jedinců vyvolávají psychotické symptomy a kognitivní deficity podobné schizofrenii (Luby et al., 1962). Dnes na základě mnoha let výzkumu je zjevné, že alternace glutamátergní transmise hraje hlavní roli v etiopatologii schizofrenie (Muguruza and Callado, 2022).

V této souvislosti se ukazuje, že změny v neuroplasticitě, což je základní biologický fenomén, umožňující morfologickou a funkční adaptaci mozku na měnící se vnější i vnitřní podmínky, mohou hrát zásadní roli v patofyziologii schizofrenie (Surti et al., 2023). Neuroplasticita nejen podporuje evoluční adaptabilitu a přežití organismu, ale také se podílí na patogenezí řady neuropsychiatrických poruch, včetně schizofrenie, kde je změněná glutamátergní transmise přímo spojena s narušenými mechanismy neuroplasticity (Mishra et al., 2021; Sehatpour et al., 2023).

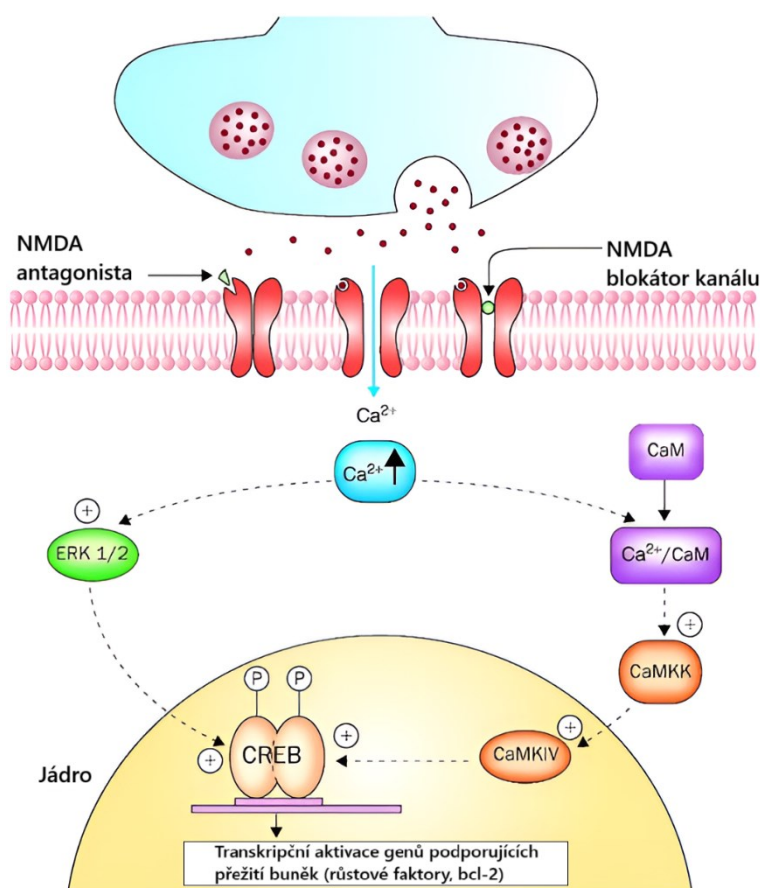
Neuroplasticita je zprostředkována NMDA receptory, které jsou klíčové pro modulaci synaptické síly, což je zásadní pro mechanismy učení a paměti (Alkadhi, 2021). Nadměrná aktivace NMDA receptorů, označovaná jako excitotoxicita, vede k poškození neuronů. Tomuto procesu lze zabránit, nebo jej alespoň potlačit, použitím NMDA antagonistů, kteří se vážou na NMDA receptory a blokují jejich aktivaci (Pichardo-Rojas et al., 2023).

#### 3.1 NMDA receptory

NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptory jsou klíčové ionotropní glutamátové receptory, umožňující dlouhodobé posilování synapsí, čímž zprostředkovávají schopnost učení a paměti. Narušení fyziologické homeostázy NMDA receptorů je ale úzce spjato s mnoha neuropsychiatrickými chorobami, jako je například schizofrenie, deprese, či epilepsie (Scimemi et al., 2006). Modulace těchto receptorů může mít antidepresivní účinky, jak dokládají nové klinické studie hodnotící účinnost esketaminu, antagonisty NMDA receptoru, u pacientů s akutní depresí (Falkenberg et al., 2023) nebo u pacientů s pooperační depresí (Yu et al., 2023). Tyto receptory patří do skupiny glutamátem aktivovaných receptorů. Glutamát, jako hlavní excitační neurotransmitter v CNS savců, aktivuje dva typy receptorů, ionotropní a metabotropní. Metabotropní receptory se dělí do 8 rodin a ionotropní do 3 funkčních skupin. Ionotropní receptory jsou pojmenovány podle umělého agonisty, kterým byly původně selektivně aktivovány při jejich identifikaci. Ionotropní jsou mimo NMDA receptoru, i AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazolepropionová kyselina) receptor a kainátový ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina) receptor (Kew and Kemp, 2005). Aktivace AMPA receptoru se vyznačuje rychlým nástupem a ukončením aktivity, na rozdíl od NMDA receptoru, u kterého probíhá aktivace a deaktivace pomaleji. Aktivace NMDA receptorů je většinou závislá na předchozí

aktivaci AMPA receptorů, které indukují depolarizaci membrány, čímž dochází k odstranění hořečnatých iontů z NMDA receptorů (Hansen et al., 2017; Lipton, 2005).

NMDA receptor je heterotetramer, většinou složen ze dvou podjednotek vázající glycinu GluN1 a dvou podjednotek vázajících glutamát GluN2. Je umístěn v membráně neuronu, kdy při aktivaci funguje jako kanál pro  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{K}^+$  ionty (Lü et al., 2017). Aktivace tohoto receptoru vyžaduje současnou přítomnost dvou druhů agonistů, glutamátu a glycinu, a zároveň změnu membránového potenciálu (Paoletti et al., 2013). Změna membránového potenciálu slouží k odblokování receptoru, který je obsazen iontem  $\text{Mg}^{2+}$  (Marwick et al., 2019). Aktivace receptoru vede k rozběhnutí signalizačních kaskád v důsledku zvýšené koncentrace intracelulárního vápníku, jak je vidět na obrázku číslo 5. Vysoká intracelulární koncentrace vápníku vede k fosforylaci cAMP (cyclic adenosine monophosphate) responsivního elementu CREB (cAMP response element binding protein) v jádře, a to buď skrze MAP (mitogen-activated protein) kinázovou dráhu ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2), nebo prostřednictvím aktivace kalcium/kalmodulin-dependentní kinázy IV (CaMKIV). Fosforylace CREB následně iniciuje transkripci genů důležitých pro přežití, jako jsou růstové faktory nebo Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Ikonomidou and Turski, 2002).



**Obrázek č. 5:** Aktivace NMDA receptoru vedoucí k influxu vápníku a zvýšení koncentrace vápníku intracelulárně. Schéma znázorňuje signální dráhy aktivované průchodem  $\text{Ca}^{2+}$  iontů přes NMDA receptory a

*jejich vliv na transkripční aktivaci genů podporujících přežití buněk. Po navázání glutamátu a glycinu na NMDA receptor a následném odstranění hořčnatého iontu dochází k otevření iontového kanálu a influxu  $Ca^{2+}$  do postsynaptického neuronu. Zvýšená intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  aktivuje dvě klíčové signální cesty: MAPK/ERK dráha:  $Ca^{2+}$  aktivuje kaskádu vedoucí k aktivaci ERK1/2, která následně přispívá k fosforylaci transkripčního faktoru CREB.  $Ca^{2+}$ /CaM dráha:  $Ca^{2+}$  váže kalmodulin (CaM), který aktivuje CaM-kinázovou kaskádu (CaMKK → CaMKIV), rovněž vedoucí k fosforylaci CREB. Fosforylovaný CREB v jádře indukuje transkripci genů podporujících přežití buněk, jako jsou růstové faktory a bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Vlevo je znázorněn účinek NMDA antagonistů, kteří kompetitivně blokují receptor, a vpravo NMDA kanálových blokátorů, neboli unkompetitivních antagonistů, kteří zabraňují průchodu iontů po aktivaci receptoru (Ikonomidou and Turski, 2002).*

Tyto excitační receptory jsou nezbytné pro mechanismy učení a paměti, přičemž jejich dysfunkce je asociována s různými neurologickými a psychiatrickými onemocněními a je především studována kvůli excitotoxicitě (Tang et al., 2023). Excitotoxicita je proces nadměrné stimulace NMDA receptoru v důsledku spuštění signálních kaskád pro reaktivní formy kyslíku, dusíku, mitochondriální dysfunkce, až aktivace buněčné smrti (Choi, 2020). Receptor lze modulovat nejen antagonisty, jak je vidět na obrázku číslo 5, ale i endogenními modulatory receptoru jako je hořčík, zinek, spermidin, kynureninová kyselina, pregnanolon sulfát nebo  $H^+$  (Ghafari et al., 2015; Vyklicky et al., 2014).

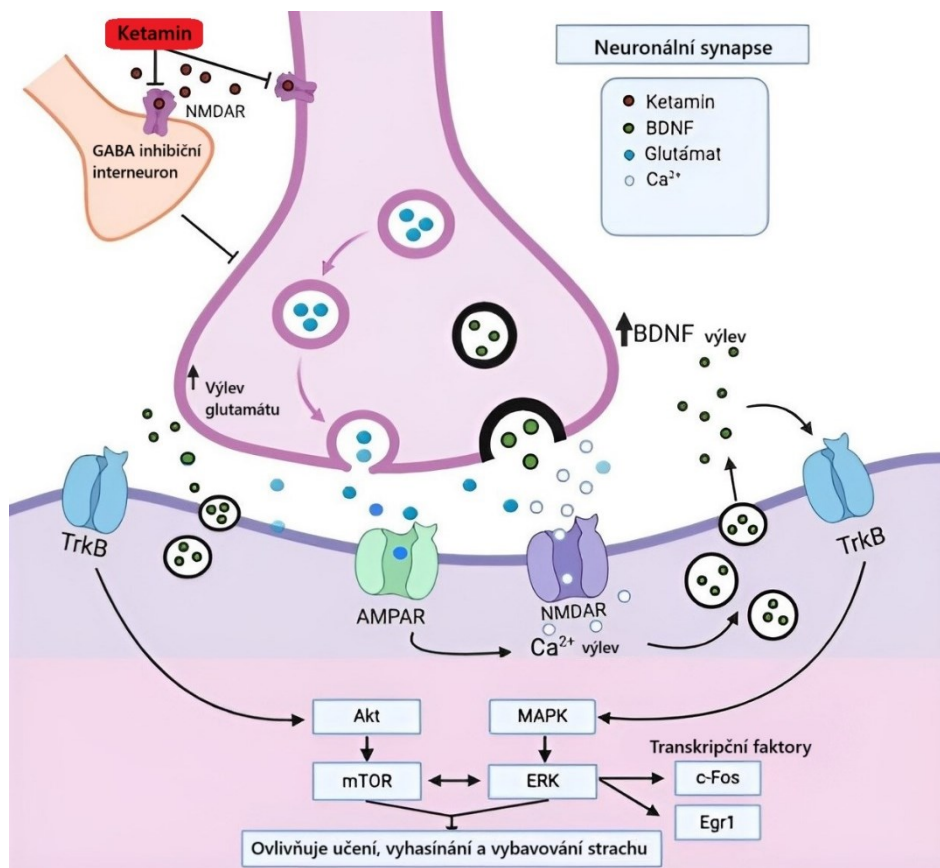
### 3.2 NMDA antagonisté

NMDA antagonisté jsou skupinou látek, které mají schopnost inhibovat aktivitu NMDA receptoru jeho modulací. Vykazují odlišnou afinitu k receptoru a podle způsobu inhibiční modulace těchto receptorů je lze rozdělit na kompetitivní, nekompetitivní a unkompetitivní antagonisty. Kompetitivní antagonismus je charakteristický kompeticí mezi antagonistou a agonistou o vazebné místo na receptoru, zatímco u nekompetitivního antagonismu se antagonist váže na své specifické místo na receptoru. U unkompetitivního antagonismu je nezbytná aktivace receptoru agonistou, po které teprve může antagonist receptor blokovat (Chen and Lipton, 2006). Tento typ antagonismu je v literatuře znám také jako use-dependentní antagonismus. Při zařazování jednotlivých antagonistů do skupin nekompetitivních a unkompetitivních antagonistů lze pozorovat rozdíly. Na základě hodnot  $IC_{50}$  (minimální koncentrace antagonisty potřebná k inhibici 50 % receptorů) se autoři často liší v klasifikaci těchto antagonistů (Hedegaard et al., 2012; Olney et al., 2006). Dále budou zmíněni antagonisté glutamátu, ale existují i antagonisté glycinu vázající se na glycinB neboli strychnin-insenzitivní místo (Parsons, 2001).

Pro funkci kompetitivních antagonistů je důležitá nejen jejich koncentrace, ale i koncentrace agonisty, se kterým soutěží o vazné místo na receptoru. Do této skupiny patří například antagonisté jako: D-CPP-en (SDZ EAA 494), CGS 19755 a (R)-AP5 (2-amino-5-fosfonopentanová kyselina), kteří se váží na místo pro glutamát.

Tyto látky pomáhají při studiu funkce receptorů, ale jejich terapeutické využití zatím nebylo uvedeno do praxe (Boast et al., n.d.; Feng et al., 2005; Khormali et al., 2022).

Nekompetitivní antagonisté inhibují receptor skrze vazbu na své specifické místo, tudíž v tomto případě nezáleží na koncentraci agonisty. Nejdůležitějšími zástupci této skupiny jsou: ketamin, dizocilpin a fencyklidin. Ketamin existuje ve dvou isoformách R(-)-ketamin a S(+)-ketamin, jejichž farmakologické vlastnosti se mohou lehce lišit. Nejnovější studie ukazují, že zde není signifikantní rozdíl v potenci, ale S izomer vykazuje více negativně prožívanou psychopatologii, tudíž se doporučuje k terapeutickému používání R isoformy (Passie et al., 2021). Ketamin je schopen proniknout hematoencefalickou membránou, a tak působit na CNS. Jako NMDA antagonista vykazuje sedativní, anestetické, analgetické, neuroprotektivní, protizánětlivé, imunomodulační a antidepressivní účinky (Simonini et al., 2022). Ketamin aktivuje signální kaskádu, která prostřednictvím inhibice GABAergních interneuronů vede k disinhibici a následné aktivaci excitačních glutamatergních neuronů. Tato aktivace spouští transkripci genů pro mozkový neurotrofický faktor BDNF (brain-derived neurotrophic factor), který následně aktivuje mTOR (mammalian target of rapamycin) kaskádu, která je klíčová pro regulaci buněčného metabolismu, růstu, proliferace a přežití (Gordon et al., 2023). Tímto způsobem ketamin, kromě svého přímého působení na NMDA receptory, také nepřímo moduluje AMPA a GABA receptory. Takto ovlivněné synapse následně ovlivňují i serotonergní a dopaminergní transmissi (Krystal et al., 2024).



**Obrázek č. 6:** Přehled molekulárního mechanismu transkripce faktoru c-Fos po indukci ketaminem. Ketamin působí jako antagonist NMDA receptorů, primárně inhibuje tyto receptory na GABAergních interneuronech, což vede ke snížení inhibiční aktivity a následné disinhibici excitačních neuronů. To způsobuje zvýšené uvolňování glutamátu do synapse, a následné aktivaci AMPA a NMDA receptorů na postsynaptických neuronech, což umožňuje influx  $Ca^{2+}$  do buňky. Nárůst intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  spouští intracelulární signální dráhy, především MAPK/ERK a Akt/mTOR, které vedou k zvýšené expresi transkripčního faktoru c-Fos. Tento proces je klíčový pro synaptickou plasticitu a kognitivní funkce (Choi et al., 2020).

Vedle ketaminu existují i další významní nekompetitivní NMDA antagonisté, jejichž účinky na nervovou soustavu jsou předmětem intenzivního výzkumu díky jejich terapeutickému i modelovacímu potenciálu. Mezi takové látky patří například dizocilpin, který pravděpodobně snižuje neurotoxicitu způsobenou glutamatergní excitotoxicitou v některých mozkových oblastech (Kovacic and Somanathan, 2010). Zároveň však může mít toxické účinky v jiných mozkových oblastech, kde zasahuje do specifických vývojových stádií mozku. Tyto zásahy mohou vést k neurobiologickým abnormalitám, kognitivním dysfunkcím a snížené hustotě inhibičních interneuronů (Ma et al., 2020). Další hojně využívanou látkou v této souvislosti je fencyklidin (PCP), který se používá k modelování psychotických stavů u hlodavců, jelikož narušuje rovnováhu mezi excitačním a inhibičním přenosem v prefrontální kůře. Tato dysbalance vede k deficitům gama oscilací a poruchám kognitivních funkcí. Obnovení této rovnováhy představuje jeden z hlavních terapeutických mechanismů (Brown et al., 2023).

Další skupinou antagonistů jsou unkompetitivní antagonisté, kteří fungují hlavně v místech s nadměrnou koncentrací agonisty, což je dáno jejich mechanismem účinku. Mimo neuroaktivní steroidy, jako je pregnenalon sulfát a jeho analogy (Malayev et al., 2002; Vyklicky et al., 2015), do této skupiny také patří hlavně memantin, který se dnes používá v klinické praxi pro léčbu Alzheimerovy choroby, poruch autistického spektra (ASD), ADHD v pediatrii a na léčbu vývojové a epileptické encefalopatie DEE (Bago Rožankovič et al., 2021; Bouhadoun et al., 2021; Schiller et al., 2023). Tato rozmanitost NMDA antagonistů ilustruje jejich široké spektrum účinků a potenciální přínos i rizika spojená s jejich využitím, ať už v experimentálním nebo terapeutickém kontextu.

### 3.3 Projevy chování vyvolané NMDA antagonisty

NMDA antagonisté patří mezi intenzivně studované látky díky svému neuroprotektivnímu potenciálu v léčbě neuropsychiatrických onemocnění a akutních poškození mozku, například při cévní mozkové příhodě (Pichardo-Rojas et al., 2023). Vedle terapeutického využití se však uplatňují také jako nástroje pro experimentální modelování schizofrenie, a to na základě glutamátové hypotézy, která předpokládá, že hypofunkce NMDA receptorů se podílí na patofyziologii tohoto onemocnění (Vinnakota et al., 2024).

Zejména během vývoje může narušení NMDA receptorové aktivity vést k trvalým neurobehaviorálním následkům. Tyto vývojové účinky NMDA antagonistů byly prokázány zejména při neonatální expozici. Například studie z roku 2021 popisuje dlouhodobé behaviorální a kognitivní deficity po podání dizocilpinu během specifických postnatálních časových oken. Nejvýraznější poruchy byly zaznamenány při expozici dizocilpinu v 7-14 postnatálních dnech, a to v testech: rozpoznávání nových objektů (novel object recognition), rozpoznávání objektů na místě (object-to-place recognition), rozpoznávání časového pořadí objektů TOR (temporal order object recognition task), testu sociability a v kontextovém vymizení strachu (contextual fear extinction). Tyto výsledky podporují hypotézu, že narušení NMDA receptorové funkce během kritických období vývoje může přispívat k patofyziologii schizofrenie a dalších příbuzných neurovývojových poruch. Popsané změny mohou být trvalé a projevit se až v pozdějších fázích života, často ve formě strukturálních a funkčních abnormalit neuronálních sítí (Plataki et al., 2021).

Akutní účinky NMDA antagonistů, jako je ketamin, zahrnují zejména modulaci neuroplasticity, která je zásadní pro procesy, jako jsou dlouhodobá potenciace (LTP) a dlouhodobá deprese (LTD), což celkově přispívá k flexibilitě a reorganizaci neuronálních sítí. Ketamin vykazuje rapidní antidepressivní účinky, což bylo prokázáno behaviorálními testy na depresivní chování a je podpořeno up-regulací hipokampálních AMPA receptorových podjednotek GluA1 a GluA2, které hrají také důležitou roli v synaptickém posilování. Tento proces zároveň aktivuje signální dráhu mTOR, stejně jako transkripci BDNF a jeho receptoru TRKB (tropomyosin-related kinase receptor type B), což vede k zesílení synaptogeneze a neuroplasticity. Tímto mechanismem umožňuje zlepšení depresivních stavů a kognitivních funkcí u depresivních jedinců. Současně existují důkazy o funkční provázanosti mezi NMDA signalizací a inzulinovou dráhou IR/IRS (insulin receptor/insulin receptor substrate), přičemž ketamin může zvyšovat inzulinovou citlivost a podporovat přežití neuronů prostřednictvím společných intracelulárních cest, jako je PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B). Tyto nálezy naznačují, že cílení nejen na NMDA signalizaci, ale i na související metabolické dráhy může být efektivní strategií pro léčbu depresivních poruch (Hurst et al., 2024; Wong et al., 2025; Zanos et al., 2023).

Behaviorální projevy vyvolané NMDA antagonisty jsou úzce spjaty s mechanismem účinku jednotlivých zástupců. Ze studií jsou nejčastěji popisovány efekty narušení motorických funkcí, jako je hyperlokomoce (Langova et al., 2023), narušení kognitivních funkcí, jako jsou poruchy rozpoznávací paměti a sociální deficity (Morales and Spear, 2014). Akutní účinky NMDA antagonistů se projevují bezprostředně po podání a zahrnují dočasné narušení normální funkce NMDA receptorů, což ovlivňuje chování a kognici (Qin et al., 2021; Vinnakota et al., 2024).

Účinky ketaminu, nekompetitivního antagonisty NMDA receptoru, se mohou projevit v několika behaviorálních doménách, které odpovídají jednotlivým symptomatickým okruhům schizofrenie. V oblasti

pozitivních symptomů je opakovaně dokumentována zvýšená motorická aktivita, hyperlokomoce, která vzniká v důsledku narušení inhibiční regulace kortikálních neuronových okruhů. Konkrétně u ketaminu dochází v důsledku blokády NMDA receptorů na GABAergních interneuronech k oslabení inhibičního vlivu na excitační neurony v kortikálních oblastech, především v prefrontální kůře. Tato disinhibice vede ke zvýšené aktivaci glutamatergních neuronů, které následně stimulují dopaminergní dráhy mezolimbického systému, zejména projekci z ventrální tegmentální oblasti do nucleus accumbens. Tato zvýšená dopaminergní aktivita je považována za neurobiologický základ pozorovaných behaviorálních změn v lokomoci a slouží jako validní model pozitivních symptomů schizofrenie (Irifune et al., 1991; Xu et al., 2020). Ve sféře negativních symptomů byly popsány projevy sociálního stažení, jako je snížený zájem o sociální interakce a narušená sociální paměť. Tyto projevy jsou spojovány s dysfunkcí prefrontálně-limbických okruhů a narušením glutamatergní signalizace, která se zásadně podílí na regulaci sociálního chování (Gao et al., 2009; Trevlopoulou et al., 2016). Kognitivní dysfunkce se u zvířat projevují sníženou schopností rozlišit nové objekty či narušením pracovního učení, což souvisí s narušením NMDA-dependentní synaptické plasticity a dlouhodobé potenciace (LTP), především v hipokampu a prefrontální kůře (Hauser et al., 2017; Nikiforuk et al., 2016). Ukazuje se, že na kognitivních a sociálních deficitech se mohou sekundárně podílet i serotonergní dráhy. Farmakologická blokáda receptoru 5-HT<sub>5A</sub> vedla u zvířat k částečné obnově sociálního chování a paměťových schopností, což naznačuje, že serotoninový systém se může spolupodílet na modulaci těchto ketaminem navozených symptomů (Nikiforuk et al., 2016). Celý tento proces je navíc ovlivněn endokanabinoidním systémem, konkrétně aktivitou CB1 receptorů. Bylo prokázáno, že farmakologická inhibice těchto receptorů snižuje jak hyperaktivitu, tak nadměrnou dopaminergní signalizaci vyvolanou ketaminem, což podporuje hypotézu o regulační roli endokanabinoidního systému v mechanismech zodpovědných za tyto behaviorální změny (Xu et al., 2020).

### 3.3.1 U člověka - NMDA antagonisté ve vztahu ke schizofrenii

Účinky NMDA antagonistů u člověka jsou zkoumány především ve třech rovinách: (1) ve strukturních změnách mozku identifikovaných zejména *post mortem*, (2) v behaviorálních a kognitivních projevech po jejich experimentálním podání a (3) v rámci jejich terapeutického potenciálu. Nejvíce pozornosti se soustředí na schopnost těchto látek navodit stavy připomínající psychózu, a to jak u zdravých osob, tak u pacientů se schizofrenií. U jedinců se schizofrenií nebo s její predispozicí může podání NMDA antagonisty zvýšit riziko rozvoje psychotických stavů a vést k prohloubení již přítomných symptomů, jako jsou halucinace a bludy (Driesen et al., 2013; Heekeren et al., 2008; Malhotra, M.D., 1997).

Velmi charakteristickým společným znakem schizofrenie a intoxikace NMDA antagonistou jsou sluchové halucinace. Tyto halucinace se však liší v závislosti na tom, zda NMDA antagonist působí na zdravého jedince nebo na pacienta se schizofrenií, nebo její predispozicí. Zatímco u pacientů se schizofrenií ketamin často

zesiluje sluchové halucinace a paranoidní myšlenky, u zdravých jedinců jsou tyto příznaky méně časté a mohou se objevit pouze za specifických experimentálních podmínek, například v prostředí s omezenou smyslovou stimulací (Powers III et al., 2015). Z výsledků některých studií navíc vyplývá, že u zdravých jedinců ketamin častěji vyvolává změny percepce, iluze či nerealistické smyslové zážitky, spíše než klasické psychotické symptomy pozorované u pacientů se schizofrenií (Pomarol-Clotet et al., 2006).

Kromě již zmíněných příznaků se ketamin podílí i na narušení sociální kognice, konkrétně schopnosti mentalizace, tedy dovednost vnímat a interpretovat mentální stavy druhých, což je funkce, která bývá u schizofrenních pacientů často narušena. Ve srovnání s placebem vedla aplikace subanestetické dávky ketaminu u zdravých dobrovolníků ke zvýšení počtu chyb typu u mentalizace ve videozáznamovém testu sociální kognice, což naznačuje zhoršenou schopnost mentálního inferování. Tyto behaviorální změny byly doprovázeny zvýšením BOLD signálu (blood oxygen level dependent) v pravém posteriorním superiorním temporálním sulku (pSTS) a zvýšenou funkční konektivitou mezi pSTS a anteriorní oblastí precunea. Tyto změny mohou být interpretovány jako projev dysfunkčního přesunu pozornosti, který přispívá ke snížení výkonu v úlohách sociální kognice (Wasserthal et al., 2023). Kromě narušené sociální kognice byly v souvislosti s ketaminem zjištěny také změny v oblasti exekutivních funkcí, zejména v inhibici odpovědi. Funkční neurozobrazovací data ukazují, že ketamin mění mozkovou aktivitu během úloh vyžadujících inhibici motorických reakcí, přičemž výraznější aktivace byla pozorována zejména v somatosenzorické kůře. Navzdory těmto funkčním změnám nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly v behaviorálním výkonu mezi skupinou, která dostala ketamin a kontrolní skupinou. Tyto výsledky naznačují, že ketamin může ovlivňovat neuronální síť zapojené do kognitivní kontroly bez nutně patrného dopadu na výkonnost v jednodušších úlohách (Steffens et al., 2018).

Na rozdíl od ketaminu nebo PCP, které jsou spojovány s výraznými změnami vědomí a rizikem vyvolání psychózy, je memantin považován za bezpečnějšího NMDA antagonistu. Vzhledem ke své preferenční vazbě na extrasynaptické receptory a nižší afinitě, kdy působí jako unkompetitivní antagonist, vykazuje příznivě bezpečný farmakologický profil. Memantin je rovněž zkoumán jako doplňková terapie schizofrenie ke standardní antipsychotické léčbě. Výsledky studií ukazují, že může přispět ke zmírnění negativních symptomů a kognitivních deficitů u pacientů se schizofrenií, a to bez závažných nežádoucích účinků na CNS (Kikuchi, 2020). Tyto nálezy podtrhují význam NMDA receptorů nejen v patofyziologii schizofrenie, ale i v komplexní regulaci sociálních, kognitivních a behaviorálních procesů u zdravých jedinců.

### 3.3.2 U modelových druhů schizofrenie podobné symptomy

K experimentálnímu modelování symptomů schizofrenie jsou nejčastěji využívány nekompetitivní antagonisté NMDA receptorů, jako jsou PCP, ketamin a dizocilpin. Tyto látky umožňují navodit především pozitivní symptomy schizofrenie. Nejčastěji se používají laboratorní hlodavci, u nichž expozice těmto látkám

vyvolává projevy jako hyperlokomoce, stereotypní chování, narušenou prepulsní inhibici, tedy reflexní mechanismus související s filtrací sensorických podnětů, a dále kognitivní deficity, které napodobují kognitivní dysfunkce pozorované u pacientů se schizofrenií (Adell et al., 2012).

Tyto modely přinášejí důležité poznatky o neurobiologických mechanismech onemocnění, zejména ve vztahu k dysfunkci thalamokortikálních drah. Při expozici NMDA antagonistům dochází k narušení funkční konektivity mezi thalamem a kortikálními oblastmi, což může negativně ovlivnit kognitivní i percepční procesy (Klingner et al., 2014). Alterace v těchto drahách vedou k narušení gama a alfa oscilací, které jsou důležité pro synchronizaci mozkové aktivity. Tyto poznatky podporují hypotézu tzv. dyskonektivity u schizofrenie, která předpokládá, že za různorodými příznaky této poruchy stojí abnormální komunikace mezi mozkovými oblastmi. Klinické výzkumy zaměřené na modulaci thalamokortikálních drah zároveň naznačují, že obnovení synaptické rovnováhy v těchto okruzích může představovat slibnou terapeutickou strategii pro zmírnění symptomů schizofrenie (S Berndt et al., 2024).

Dizocilpin a PCP vykazují u laboratorních hlodavců podobné behaviorální projevy, což je mimo jiné připisováno jejich nepřímému ovlivnění dopaminergního systému. Mezi pozorované projevy patří ataxie, čichání, hyperlokomoce, rotace hlavy, couvání a otáčivé pohyby (Masayuki Hiramatsu et al., 1989). I nejnovější studie popisují symptomy pozorované u schizofrenie. V následující zmíněné studii byli použiti NMDA antagonisté jako PCP, S-ketamin a R-norketamin. Ukázalo se, že podjednotka GluN2D hraje zásadní roli v nepřímém zprostředkování hyperlokomočního chování po expozici NMDA antagonistům, kdy výraznější ovlivnění bylo pozorováno u samců. U úzkostných fenotypů GluN2D-KO byly pozorovány anxiolytické účinky R-norketaminu, S-ketaminu i PCP, kdy samice tohoto fenotypu vykazují silnější úzkostné chování. Zatímco účinky R-norketaminu a S-ketaminu se ukázaly jako závislé na pohlaví a genotypu, efekt PCP se těmito faktory pravděpodobně neřídí. Tato zjištění přispívají k porozumění sexuálního dimorfismu v odpovědi na NMDA antagonisty a poukazují na důležitou úlohu podjednotky GluN2D při zprostředkování těchto účinků (Vinnakota et al., 2024).

Ketamin je rovněž široce využíván k modelování schizofrenie podobných symptomů i u nehumánních primátů. Experimenty ukazují, že jeho podání vyvolává dávkově závislé narušení kontextového zpracování informací, funkce, která je významně narušena u pacientů se schizofrenií. Tento deficit zahrnuje sníženou schopnost flexibilně reagovat na měnící se stimuly a integraci kontextuálních podnětů. Následné zhoršení kognitivních funkcí, jako je plánování a rozhodování, vykazuje výraznou podobnost s poruchami typickými pro schizofrenii (Blackman et al., 2013).

Farmakologické modely schizofrenie založené na NMDA antagonistech dobře napodobují akutní pozitivní příznaky, jejich schopnost postihnout komplexní povahu onemocnění, včetně dlouhodobých neurovývojových změn, je však omezená (Nakazawa et al., 2017). Přestože tyto modely poskytují užitečné

poznatky o dysfunkci thalamokortikálních drah a genetických faktorech, jako je role podjednotky GluN2D, stále zůstává otázkou jejich relevance pro širší spektrum symptomatiky, zejména ve vztahu k negativním a kognitivním deficitům (Bygrave et al., 2019). Přestože farmakologické modely založené na NMDA antagonistech přinášejí důležité poznatky o jednotlivých aspektech schizofrenie, jejich schopnost postihnout komplexní klinický obraz onemocnění zůstává omezená. Výsledky však naznačují, že rozšíření těchto modelů o molekulární a individuální faktory, jako je genotyp nebo pohlaví, může přispět k jejich větší relevanci a otevřít cestu k cílenějším terapeutickým přístupům.

## 4 Metody sledování mozkové aktivity

V návaznosti na předchozí kapitulu, která se věnovala vlivu NMDA antagonistů na neuronální plasticitu a mozkovou aktivitu, tato část rozpracovává metodické přístupy využívané ke sledování těchto změn. Mozkovou aktivitu lze studovat pomocí různých výzkumných metod, které zahrnují jak přímé záznamy elektrické aktivity neuronů, tak zprostředkované indikátory buněčné aktivity nebo behaviorálních projevů. Jedním z hlavních přístupů je sledování markerů mozkové aktivity, biologických ukazatelů, které umožňují kvantifikovat specifické procesy, jako je synaptická signalizace, metabolismus či genová exprese. Dalšími metodami jsou elektrofyziologické techniky pro měření elektrické aktivity v reálném čase nebo behaviorální pozorování, která přinášejí funkční vhled do změn chování jako důsledku neuronální aktivity. Tyto metody přispívají k pochopení mechanismů, které regulují mozkovou činnost v normálních i patologických stavech (Park et al., 2025).

Tato kapitola přehledně shrnuje hlavní metodické přístupy používané v této práci, histologické, elektrofyziologické a behaviorální, a vysvětluje jejich význam pro studium mozkové činnosti v experimentálním kontextu. Histologické metody poskytují detailní informace o molekulárních a buněčných změnách v přesně definovaném časovém bodě, zatímco elektrofyziologické metody umožňují sledování neuronální aktivity v reálném čase. Tyto přístupy se vzájemně doplňují a společně poskytují komplexní pohled na mozkové funkce (Helbling et al., 2015).

### 4.1 Histologické metody a jejich využití pro detekci neuronálních markerů

Histologické metody patří mezi klíčové nástroje pro studium strukturální i funkční organizace mozku na buněčné a subbuněčné úrovni. Umožňují detailní vizualizaci a kvantifikaci markerů neuronální aktivity v prostorově vysoce rozlišeném kontextu. Jejich hlavní výhodou je vysoká specifita a citlivost, mezi limitace však patří nutnost fixace tkáně a ukončení života zvířete, což omezuje možnost longitudinálních studií a sledování dynamiky aktivity v čase. Histologické techniky se proto často kombinují s *in vivo* metodami, což umožňuje získat komplexnější obraz mozkové funkce (Umesh Rudrapatna et al., 2014).

Vzhledem k široké škále molekulárních mechanismů, které lze sledovat pomocí histologie, je vhodné jednotlivé metody klasifikovat podle jejich funkčního zaměření. V rámci této práce jsou histologické markery rozděleny do pěti kategorií na základě přehledu recentní literatury: IEGs (Immediate Early Genes), GECIs (genetically encoded calcium indicators), synaptické markery, metabolické markery a markery synaptické plasticity.

### **IEGs (immediate early genes)**

Mezi tyto markery patří například IEGs, jejichž exprese je závislá na aktivaci buňky a které následně regulují další buněčné procesy (Das et al., 2023). Mezi nejčastěji využívané IEGs patří c-Fos, který je díky svému rychlému a krátkodobému nárůstu exprese po neuronální aktivaci ideálním markerem pro mapování aktivovaných oblastí mozku. Z metodologického hlediska je c-Fos vhodný zejména pro imunohistochemickou detekci, což z něj činí praktický nástroj i pro účely této práce. Podrobněji se problematice IEGs a jejich významu v neuronální aktivitě věnuje kapitola 4.1.1.

### **GECIs (genetically encoded calcium indicators)**

K detekci zvýšené intracelulární koncentrace vápníku se využívají indikátory jako GECIs, které vizualizují změny pomocí fluorescence (Grienberger and Konnerth, 2012). Alternativně lze použít na vápníku závislá barviva, která mění spektrální vlastnosti po navázání vápenatého iontu. Tato barviva se dělí na ratiometrická barviva (např. Fura-2, Indo-1) a jednovlnová (Fluo-4, Calcium Green). Intenzita ratiometrických barviv, na rozdíl od jednovlnových, nezávisí na koncentraci barviva, intenzitě osvětlení a délce optické dráhy, což umožňuje přesnější měření bez artefaktů (Barreto-Chang and Dolmetsch, 2009).

### **Synaptické markery**

Mezi markery neuronální aktivity lze zařadit i synaptophysin, který označuje synaptické váčky a reguluje transport Synaptobrevinu-2 (Syb2). Syb2 je nejvíce zastoupený protein synaptického váčku, který řídí fúzi prostřednictvím interakce se SNARE proteiny na presynaptické membráně. Synaptophysin je využíván ke studiu synaptické hustoty a neurotransmitterové signalizace (Cousin, 2021).

### **Metabolické markery**

Jako markery specifické pro glutamátergní transmissi v CNS lze využít VGLUT transportéry. Tyto transportéry jsou zodpovědné za plnění váčků glutamátem v neuronech a u savců byly identifikovány tři isoformy: VGLUT1, VGLUT2 a VGLUT3. Jako markery se nejčastěji používají VGLUT1 a VGLUT2, protože jsou v CNS hojněji zastoupeny (Liguz-Lecznař and Skangiel-Kramska, 2007).

Cytochrom C oxidáza (COX) slouží jako další marker neuronální metabolické aktivity, který často koreluje s neuronální aktivitou. Tento klíčový enzym v elektronovém transportním řetězci v mitochondriích je sledován ve své oxidované formě, která reflektuje stav oxygenace buňky. Snížené hladiny oxidované formy COX byly zaznamenány i u pacientů s depresí, přičemž jejich úroveň negativně korelovala s mírou závažnosti

symptomů, což naznačuje potenciální využití COX jako indikátoru účinnosti antidepressivní léčby (Holper et al., 2019). Metabolickou aktivitu lze také měřit pomocí markerů glukózového metabolismu, jako je 2-deoxyglukóza (2-DG). Její syntetický analog, 2-fluoro-2'-deoxyglukóza, je využíván k zobrazování zvýšeného glukózového metabolismu pozitronovou emisní tomografií (PET). Je však důležité poznamenat, že PET je *in vivo* zobrazovací metoda a nepatří mezi histologické metody, přestože využívá metabolické markery. Tato metoda je primárně využívána k diagnostice nádorového bujení, které je charakterizováno vyšším metabolismem glukózy (Gagel et al., 2004).

### **Markery synaptické plasticity**

Jedním z důležitých ukazatelů změn v synaptické plasticitě je CREB (cAMP response element-binding protein). Hladina jeho fosforylované formy, fosfo-CREB, v T-lymfocytech periferní krve koreluje s pozitivní odpovědí na antidepressivní léčbu (Koch et al., 2002). Fosfo-CREB je rovněž analyzován v mozkové tkáni v kontextu mechanismů učení a paměti, neboť změny jeho fosforylace úzce souvisejí se synaptickým posilováním (Scott Bitner, 2012).

Histologické metody tak tvoří zásadní pilíř experimentální neurovědy, neboť umožňují detailní mapování mozkové aktivity na buněčné a molekulární úrovni. Jejich kombinace s dalšími metodami dále rozšiřuje možnosti komplexního porozumění mozkové funkci.

#### **4.1.1 Immediate early genes IEGs**

Vzhledem k zaměření této práce na farmakologickou modulaci neuronální aktivity pomocí ketaminu je zvláštní pozornost věnována IEGs, především proteinu c-Fos, který byl použit jako marker neuronální aktivity v experimentální části této práce.

Immediate early genes (IEGs) představují skupinu genů, jejichž exprese je rychle indukována neuronální aktivací a které hrají zásadní roli v regulaci synaptické plasticity a neuronální odpovědi. Tyto geny jsou charakteristické rychlou dynamikou iniciace transkripce a translace (Das et al., 2023). Exprese IEGs je ovlivňována růstovými faktory, hormony a peptidy. Na základě strukturálních a funkčních znaků lze IEGs rozdělit do několika rodin: Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2), Jun (c-Jun, JunB, JunD) a Krox (Krox-20, Krox-24). Po translaci do proteinů fungují jako indukovatelné transkripční faktory ITFs (inducible transcription factors) nebo kódují sekretorní proteiny, enzymy a membránové receptory. Pokud fungují jako transkripční faktory, vážou se na promotorové nebo enhancerové sekvence DNA, a tím regulují expresi cílových genů, které jsou nezbytné pro regulaci buněčné odpovědi (Herdegen and Zimmermann, 1995).

IEGs představují klíčové regulátory neuronální plasticity, které reagují na široké spektrum vnějších a vnitřních podnětů. Jejich rychlá exprese a následná regulace cílových genů představuje základní mechanismus adaptivních změn v nervovém systému. Díky tomu se IEGs zásadně podílejí na procesech učení, tvorby paměti

a reakce na stresové situace. V experimentálním výzkumu se využívají jako markery neuronální aktivity, které umožňují mapování aktivovaných neuronálních okruhů a rozlišení funkčně odlišných neuronálních populací (Meenakshi et al., 2020).

#### 4.1.1.1 c-Fos

C-Fos patří mezi nejčastěji využívané markery neuronální aktivity a je členem rodiny Fos genů, která spadá do skupiny immediate early genes (IEGs). Jako transkripční faktor se podílí na regulaci řady buněčných procesů, včetně růstu, diferenciaci a synaptické plasticity. Expresi genu pro c-Fos je indukována širokou škálou extracelulárních signálů, včetně růstových faktorů, neurotransmiterů a stresových podnětů (Rawat, V., 2015).

Po aktivaci tvoří protein c-Fos heterodimer s proteinem c-Jun, dalším členem rodiny IEGs, a společně tak tvoří komplex AP-1 (activator protein 1). Komplex AP-1 je schopen rozpoznat AP-1 responsní element v promotorovém a enhancerovém místě cílových genů, a tak regulovat jejich expresi. Tyto cílové geny ovlivňují buněčnou proliferaci, transformaci a buněčnou smrt (Shaulian and Karin, 2002).

Aktivace genu pro c-Fos vede k iniciaci transkripce DNA sekvence do mRNA, která je pak translatována do c-Fos proteinu. Sekvence mRNA obsahuje specifické sekvence, které umožňují translaci i v případě, že je celková buněčná proteosyntéza omezená. Tyto sekvence obsahují interní ribozomální místa IRES (internal ribosome entry site), které jsou lokalizovány na 5' UTR (5'-untranslated region). Tyto místa následně ovlivňují up-regulaci a down-regulaci c-Fosu, což bylo studováno na buňkách infikovaných různými viry, které jsou schopny regulovat aktivitu IRES (Li et al., 2021). Proteiny c-Fos a c-Jun podléhají aktivaci prostřednictvím fosforylace, kterou zprostředkovává signální dráha MEK–ERK (MAPK/ERK kinase) (Shi et al., 2014).

Transkripce genu pro c-Fos a jeho translace do c-Fos proteinu není specifická pro neurony a gliální buňky. C-Fos se vyskytuje i v ostatních buňkách, přičemž jeho indukce závisí na typu signálu, kterému jsou buňky vystaveny a na jejich specifické biologické funkci (Lara Aparicio et al., 2022). Díky své schopnosti označovat aktivované neurony je však c-Fos často využíván jako marker neuronální aktivity, zejména v experimentech zaměřených na neuroplasticitu a neurologické poruchy (Schuler et al., 2022).

Změny v expresi c-Fosu byly popsány i v kontextu patologických stavů mimo nervový systém. Například u potkanů po infarktu myokardu bylo pozorováno zvýšení počtu c-Fos imunoreaktivních buněk v paralimbických oblastech mozku, především v cingulární a pyriformní kůře. Expresi se zvýšila třetí den a vrcholila mezi 7. a 14. dnem po ischemii, kdy postupně klesala do 56. dne, což naznačuje zapojení c-Fosu do centrální odpovědi na periferní stresory. Tato časově závislá změna v expresi c-Fosu ukazuje nejen na vliv infarktu myokardu, ale také na jeho zapojení do reakcí CNS na stresové podněty a regulačních procesů neuronální aktivity (Ahn et al., 2015).

Studie ukazují, že vzorce exprese c-Fosu se liší mezi jednotlivými živočišnými druhy, přičemž u primátů, na rozdíl od hlodavců, vykazuje regionální variabilitu a delší trvání exprese. Tyto rozdíly mohou odrážet vyšší komplexitu kognitivních funkcí u primátů, což zdůrazňuje důležitost c-Fosu nejen jako markeru aktivity, ale i jako indikátoru kognitivních procesů (Barros et al., 2015).

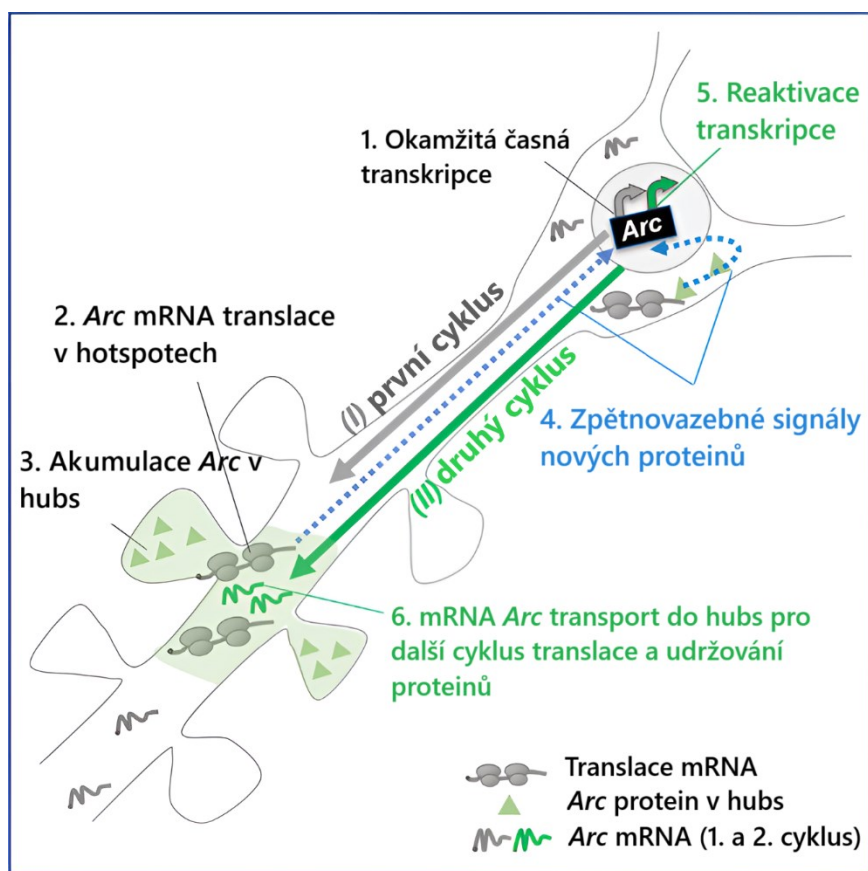
C-Fos hraje klíčovou roli nejen v neuronální aktivaci, ale také v normálním vývoji a funkci organismu, což bylo pozorováno na KO modelech myši a potkanů, pro *Fos* gen. Homozygotní c-Fos KO potkani vykazovali zpoždění v růstu a abnormality zubů a kostí, podobně jako homozygotní c-Fos KO myši. U heterozygotních c-Fos KO potkanů nebyly pozorovány změny fenotypu, proto se jeví jako vhodnou variantou pro neurofyziologické experimenty. Z výsledků studie se předpokládá, že funkce genu pro c-Fos je mezi těmito druhy konzervovaná (Yoshimura et al., 2023).

Bazální exprese c-Fosu je v neaktivních neuronech velmi nízká až nedetekovatelná, zatímco po aktivaci prudce roste. Jeho exprese je na aktivitě závislá a stabilita mRNA velmi krátká. Časové okno nejvyšších hladin proteinu je relativně úzké, většina zdrojů mluví o 1-2 hodinách, kdy se vrchol exprese mRNA obvykle objevuje během 30–90 minut po stimulaci (Bojovic et al., 2015; Owen et al., 1987; Yang et al., 2019). Vizualizace c-Fosu se obvykle provádí pomocí imunohistochemických metod a mikroskopie, zaměřených na mRNA nebo protein. Kromě standardních metod se využívají i pokročilé techniky, jako je fluorescenční in situ hybridizace (FISH) nebo tyamin-amplifikační imunohistochemie pro zesílení signálu. Systém CANE (Capturing Activated Neural Ensemble), který využívá geneticky modifikované modely a modifikované lentiviry, je navržen k selektivnímu zachycení a manipulaci specifických neuronálních souborů na základě jejich aktivity, čímž se zvyšuje přesnost a hloubka analýz neuronálních reakcí na farmakoterapii. Tyto moderní zobrazovací techniky významně přispívají k porozumění molekulárním mechanismům fyziologických i patologických procesů a zároveň umožňují detailní analýzu komplexních neuronálních struktur v jejich funkčním a systémovém kontextu (Sakurai, 2024).

#### 4.1.2 Ostatní markery mozkové aktivity

Kromě výše zmíněného IEG c-Fos je dalším široce využívaným markerem mozkové aktivity protein Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein), který je nezbytný pro konsolidaci paměti, protože se podílí na regulaci dlouhodobé paměti a synaptických změn. V reakci na neuronální aktivaci dochází ke spuštění opakovaných cyklů transkripce genu pro Arc, při kterých vzniká Arc mRNA. Ta je následně transportována do dendritů, kde dochází k její translaci do Arc proteinu. Protein Arc následně pozitivní zpětnovazebnou smyčkou podporuje další transkripci genu pro Arc. Proteiny Arc se koncentrují ve specifických strukturách zvaných hubs, zatímco jejich mRNA je lokalizována v tzv. hotspots, tedy místech aktivní translace. Jediný stimulační podnět může vést k amplifikaci prostřednictvím transkripto-translačních cyklů, čímž vzniká mechanismus, kterým krátkodobá paměť podporuje paměť dlouhodobou. Deficity v této

signální dráze mohou být spojeny s kognitivními deficity, což potvrzuje důležitost proteinu Arc pro normální funkci mozku (Das et al., 2023).



**Obrázek č. 7:** Schéma pozitivní zpětnovazební smyčky Arc proteinu v rámci transkripto-translačního cyklu. 1: Po iničiální neuronální aktivaci dochází k expresi Arc genu, 2: translaci Arc mRNA v tzv. hotspotech a 3: následné akumulaci Arc proteinů v místech označovaných jako hubs. 4: Nově syntetizované proteiny poskytují zpětnovazební signály, 5: které vedou k reaktivaci transkripce Arc genu. (6) mRNA je transportována do hubs, čímž je spuštěn druhý cyklus translace. Tento mechanismus umožňuje zesílení synaptické odpovědi a podporuje konsolidaci dlouhodobé paměti (Das et al., 2023).

Dalším markerem mozkové aktivity je Egr1, také známý jako Zif268. Tento transkripční faktor je esenciální pro stabilizaci synaptické plasticity v dentálním gyru hipokampu a hraje významnou roli při konsolidaci a rekonolidaci paměti (Cheval et al., 2012). Kromě toho se Egr1 účastní regulace transkripčních odpovědí imunitních buněk během zánětlivých reakcí, a proto jej lze využít jako ukazatel závažnosti zánětlivých stavů (Khan et al., 2019). Expres Egr1 je rychle indukována v selektivních mozkových okruzích v reakci na specifické formy učení nebo vybavení paměti, což podtrhuje jeho úlohu v dlouhodobém uchování informací. Jedna ze studií na výzkum strachové paměti při učení a znovuvybavení vzpomínek porovnávala aktivaci LTP v oblasti

CA1 a dentálního gyru a popsala zvýšenou vazbu transkripčních faktorů Egr1 a Egr3 na ERE (*Egr response element*) na DNA, zatímco Egr2 tuto aktivitu nevykazoval. Studie naznačuje složitou regulační dynamiku, která může být v různých částech hipokampu odlišná. Tato specifická regulace a interakce s dalšími transkripčními faktory, jako je c-Fos, naznačuje, že Egr1 nejen reguluje transkripci přes ERE, ale také prostřednictvím jiných DNA responsních elementů, což přispívá k jeho komplexní roli v neuronální plasticitě a paměťových procesech (Cheval et al., 2012).

Markery mozkové aktivity, zejména ty ze skupiny IEGs jako c-Fos, Arc a Egr1, představují zásadní komponenty neuronální odpovědi a regulace synaptické plasticity, která je klíčová pro procesy učení a paměti (Herdegen and Zimmermann, 1995). Tyto geny a jejich proteinové produkty poskytují cenný vhled do mechanismů, jimiž mozek reaguje na různé podněty a adaptuje se na ně, což má přímý význam pro procesy dlouhodobé paměti a uchování informací (Barry et al., 2016). Výzkum ukazuje, že jednotlivé IEGs mohou vykazovat specifické, a často i regionálně odlišné funkce napříč různými oblastmi mozku, což podtrhuje jejich komplexní úlohu v neuroplasticitě. Porozumění vzájemným interakcím a regulačním drahám těchto genů je zásadní pro objasnění jejich úlohy v kognitivních procesech a může přispět k identifikaci nových terapeutických cílů pro léčbu kognitivních poruch (Das et al., 2023).

Zatím žádná jednotlivá metoda nedokáže plně vystihnout absolutní komplexitu mozkové aktivity, nabízející komplementární informace od funkčních změn na úrovni jednotlivých neuronů až po aktivitu celých mozkových okruhů. Kombinace různých metod tak umožňuje nejen prostorové a časové mapování neuronální aktivity, ale i propojení strukturální a behaviorální roviny. Tato strategie je využita i v experimentální části této práce, kde je měřena behaviorální odpověď, elektrická aktivita a exprese transkripčního faktoru c-Fos, jako markeru neuronální aktivity. Integrovaný přístup tak zvyšuje validitu zjištěných výsledků a přispívá k hlubšímu pochopení účinku NMDA antagonistů na mozkovou činnost u modelového organismu.

## 4.2 Elektrofyziologické metody

Elektrofyziologické metody slouží k přímému záznamu elektrické aktivity mozku v reálném čase a představují tak zásadní přístup ke sledování funkčních markerů neuronální činnosti. Na rozdíl od histologických metod umožňují elektrofyziologické metody kontinuální sledování mozkové aktivity během spontánního chování i při expozici specifickým experimentálním podmínkám.

V rámci elektrofyziologických přístupů je důležité rozlišit invazivní a neinvazivní metody záznamu. Nejčastěji preferovanou volbou pro studium mozkové aktivity u lidí a větších zvířat je neinvazivní EEG. EEG odráží sumární elektrickou aktivitu populace neuronů v dané oblasti a tak je schopno zachytit rychlé elektrické změny mozku (Jiricek et al., 2021; Nakamura et al., 2020). Ačkoli se EEG používá i u hlodavců, u menších

živočichů se může setkat s omezeními kvůli náročné instalaci elektrod. Tento přístup vyžaduje specifické úpravy a inovace, aby byl přizpůsoben menším anatomickým strukturám, zajišťující přesné a spolehlivé záznamy mozkové aktivity bez rušení přirozeného chování organismu (Lundt et al., 2016). Tato neinvazivní forma metody je však omezena svou rozlišovací schopností a hloubkou, do níž dokáže zobrazovat mozkové struktury, a její použití je zároveň nákladnější.

V klasických laboratorních experimentech, zejména na hlodavcích, je často využíváno chirurgicky implantované invazivní EEG. Tato metoda se využívá kvůli své přesnosti a vysokému rozlišení oproti neinvazivnímu EEG (Martinez-Ramirez et al., 2022). Současný vývoj technologií ale umožňuje využití neinvazivních variant EEG, či substitučních neinvazivních metod, čím dál tím častěji. Tato změna představuje významný krok vpřed v oblasti neurologického výzkumu a klinické praxe, jelikož tyto metody nabízí méně rizik a nepohodlí pro testované subjekty, přičemž se stále snaží poskytovat přesná a spolehlivá data potřebná pro výzkum (Ding et al., 2022; Topchiy et al., 2022).

Mezi elektrofyziologické markery mozkové aktivity lze zařadit také LFPs (local field potentials), které zaznamenávají změny potenciálů v definovaných mozkových oblastech a jejich fázové posuny mohou být robustní, konzistentní a prediktivní pro prostorovou orientaci. Díky těmto vlastnostem mohou sloužit jako spolehlivé markery neuronální aktivity (Mock et al., 2019).

Vedle klasických savčích modelů se elektrofyziologické techniky čím dál častěji aplikují také na modely s unikátními senzory schopnostmi, jako je *G. petersii*. Tento druh ryby je znám svou schopností aktivní elektrosignalizace, kterou využívá k prostorové orientaci a komunikaci (Horka et al., 2024). Elektrofyziologické měření má v tomto případě zásadní význam, protože umožňuje kontinuální *in vivo* záznam EOD pomocí elektrod ponořených do vodního prostředí, čímž je získán přímý záznam bez invazivního zásahu do organismu. Tyto výboje EOD, generované elektrocyty v ocasní části těla, slouží nejen k elektrolokaci, ale i k sociální komunikaci a vykazují specifické vzorce v závislosti na behaviorálním kontextu jedince (Wullimann and Grothe, 2013).

Elektrofyziologické metody, včetně EEG a EOD záznamů, tak nabízejí unikátní možnost sledovat dynamické změny neuronální aktivity. Jejich výhoda spočívá v možnosti přímého a časově přesného zachycení odpovědi mozku na vnější podněty, a to i u alternativních modelových organismů, jako je *G. petersii*, s respektem k principům 3R.

### 4.3 Behaviorální metody

Zobrazovací techniky jsou často kombinovány s behaviorálními metodami, což umožňuje hlubší porozumění celkovému funkčnímu stavu organismu v různých podmínkách. Zatímco behaviorální přístupy hodnotí vnější projevy neuronální aktivity, zároveň poskytují nedílný kontext pro interpretaci mozkové činnosti ve vztahu k

interakci jedince s prostředím. V případě modelového organismu *G. petersii*, známého svým vysoce specializovaným elektrokomunikačním a elektronavigačním systémem, je tato kombinace metod obzvláště přínosná. Propojení behaviorální analýzy prostřednictvím videodetekce s kontinuálním záznamem elektrických výbojů EOD umožňuje sledovat jak kvantitativní parametry pohybu, tak změny ve výstupní elektrické aktivitě ve vztahu ke konkrétnímu sensorickému nebo sociálnímu kontextu (Langová et al., 2024). Pomocí separace elektrických signálů v reálném čase je možné sledovat, jak změny ve vzorcích EOD odpovídají různým behaviorálním stavům, například teritoriálnímu chování nebo sociální dominanci. Tyto metody poskytují náhled nejen na základní behaviorální strategie, ale i na dynamiku mozkové regulace komunikace ve složitějším sociálním kontextu (Chrtkova et al., 2025).

Ve srovnání s jinými modelovými druhy, jako je například *Danio rerio*, je výhodou *G. petersii* možnost neinvazivního sledování jak chování, tak elektrické aktivity, čímž představuje unikátní model pro propojení behaviorálních a fyziologických dat v reálném čase.

## 5. Materiál a metody

*G. petersii* představuje patřičnou výzvu pro výběr vhodné metodiky v této práci. Jeho malé rozměry a sladkovodní prostředí výrazně omezují repertoár běžně používaných standardních metod. Z tohoto důvodu byla zvolena kombinace více přístupů, která umožňuje komplexní pohled na aktivitu CNS. Primárně byla použita histologická *in vitro* zobrazovací metoda mozkové aktivity využívající imunohistochemické barvení c-Fos pozitivních neuronů. Tato metoda byla doplněna o behaviorální analýzu zaměřenou na změny v lokomoci. Současně byla zaznamenávána elektrická aktivita EOD pomocí neinvazivní elektrofyziologické metody. Kombinací těchto přístupů lze korelovat funkční změny na buněčné úrovni s projevy na úrovni chování a elektrofyziologie.

### 5.1 Laboratorní zvířata a podmínky chovu

Experimenty byly provedeny na dvaceti subadultních jedincích ryby *G. petersii*, zakoupených od certifikovaného distributora Vivarium (Mělník, Česká republika). Vzhledem k tomu, že se jednalo o ryby nepocházející z laboratorní inbrední linie, ale o geneticky heterogenní jedince (wild type), nelze zcela vyloučit potenciální vliv genetické variability na sledované parametry. Pohlaví jedinců nebylo určeno, jelikož sexuální dimorfismus v chování a elektroaktivitě se u tohoto druhu projevuje pouze krátce po sezóně dešťů v jejich přirozeném prostředí (Landsman, 1993). Zvířata byla chována ve skupinových nádržích o objemu 300 l, vybavených standardními prvky akvarijního prostředí, jako je substrát, živé rostliny a různé úkryty, aby se co nejvíce přiblížily přirozenému prostředí a podpořily přirozené chování ryb. V průběhu experimentálního období byla každá ryba aklimatizována po dobu nejméně 14 dnů jednotlivě ve standardizační nádrži o objemu 125 l za účelem ustálení podmínek. Každá nádrž byla jasně označena, aby se předešlo záměně jednotlivých jedinců. Tyto nádrže obsahovaly základní prvky akvarijního prostředí, jako je substrát a jednoduché úkryty,

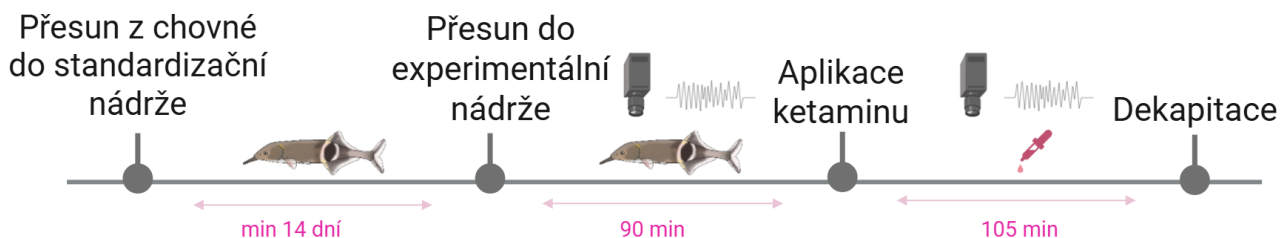
avšak v menším rozsahu než chovné nádrže. Voda použitá pro chovné, standardizační i experimentální nádrže pocházela z veřejného vodovodního řadu hl. m. Prahy a byla upravena pomocí systému reverzní osmózy zařízením PROFIPLANTS RO 75 GPD, čímž byla dosažena požadovaná vodivost (cca 300  $\mu$ S) a optimalizovaná osmolarita, odpovídající fyziologickým nárokům tropických sladkovodních ryb.

Teplota vody byla udržována v rozmezí 24–26 °C a pravidelně monitorována. Voda do standardizačních a experimentálních nádrží byla čerpána přímo z chovného systému, čímž se minimalizoval stres z přechodu do nového prostředí. S ohledem na noční aktivitu *G. petersii* byly světelné podmínky přizpůsobeny tak, aby simulovaly přirozený cirkadiánní rytmus. Fotoperioda byla nastavena na 12:12 hodin, přičemž světelná fáze byla posunuta tak, aby odpovídala aktivní fázi ryb během experimentu. Ryby byly krmeny larvami pakomárů *ad libitum*. Etický souhlas byl udělen Etickou komisí Univerzity Karlovy (reg. č. 19014/2019-MZE-18134, MSMT č. 27367/2019) v souladu s Evropskou směrnicí 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely.

## 5.2 Design experimentu

Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou experimentálních skupin ( $n = 10$  zvířat ve skupině). Každá ryba byla individuálně přenesena ze standardizační 125l nádrže do experimentální nádrže o rozměrech 60 × 40 × 30 cm, která byla naplněna 30 litry vody do výšky hladiny 9 cm. Po přesunu byla ponechána v klidu bez jakékoliv stimulace po dobu 90 minut. Tento časový interval byl zvolen za účelem minimalizace vlivu akutního stresu z manipulace a adaptace na nové prostředí.

Osvětlení v místnosti bylo upraveno tak, aby odpovídalo noční aktivitě druhu. Fotoperioda byla posunuta tak, aby byly ryby během experimentu testovány v jejich aktivní fázi. Experiment probíhal v nočních hodinách, ale nad akváriem bylo použito červené světlo o intenzitě 9 lx, které není tímto druhem vnímáno a neovlivňuje chování ryb, ale umožňuje kamerový záznam (Ciali et al., 1997).



**Obrázek č. 8:** Schéma experimentálního protokolu. Jedinec druhu *G. petersii* byl nejprve přemístěn z chovné do standardizační nádrže, kde probíhala aklimatizace po dobu minimálně 14 dní. Následně byl jedinec přesunut do experimentální nádrže, kde setrval 90 minut před aplikací ketaminu. Po aplikaci byl ponechán dalších 105 minut, poté byla provedena dekapitace za účelem odběru mozku.

### 5.3 Farmakologická expozice

U experimentální skupiny byl do akvária aplikován ketamin (Narkamon) rozpuštěný ve vodě na cílovou koncentraci 30 mg/l. Tato dávka byla zvolena na základě článku Riehl et al., 2011. Roztok byl do vody distribuován pomocí 150 ml vyplachovací stříkačky a silikonové hadičky vedené pod hladinu vody, čímž byla eliminována manipulace nad akváriem a minimalizována stresová reakce. Kontrolní skupina byla vystavena identickému postupu, avšak místo ketaminového roztoku byla aplikována odpovídající dávka vody.

### 5.4 Behaviorální testování

Behaviorální aktivita ryb byla monitorována pomocí kamery (near-infrared camera, IDS Imaging Development Systems GmbH 1.3 MPx, Germany), která je vhodná pro natáčení ve tmě. Kamera byla umístěna 1 m nad hladinou vody přímo uprostřed nad experimentální nádrž. Nádrž byla kontinuálně snímána kamerou a výsledný videozáznam byl následně upraven a rozdělen do tří definovaných časových úseků. Tyto úseky jsou v následujících grafech označeny jako Před = záznam 30 minut před aplikací testované látky, Během = záznam během aplikace a bezprostředně 30 minut po aplikaci a Po = záznam 30 minut následujících po fázi Během. Videozáznamy byly následně analyzovány softwarem LoliTrack (Loligo Systems). Vyhodnocovány byly primárně následující parametry, přičemž každý byl analyzován samostatně pro konkrétní 30minutový záznam: celkově uražená dráha (m), doba aktivity (%) a průměrná rychlost.

### 5.5 Elektrosignalizace

Současně s chováním byla paralelně zaznamenávána také elektrická aktivita EOD pomocí systému pro záznam elektrických signálů. Tento systému zahrnoval snímací elektrody, analogový zesilovač a zařízení pro sběr dat. Čtyři chloridované stříbrné elektrody byly umístěny po rozích a pátá, referenční, byla ve středu experimentální nádrže. Elektrody byly vždy 2 cm pod hladinou vody. Získaný záznam byl následně zpracován a časově rozdělen do tří definovaných úseků, odpovídajících těm, které byly použity pro analýzu videozáznamu. V grafech jsou tyto fáze označeny stejně jako u videozáznamu: Před = záznam 30 minut před aplikací testované látky, Během = záznam během aplikace a bezprostředně 30 minut po aplikaci a Po = záznam 30 minut následujících po fázi Během. Tyto časové intervaly byly konzistentně použity pro všechny subjekty v rámci experimentu a sloužily k porovnání účinku ketaminu oproti kontrolní skupině vystavené vodě. Videozáznam a záznam elektrické aktivity byly synchronizovány pomocí časového spouštěcího signálu, který inicioval oba záznamy současně.

Zesílený signál byl digitalizován pomocí systému NI DAQ (National Instruments, vzorkovací frekvence 20 kHz) s vzorkovací frekvencí 50 000 vzorků za sekundu s 16bitovým rozlišením. Data byla následně uložena softwarem pro akvizici dat a analyzována v programu MATLAB (MathWorks). Signály z elektrod byly zpracovány s použitím toolboxu FieldTrip v programu MATLAB. Data byla nejprve filtrována pomocí FIR filtru s mezní frekvencí 200 Hz a následně rozdělena do časových segmentů. Na tyto segmenty byl aplikován

algoritmus pro detekci EOD výbojů, který umožnil jejich kvantitativní vyhodnocení. Parametry detekce (minimální výška píku  $\geq 5$  mV, minimální rozestup píků 0,02 s, maximální šířka píků 0,001 s) byly zvoleny podle dříve publikovaných údajů o charakteristice EOD výbojů (Von Der Emde and Zelick, 1995).

## 5.6 Odběr mozkové tkáně a histologická příprava

Přesně 105 minut po aplikaci ketaminu byla každá ryba odlovena z experimentálního akvária, ihned umístěna do nádoby s ledovou vodou za účelem rychlé eutanásie a následně dekapitována v souladu s etickými zásadami pro práci se zvířaty.

Mozek byl bezprostředně po extrakci fixován ve 4 % roztoku paraformaldehydu ve fosfátovém pufru PBS po dobu 24 hodin při teplotě 4 °C, za účelem zachování morfologie a antigenní integrity struktury tkáně. Po fixaci byl mozek opakovaně promyt v PBS (pH 7.4), aby došlo k úplnému odstranění zbytkového fixačního činidla. Následně byl mozek postupně nasycen sacharózovými roztoky o rostoucí koncentraci (10 %, 20 %, 30 % v PBS), pro účely kryoprotekce před zmrazením.

Takto dehydratovaný mozek byl vložen do formy s OCT médiem (Optimal Cutting Temperature, Sakura Finetek), zarovnan v koronální orientaci a kompletně zalit médiem. Následně byl rychle zmrazen na suchém ledu a uložen při  $-80$  °C do doby dalšího zpracování.

Před krájením byly vzorky mozkové tkáně temperovány v kryostatu Leica CM1950 při teplotě  $-20$  °C po dobu minimálně 60 minut. Mozek byl poté sériově krájen v koronální orientaci na řezy o tloušťce 50  $\mu$ m pomocí ocelových čepelí vhodných pro použití s OCT médiem. Čerstvě nařezané řezy byly buď okamžitě přeneseny štětcem do 0,1 M PBS (pH 7.4) a dále zpracovány dle imunohistochemického protokolu, nebo uloženy do 0,1 M kryoprotektivního média CPS (obsahujícího glycerol a etylenglykol v PBS) a skladovány při  $-20$  °C pro pozdější analýzu.

## 5.7 Imunohistochemická detekce a montáž vzorků

Imunohistochemická detekce proteinu c-Fos byla provedena pomocí DAB metody (3,3'-diaminobenzidin), jejíž detailní popis je uveden v následující kapitole. Po dokončení barvení byly řezy manuálně přeneseny štětcem na objektivní sklíčka, usušeny při pokojové teplotě a připraveny k trvalé montáži.

Montáž byla provedena pomocí montovacího média Salakryl (Lakma), které bylo ředěno v poměru 9:1 se xylenem. Před aplikací média byly vzorky dehydratovány v ethanolové řadě (70 %, 96 % a 100 % ethanolu, každé po dobu 5 minut) a poté inkubovány ve xylenovém roztoku po dobu 3–5 minut. Následně byly okapané vzorky zalepeny: na každý řez byly nanесeny 3–4 kapky Salakrylu a přiloženo krycí sklíčko. Montáž byla provedena v digestoři. Vzorky byly ponechány ve vodorovné poloze při pokojové teplotě a chráněny před světlem po dobu potřebnou k úplnému zaschnutí média.

### 5.7.1 Protokol I.

Řezy mozkové tkáně byly zpracovány metodou volně plovoucích řezů. Pro detekci proteinu c-Fos byl použit dvoudenní DAB protokol. Jako primární protilátka byla použita myší monoklonální protilátka anti-c-Fos (E-8, sc-166940, Santa Cruz), validovaná pro použití u člověka, myši, potkana a *Danio rerio*. Sekundární protilátkou byla biotinylovaná koňská anti-myší IgG protilátka (BA-2001, Vector Laboratories), určená pro aplikace s využitím avidin/streptavidin značení.

#### Den 1

Řezy byly vyjmuty z mrazáku a nejprve třikrát promyty po 5 minutách v PBS, aby byly odstraněny zbytky CPS. Následně byly vzorky inkubovány po dobu 30 minut v roztoku obsahujícím 3,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10% methanol a PBS, čímž byla inhibována endogenní peroxidázová aktivita za účelem snížení nespecifického zabarvení. Po třech dalších promytích v PBS byly řezy inkubovány po dobu 30 minut v PBS+ (PBS s přidavkem detergentu a blokujících látek) za účelem blokace nespecifických vazeb protilátek na tkáňové proteiny. PBS+ obsahovalo 5% kozí sérum, 1,5% Triton X-100 a PBS. Poté byly přes noc při 4 °C inkubovány s primární protilátkou (1° AB, primary antibody) proti c-Fos zředěnou v PBS+, aby došlo ke specifické vazbě.

#### Den 2

Po třech desetiminutových promytích v PBS, jejichž cílem bylo odstranit nenavázanou 1° AB, byly řezy inkubovány po dobu dvou hodin při pokojové teplotě s biotinylovanou sekundární protilátkou (2° AB, secondary antibody) v PBS+, která se váže na 1° AB. Poté následovalo promytí pro odstranění nenavázané 2° AB a hodinová inkubace s ABC komplexem (avidin-biotin-peroxidáza) (VECTASTAIN, Elite, ABC-HRP Kit, Standard, PK-6100). Tento komplex zajišťuje zesílení signálu prostřednictvím enzymatické amplifikace.

Řezy byly následně třikrát promyty v PBS k odstranění zbytků ABC komplexu a inkubovány po dobu 4 minut v DAB roztoku, který byl připraven 15 minut před použitím. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bylo přidáno těsně před aplikací. DAB slouží jako substrát pro peroxidázu, která v přítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalyzuje vznik nerozpustného hnědého produktu, lokalizujícího c-Fos pozitivní neurony. Reakce byla zastavena rychlým promytím dvakrát v destilované vodě.

Na závěr byly řezy třikrát promyty v PBS, přeneseny na podložní sklíčka pomocí štětce a ponechány uschnout při pokojové teplotě bez přímého světla. Po vyschnutí byla sklíčka zamontována pomocí Salakrylového média, jehož postup byl již popsán na začátku této kapitoly (5.6). Takto připravené preparáty byly určeny pro mikroskopickou analýzu.

V rámci optimalizace protokolu byly testovány různé modifikace, včetně prodloužené inkubace s primární protilátkou po dobu dvou nocí, použití poloviční, třetinové, dvojnásobné a trojnásobné koncentrace primární protilátky, opakované inkubace v PBS+, dále snížené (poloviční) a zvýšené (dvojnásobné) koncentrace Tritonu

v PBS+, a také různé délky inkubace v DAB substrátu (2, 3, 4, 5, 6, 7 a 8 minut). Na základě těchto úprav byla metoda značení systematicky optimalizována za účelem zlepšení kvality výsledků.

### 5.7.2 Protokol II.

V rámci experimentu byl testován i alternativní DAB protokol dle článku Bell et al., 2005, který se lišil především v délce a počtu inkubací. Oproti původnímu protokolu byl prodloužen čas promývání v PBS (4x10 minut místo 3x5 minut) a inkubace v PBS+ trvala 2 hodiny místo 30 minut. Inkubace s biotinylovanou 2° AB byla prodloužena na 4 hodiny při pokojové teplotě, zatímco ABC komplex byl inkubován přes noc místo jedné hodiny. Barvení v DAB roztoku bylo prodlouženo na 30 minut, přičemž H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bylo přidáno až po 20 minutách od začátku inkubace. Celý proces trval tři dny a měl za cíl zvýšit kvalitu detekce. Pro optimalizaci protokolu byly testovány varianty zahrnující prodlouženou inkubaci s 1° AB na dvě noci, použití dvojitě a trojitě koncentrace 1° AB a zkrácení doby barvení v DAB roztoku na 20 minut. Tyto změny však nevedly ke zlepšení kvality výsledků.

## 5.8 Mikroskopická analýza

Zalepené vzorky byly analyzovány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems). Jelikož se nejednalo o fluorescenční značení, mikroskop byl využit v režimu jasného pole (brightfield mode) s digitálním snímáním.

Analýza probíhala při zvětšení 10×, přičemž byla využita funkce automatického skenování a skládání (tile scan) v interním softwaru systému. Následně byly pořízeny také jednotlivé snímky bez skládání, a to při zvětšení 10× i 20×, za účelem detailnější dokumentace vybraných oblastí. Přístup umožňující skládání poskytl komplexní záznam celého řezu s vysokou prostorovou přesností a zachováním morfologických detailů. Obrazová data byla dále analyzována v softwaru Fiji (Fiji Is Just ImageJ, standardní distribuce). Obrázky byly převedeny do 8bitového formátu, byl nastaven prahovací limit (threshold) a vyznačeny regiony zájmu (nELL nebo ELL). Pomocí nástroje Analyze Particles byl určen počet detekovaných částic dle stanoveného rozsahu velikosti a kruhovitosti v dané oblasti. Analýza byla provedena s parametry: velikost částic 0–300  $\mu\text{m}^2$ , kruhovitost 0.00–1.00, vyloučení částic zasahujících do okrajů snímku. Výsledný počet částic byl použit pro kvantitativní porovnání mezi skupinami.

Pro analýzu bylo použito celkem 20 ryb, rozdělených mezi kontrolní a experimentální skupinu (n = 10 na skupinu). U každé ryby bylo kvantitativně vyhodnoceno 6 koronálních řezů z každé definované anatomické struktury. Počet detekovaných částic z jednotlivých řezů byl zprůměrován a výsledná hodnota za každé zvíře sloužila jako jednotka pro statistické zpracování. Tyto průměrné hodnoty byly následně použity k sestavení sloupcových grafů a porovnání mezi skupinami.

## 5.9 Statistická analýza

Statistická analýza kvantitativních dat byla provedena v softwaru GraphPad Prism 10.4.1 (627). Hladina statistické signifikance byla předem stanovena na  $\alpha = 0,05$ . Výsledky jsou prezentovány jako skupinové průměry, přičemž chybové úsečky znázorňují směrodatnou chybu průměru (SEM).

Pro imunohistochemická data, kde byly k dispozici pouze dva parametry skupiny (zásah a čas), byl použit nepárový t-test. Behaviorální data a měření EOD byla získána opakovaně v čase a v různých experimentálních podmínkách, a proto byla analyzována pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu (dvoucestné ANOVA) s opakovaným měřením, s faktory čas a zásah.

Před provedením těchto analýz byla u všech datových souborů (imunohistochemická, behaviorální a elektrofyziologická data) testována normalita rozdělení pomocí Kolmogorov-Smirnovova testu. V případech, kdy nebyla podmínka normality splněna (konkrétně u dat z měření EOD), byla data logaritmičsky transformována pomocí přirozeného logaritmu a následně použita pro statistické vyhodnocení.

## 6. Výsledky

V této kapitole jsou shrnuty výsledky experimentů zaměřených na ověření vlivu NMDA receptorového antagonisty ketaminu na mozkovou aktivitu, chování a elektrosignalizaci u ryb *G. petersii*. Cílem bylo zjistit, zda farmakologická expozice ketaminem vyvolá měřitelné změny na úrovni behaviorálních projevů, elektrické aktivity a exprese transkripčního faktoru c-Fos, který slouží jako marker neuronální aktivity. Experimenty zahrnovaly tři hlavní výstupy: Imunohistochemická analýza: detekce c-Fos exprese ve vybraných oblastech mozku pomocí DAB značení a následná kvantifikace počtu částic. Behaviorální testování: posouzení změn v lokomoci, rychlosti plavání a délce aktivního pohybu po expozici ketaminem. Elektrosignalizace: sledování změn v elektrických výbojích EOD, charakteristickém projevu druhu *G. petersii*.

Získané výsledky jsou prezentovány postupně podle jednotlivých typů měření a jsou doplněny grafickými výstupy, které usnadňují jejich porovnání mezi kontrolní a experimentální skupinou.

### 6.1 Imunohistochemie

Imunohistochemická metoda značení c-Fos pomocí DAB byla úspěšně aplikována na mozek ryby *G. petersii*. V cílených modelových oblastech ELL a nELL nebyl zaznamenán jasný specifický DAB-pozitivní signál, a to navzdory jeho pozorování při zavádění metody, nicméně kvantitativní analýza počtu částic byla v těchto oblastech i přesto provedena. Počet detekovaných částic, odpovídajících zadanému rozsahu velikosti a kruhovitosti, byl analyzován pomocí softwaru Fiji a následně použit pro srovnání mezi experimentálními skupinami.

Optimalizace imunohistochemické metodiky pro tento model se ukázala být časově i technicky náročná a navzdory dílčím úspěchům zůstává značně limitována. Tyto limitace zdůrazňují potřebu dalšího metodologického vylepšování a nezbytnost ověření výsledků.

### c-Fos pozitivní buňky při zavádění metody

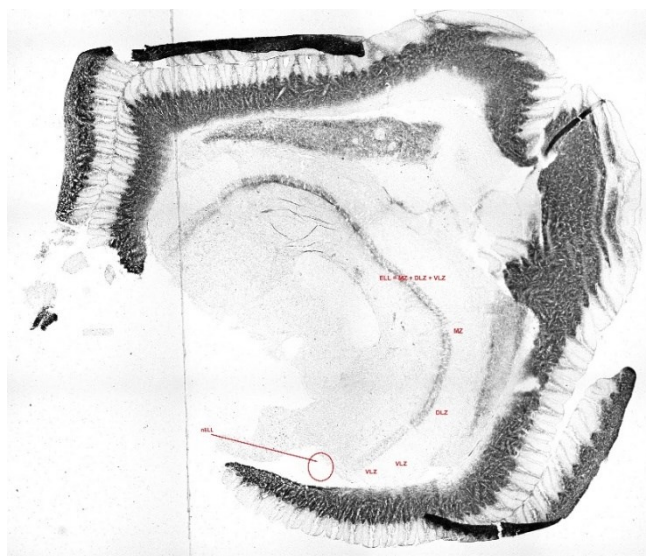


**Obrázek č. 9:** Reprezentativní fotografie řezů mozku experimentální (E) ryby číslo 31 *G. petersii*, kde jsou patrné c-Fos pozitivní buňky. Fotografie jsou pořízeny konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem Leica po DAB imunohistochemickém barvení c-Fos proteinu se zvětšením 20x.

Na transversálních řezech mozku jedince *G. petersii* byly po obarvení hematoxylinem a eozinem identifikovány jednotlivé mozkové oblasti. Jednotlivé řezy byly seřazeny a byl vytvořen orientační atlas mozku této ryby. Na obrázku č. 10 je vyznačeno pallium a ventrální oblasti. Na obrázku č. 11 je posteriorní část mozku, zahrnující ELL a nELL oblasti. Každá oblast byla vymezena podle odlišné buněčné hustoty a organizace. Tento orientační atlas mozku může v budoucnu sloužit jako základní referenční rámec pro přesnější anatomickou orientaci u *G. petersii*, například při cílení neurofyzilogických experimentů, při sledování aktivace specifických oblastí pomocí markerů, nebo při srovnávacích studiích v rámci vývoje, plasticity a funkční organizace mozku mormyridních ryb.



**Obrázek č. 10:** Reprezentativní snímek z orientačního atlasu mozku ryby *G. petersii* po barvení hematoxylinem a eozinem. Na tomto konkrétním transverzálním řezu byly histologicky odlišeny hlavní subregiony telencefala. Jasně patrné jsou jednotlivé části pallia: dorzální (Dd), dorso-centrální (Dcd), dorso-mediální (Dm), dorso-laterální (Dla, Dlb) a dorso-centrální mediální oblast (Dcm). Ventrálně byla vyznačena oblast Vm (ventro-mediální telencefalon). V oblasti mozečku je označena struktura Vam, odpovídající valvule cerebelli. Snímek byl pořízen konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem Leica při zvětšení 10x, s využitím funkce automatického snímání a skládání (tile scan) v interním softwaru mikroskopického systému.

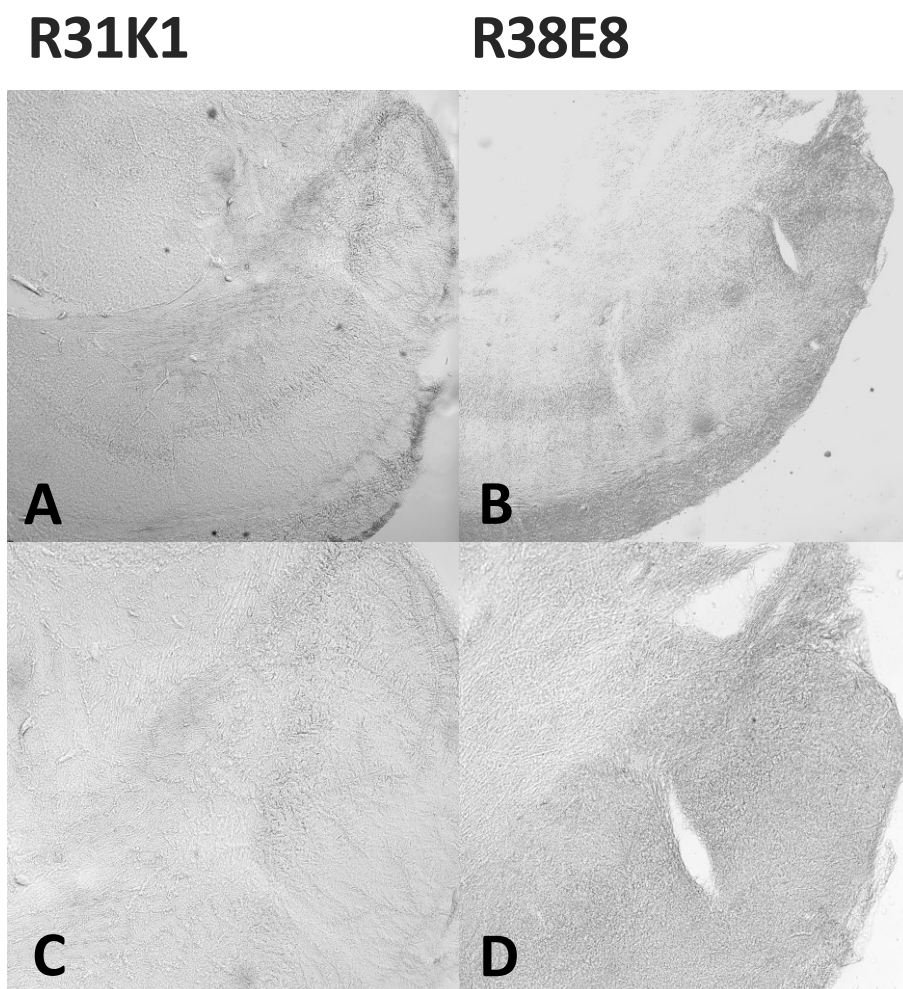


**Obrázek č. 11:** Reprezentativní snímek koronálního řezu posteriorní části mozku ryby *G. petersii* po barvení hematoxylinem a eozinem. Řez zahrnuje oblasti kůry elektrického laloku (ELL) a navazujících zón ventrolaterální (VLZ), dorzolaterální (DLZ) a mediální (MZ). Řez také zaznačuje pozici jádra elektrického laloku

(nELL). Snímek byl pořízen konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem Leica při zvětšení 10x, s využitím funkce automatického snímání a skládání (tile scan) v interním softwaru mikroskopického systému.

### 6.1.1 Počet detekovaných částic

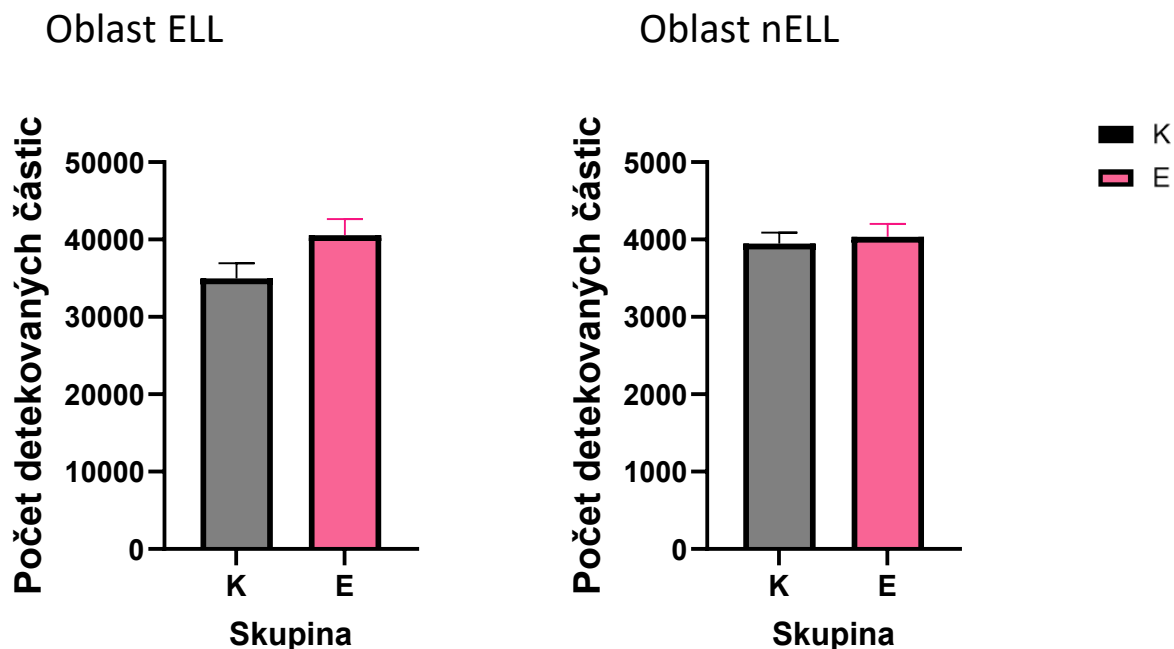
Počet detekovaných částic ve vybraných modelových strukturách byl použit pro srovnání mezi kontrolní a experimentální skupinou. Výsledky ukázaly, že rozdíl mezi skupinami nebyl statisticky významný (nepárový t-test,  $p > 0,05$ ). Počet detekovaných částic je však pravděpodobně hlavně generovaný vlastnostmi DAB metody, nastavením prahování a možnou interferencí s vlastnostmi mozkové tkáně. Výsledky mohly být rovněž ovlivněny individuálními rozdíly mezi jedinci, například velikostí mozku, či faktem, že ryby pocházely z geneticky heterogenní linie.



**Obrázek č. 12:** Reprezentativní fotografie řezu mozem kontrolní (K) ryby číslo 31 (R) a experimentální (E) ryby číslo 38 *G. petersii*. Fotka A a B zobrazuje oblast ELL se zvětšením 5x, fotografie C a D zobrazuje oblast nELL se zvětšením 10x. ELL= elektrosenzorický lalok postranní čáry (electrosensory lateral line lobe). nELL=jádro

elektrosenzorického laloku postranní čáry (nukleus of electrosensory lateral line lobe). Fotografie je pořízena konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem Leica po DAB imunohistochemickém barvení c-Fos proteinu.

## Počet detekovaných částic



A:

B:

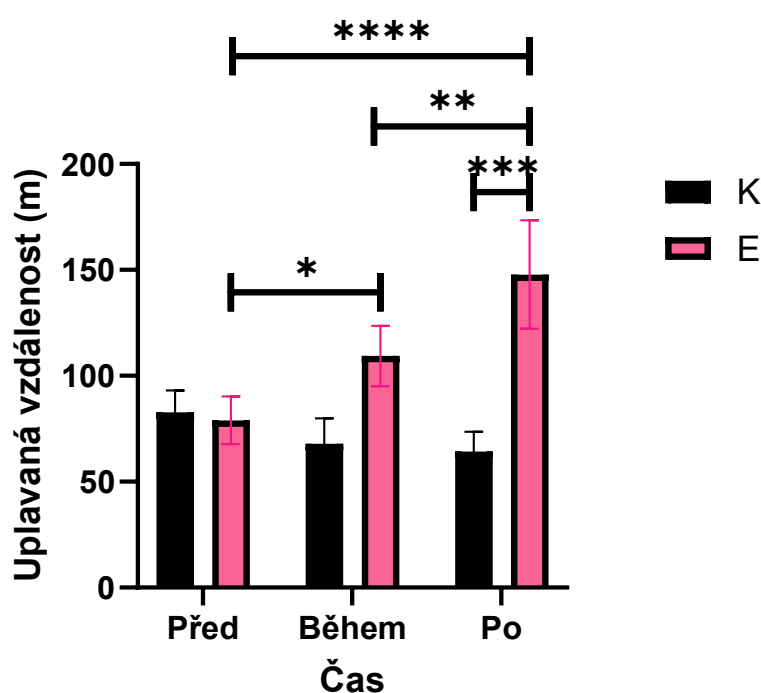
**Graf. 1:** Grafy znázorňují průměrné hodnoty počtu detekovaných částic dle stanoveného rozsahu velikosti a kruhovitosti u kontrolní skupiny (K), které byla podána voda a experimentální skupiny (E), které byl podán ketamin. Zobrazené hodnoty představují průměry vždy ze šesti řezů na zvíře ( $n = 10$  na skupinu). Graf A znázorňuje hodnoty pro oblast ELL, graf B hodnoty pro oblast nELL. Obě skupiny vykazují srovnatelnou úroveň signálu v obou oblastech, přičemž experimentální skupina nevykazuje statisticky významné zvýšení či snížení ve srovnání s kontrolou. Sloupce reprezentují průměr  $\pm$  SEM.

## 6.2 Behaviorální testování

Behaviorální testování bylo kvantitativně sledováno v rámci tří časových úseků: 30 minut před podáním látky (Před), během aplikace a bezprostředně 30 minut po ní (Během) a následně dalších 30 minut po úseku Během (Po). Analyzovány byly tři hlavní behaviorální parametry: uplavaná vzdálenost, průměrná rychlost pohybu a doba aktivity.

## Uplavaná vzdálenost (m)

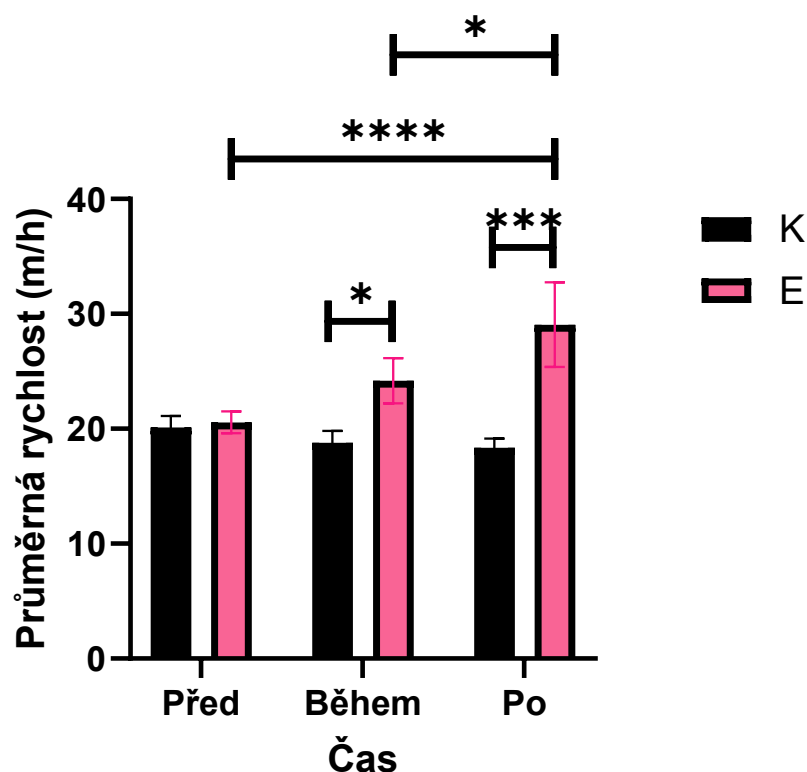
Dvoucestná ANOVA s opakovaným měřením prokázala statisticky významný efekt jak samotného ketaminu ( $F(1,18) = 4,596$ ;  $P = 0,0460$ ), tak časového faktoru ( $F(2,36) = 5,224$ ;  $P = 0,0102$ ), včetně jejich interakce ( $F(2,36) = 14,95$ ;  $P < 0,0001$ ). Ve skupině s aplikovaným ketaminem došlo k výraznému nárůstu uplavané vzdálenosti po podání látky ( $P = 0,0002$ ) v porovnání s kontrolní skupinou. Zaznamenán byl také postupný nárůst uplavané vzdálenosti napříč jednotlivými časovými úseky (Před vs. Během:  $P = 0,0281$ ; Před vs. Po:  $P < 0,0001$ ; Během vs. Po:  $P = 0,0046$ ).



**Graf č. 2:** Graf znázorňuje vliv aplikace podané látky a času na uplavanou vzdálenost v metrech. K skupina reprezentuje kontrolní skupinu ryb, kterým byla podána voda ( $n=10$ ). E skupina reprezentuje experimentální skupinu ryb, kterým byl podán ketamin ( $n=10$ ). Označení Před = záznam 30 minut před aplikací testované látky; Během = záznam během aplikace a bezprostředně 30 minut po aplikaci; Po = záznam 30 minut následujících po fázi Během. Výsledky naznačují, že aplikace ketaminu vedla k postupnému nárůstu motorické aktivity, s nejvyšší uplavanou vzdáleností po jeho podání. (\*,  $P < 0,05$ ), (\*\*,  $P < 0,01$ ), (\*\*\*,  $P < 0,001$ ), (\*\*\*\*,  $P < 0,0001$ ).

## Průměrná rychlost (m/h)

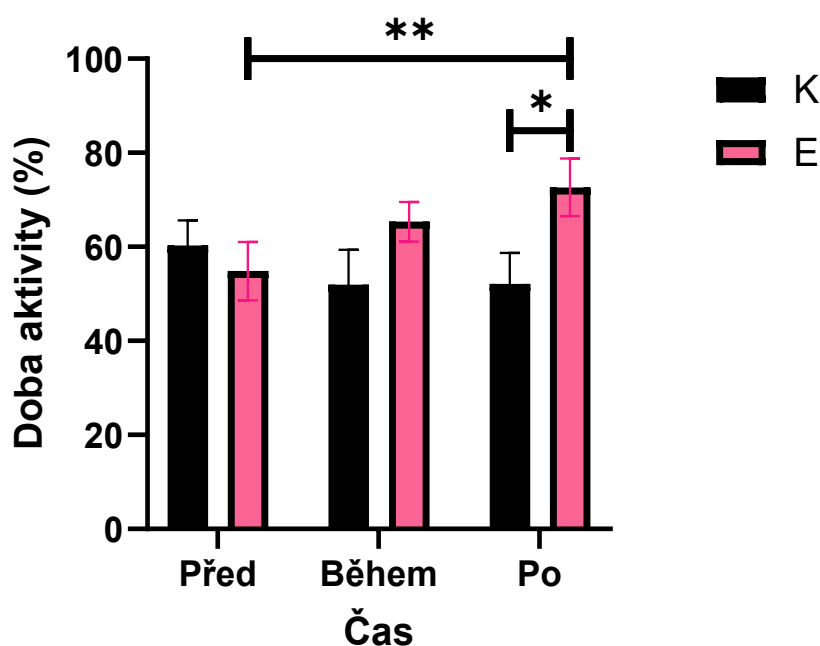
Také v případě průměrné rychlosti pohybu byly zjištěny statisticky významné efekty faktoru ketaminu ( $F(1,18) = 5,750$ ;  $P = 0,0275$ ), času ( $F(2,36) = 4,433$ ;  $P = 0,0190$ ) i jejich interakce ( $F(2,36) = 10,02$ ;  $P = 0,0003$ ). Ryby ve skupině s ketaminem vykazovaly signifikantně vyšší rychlost pohybu jak během aplikace ( $P = 0,0469$ ), tak zejména po ní ( $P = 0,0002$ ). Rychlost se u těchto jedinců zvýšila jak v porovnání s úsekem Před ( $P < 0,0001$ ), tak i vůči fázi Během ( $P = 0,0130$ ).



**Graf č. 3:** Graf znázorňuje vliv aplikace podané látky a času na průměrnou rychlost pohybu v metrech za hodinu. K skupina reprezentuje kontrolní skupinu ryb, kterým byla podána voda ( $n=10$ ). E skupina reprezentuje experimentální skupinu ryb, kterým byl podán ketamin ( $n=10$ ). Označení Před = záznam 30 minut před aplikací testované látky; Během = záznam během aplikace a bezprostředně 30 minut po aplikaci; Po = záznam 30 minut následujících po fázi Během. Tyto výsledky ukazují, že aplikace ketaminu vedla k postupnému nárůstu průměrné rychlosti pohybu. (\*,  $P < 0,05$ ), (\*\*,  $P < 0,01$ ), (\*\*\*,  $P < 0,001$ ), (\*\*\*\*,  $P < 0,0001$ ).

## Doba aktivity (%)

Posledním hodnoceným parametrem v behaviorálních testech byla procentuální doba aktivity z konkrétního 30minutového záznamu z nahrávání. Statistická analýza prokázala významnou interakci mezi časovým faktorem a aplikací látky ( $F(2,36) = 8,625$ ;  $P = 0,0009$ ). Ve skupině s podáním ketaminu došlo k výraznému prodloužení aktivního období po aplikaci látky oproti kontrolní skupině ( $P = 0,0199$ ). V rámci této skupiny byl navíc zaznamenán signifikantní nárůst aktivity ve fázi Po ve srovnání s Před ( $P = 0,0011$ ), zatímco u kontrolní skupiny se aktivita v čase neměnila.



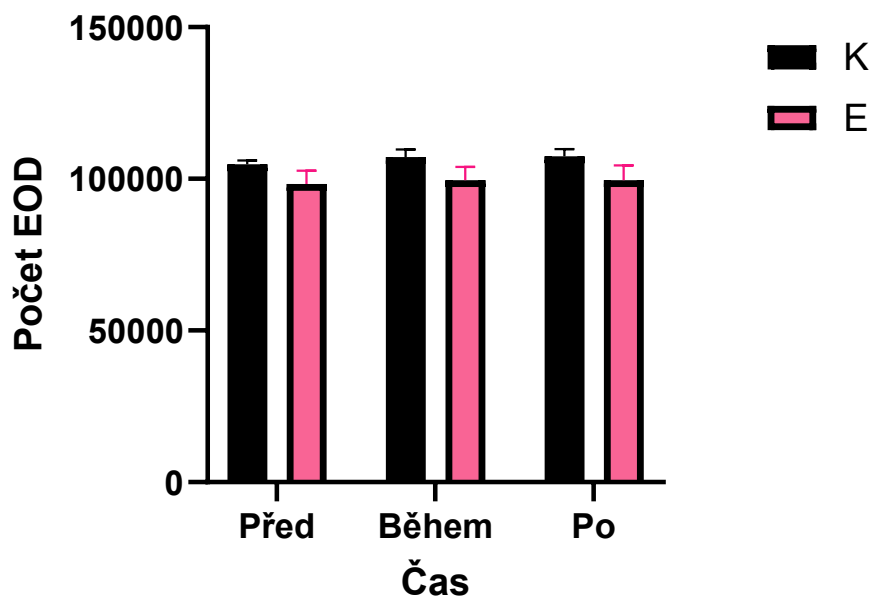
**Graf č.4:** Graf znázorňuje vliv aplikace podané látky a času na procentuální dobu aktivity z konkrétního 30minutového záznamu z nahrávání. K skupina reprezentuje kontrolní skupinu ryb, kterým byla podána voda ( $n=10$ ). E skupina reprezentuje experimentální skupinu ryb, kterým byl podán ketamin ( $n=10$ ). Označení Před = záznam 30 minut před aplikací testované látky; Během = záznam během aplikace a bezprostředně 30 minut po aplikaci; Po = záznam 30 minut následujících po fázi Během. Tyto výsledky ukazují, že ketamin prodloužil aktivní dobu ryb zejména po aplikaci. (\*,  $P < 0,05$ ), (\*\*,  $P < 0,01$ )

## 6.3 Elektrosignalizace

V rámci sledování elektrické aktivity ryb byl analyzován počet výbojů EOD ve třech časových intervalech, stejných jako u behaviorálního testování: 30 minut před podáním látky (Před), během aplikace a bezprostředně 30 minut po ní (Během) a následně dalších 30 minut po úseku Během (Po). Grafické vyhodnocení počtu EOD ukazuje, že elektrosignalizační aktivita zůstala v průběhu experimentu relativně stabilní. Dvoucestná ANOVA s opakovaným měřením neprokázala statisticky významný vliv faktoru látky

( $F(1,16) = 1,877$ ;  $P = 0,1896$ ), času ( $F(2,32) = 1,364$ ;  $P = 0,2700$ ), ani interakce mezi těmito faktory ( $F(2,32) = 0,1793$ ;  $P = 0,8367$ ).

Tyto výsledky naznačují, že aplikace ketaminu v tomto experimentu neměla měřitelný efekt na počet EOD. Elektrosignální chování ryb tedy zůstalo i po expozici farmakologickému zásahu zachováno.



**Graf č.5:** Graf znázorňuje vliv aplikace podané látky a času na počet elektrosignálních výbojů EOD ve třech časových úsecích. K skupina reprezentuje kontrolní skupinu ryb, kterým byla podána voda ( $n = 10$ ). E skupina reprezentuje experimentální skupinu ryb, kterým byl podán ketamin ( $n = 10$ ). Označení Před = záznam 30 minut před aplikací testované látky; Během = záznam během aplikace a bezprostředně 30 minut po aplikaci; Po = záznam 30 minut následujících po fázi Během. Tyto výsledky ukazují, že aplikace ketaminu v tomto experimentu pravděpodobně neměla vliv na elektrosignalizační aktivitu ryb.

## 7. Diskuse

Tato diplomová práce se zaměřila na zkoumání mozkové aktivity ryby *G. petersii* v reakci na NMDA antagonistu ketamin, který je využíván jako modelová látka pro indukci stavů podobných schizofrenii. Byly hodnoceny účinky ketaminu na neuronální aktivaci, chování a elektrickou aktivitu tohoto druhu, jenž je známý svou rozvinutou sociální inteligencí a schopností generovat bioelektrické signály (Sukhum et al., 2016).

Zásadní součástí této práce bylo zavedení metody imunohistochemické detekce c-Fos proteinu, jakožto markeru neuronální aktivity. V rámci optimalizace metodiky byly testovány různé varianty protokolů, zahrnující odlišné typy primárních protilátek, jejich koncentrace, délky inkubací i složení pufrů a promývacích

roztoků. Během optimalizace byla rovněž vyzkoušena variabilní inkubace v DAB roztoku, čímž byla postupně laděna sensitivita značení. Primární protilátka, která byla zvolena pro finální testování, byla vybrána na základě dostupné literatury, ve které byla úspěšně použita u jiného rybího modelu, *Danio rerio* (Flores-Prieto et al., 2024; Özdemir et al., 2018). Tato optimalizace vedla k vytvoření použitelného protokolu, který je možné dále využívat při dalších studiích na tomto modelu.

Modelové oblasti mozku ELL a nELL byly zvoleny jako cílové struktury analýzy především na základě jejich specifického zapojení do elektrorecepčního systému. Zatímco oblast ELL zpracovává aferentní vstupy z mormyromastových a ampulárních elektroreceptorů, nELL slouží jako primární integrační centrum pro signály z knollenorgánů, které jsou specializované na detekci časových aspektů elektrických signálů, zejména v kontextu elektrokomunikace mezi jedinci. Mormyromasty slouží k aktivní elektrolokaci, tedy k detekci vlastních elektrických výbojů, zatímco ampulární receptory umožňují detekci elektrických signálů generovaných jinými organismy nebo objekty v prostředí (Bell et al., 1989; Wullimann and Grothe, 2013). Tato anatomická a funkční segregace receptorových systémů činí tyto oblasti ideálními kandidáty pro sledování změn neuronální aktivity v reakci na farmakologickou manipulaci.

Obzvláště ELL je významná díky své výrazné časově závislé synaptické plasticitě STDP (spike-timing dependent plasticity), která umožňuje adaptivní filtraci sebereflexních signálů. Oblast nELL dále navazuje jako integrační centrum směrem k vyšším mozkovým strukturám a podílí se na dalším zpracování elektrokomunikačních informací (Bell et al., 2005; Demski, 2013; Fechner et al., 2018; Williams et al., 2003; Wullimann and Grothe, 2013). Z těchto důvodů byly obě oblasti vybrány pro detekci c-Fos značení souvisejícího s případnými elektrosignalizačními změnami vyvolanými aplikací ketaminu. Navzdory důkladné optimalizaci se však v těchto oblastech nepodařilo detekovat protein c-Fos tak zřetelně, jako při zavádění metody. Z tohoto důvodu byla kvantifikace provedena jako počet detekovaných částic na danou strukturu, což lépe odráží celkovou míru signálu než tradiční počítání buněk.

Nízká detekce c-Fos pozitivních buněk v oblastech ELL a nELL může mít několik možných vysvětlení. Na biologické úrovni je možné, že aktivita vyvolaná ketaminem se soustředila do jiných mozkových struktur, zejména telencefalického pallia. Pallium telencefala je v této souvislosti považováno za důležitou oblast, jelikož hraje zásadní roli při zpracovávání emocí, motivace a komplexního chování (Wullimann and Grothe, 2013). Tato oblast je známa svou úlohou při zpracování sociálních, stresových i senzorických podnětů, což bylo prokázáno v předchozích studiích (Demski, 2013; Prechtel et al., 1998; Uceda et al., 2015; Wullimann and Grothe, 2013). Na základě těchto informací je velice pravděpodobné, že k aktivaci došlo právě v těchto telencefalických oblastech, které ale v této práci nebyly analyzovány. Následujícím možným ovlivňujícím faktorem je přítomnost biologické variability mezi jednotlivými jedinci. Ryby použité v experimentu pocházely z geneticky nehomogenní tzv. wild-type populace, nikoliv z laboratorní inbrední linie. Tato genetická diverzita

mohla mít vliv na více úrovních, od variability ve velikosti mozku a rychlosti metabolismu až po individuální rozdíly ve farmakodynamické a farmakokinetické odpovědi na podanou látku. Dalším limitujícím faktorem byla neznalost přesného stáří jedinců, která je u nelaboratorních ryb obtížně zjistitelná. To mohlo ovlivnit míru neuronální aktivace zachycené pomocí c-Fos značení, kdy rozdíly ve fyziologickém stavu mohly překrýt efekt samotného ketaminu.

Mimo biologických vysvětlení je hlavně nutné zvážit metodická omezení, která mohla vést ke snížení detekovatelného signálu. Hlavním limitem je relativně nízká citlivost DAB metody, která je vhodná pro výraznou c-Fos expresi, ale nemusí zachytit mírné nebo lokalizované změny. Dále je zde možnost, že komerčně dostupná primární protilátka nerozpoznává natolik efektivně c-Fos epitop u *G. petersii* kvůli druhovým odlišnostem v aminokyselinové sekvenci. Také načasování odběru mozkové tkáně (105 minut po aplikaci ketaminu) mohlo být mimo vrchol exprese c-Fos, v závislosti na typu mozkové struktury, nebo mohlo být nevhodně načasováno samotné fixování mozku.

Dalšími faktory mohou být specifické vlastnosti různých oblastí mozkové tkáně ryby, jako např. struktura, hustota nebo propustnost pro činidla, které mohou ovlivnit difuzi protilátek nebo DAB činidla. Kromě toho může výsledky ovlivnit zbytková endogenní peroxidázová aktivita, která zvyšuje pozadí a snižuje kontrast značení. Technické limity mohou dále spočívat v analytickém zpracování, např. v nastavení prahové hodnoty (threshold) v softwaru Fiji, což dále ovlivňuje citlivost a přesnost kvantifikace signálu.

Přestože nedošlo k jasné detekci c-Fos proteinu v cílených modelových oblastech, tato práce úspěšně demonstrovala technickou aplikovatelnost imunohistochemické metody pro tento druh a zároveň upozornila na řadu aspektů vyžadujících další validaci. Do budoucna by bylo vhodné zvážit využití fluorescenčních metod s vyšší senzitivitou, ověření sekvence epitopu c-Fos u *G. petersii*, případně vývoj druhově specifických protilátek. Další experimenty by se měly zaměřit na zpřesnění parametrů protokolu, jako je například délka expozice v DAB roztoku, načasování odběru tkáně či optimalizace fixačních a zpracovacích postupů. Vytvořený protokol přitom slouží jako pevný základ pro budoucí výzkum zaměřený na zvýšení senzitivity a přesnosti detekce neuronální aktivace.

Pozorované změny v behaviorálních parametrech po aplikaci ketaminu potvrzují, že NMDA antagonisty významně ovlivňuje aktivitu ryb *G. petersii*. Ketamin u tohoto druhu vedl k signifikantnímu zvýšení behaviorální aktivity, což odpovídá výsledkům studií prováděných na jiných živočišných modelech, kde hyperaktivita představuje validní analogii pozitivních symptomů schizofrenie (Langova et al., 2023; Morales and Spear, 2014; Qin et al., 2021; Spark et al., 2024; Vinnakota et al., 2024; Xu et al., 2020). Zvýšená aktivita může být interpretována jako důsledek disinhibice dopaminergních drah po blokádě NMDA receptorů na GABAergních interneuronech v prefrontálních oblastech. Tento mechanismus vede ke zvýšenému uvolňování

dopaminu v mezolimbickém systému, především v oblasti nucleus accumbens, což bylo opakovaně spojováno s hyperlokomocí u zvířat po expozici ketaminu (Irifune et al., 1991; Xu et al., 2020).

V rámci experimentu byla kontinuálně zaznamenávána elektrická aktivita EOD, která jsou hlavním výstupem elektrokomunikačního a senzomotorického systému u tohoto druhu. EOD představuje nejen prostředek elektropercepce, ale i sociální komunikace, přičemž jejich frekvence a rytmus jsou ovlivňovány behaviorálním kontextem a vnějším prostředím (Babineau et al., 2006; Hofmann et al., 2013). Navzdory očekávání nebyly pozorovány signifikantní změny v elektrické aktivitě EOD mezi skupinami. V této práci byla použita koncentrace ketaminu 30 mg/l, která však nemusela být dostatečná k vyvolání signifikantních změn v EOD frekvenci. Tato možnost byla zvažována, mimo jiné, hlavně na základě výsledků z článku Langova et al., 2023, který prokázal signifikantní snížení EOD při vyšší koncentraci 40 mg/l. Dalším ovlivňujícím faktorem mohla být i vysoká interindividuální variabilita mezi jednotlivými rybami.

Dalším důvodem absence signifikantního rozdílu může být homeostatická stabilita EOD frekvence, která nemusí úzce korelovat s mírou pohybové aktivity. Zatímco u savčích modelů je často pozorována přímá vazba mezi neuronální excitací a výstupem motorických nebo sensorických systémů, u elektrokomunikujících ryb je regulace EOD výbojů komplexnější. EOD frekvence je modulována nejen motorickými, ale i sensorickými, hormonálními a sociálními vstupy (Hofmann et al., 2013; Landsman, 1993). Pokud ketamin ovlivnil primárně motorické chování, nemuselo se to nutně projevit změnou v elektrické aktivitě, což by mohlo naznačovat částečnou disociaci mezi těmito systémy. V neposlední řadě je třeba vzít v úvahu vysokou biologickou variabilitu mezi jednotlivými rybami, což zvyšuje rozptyl dat a tím snižuje sílu statistických testů.

Závěrem lze tedy říci, že i když chování bylo ketaminem signifikantně ovlivněno, jeho vliv na elektrickou aktivitu se v rámci použité metodiky neprojevil jako statisticky významný. Pro budoucí výzkum by bylo vhodné precizněji stanovit dávku a doplnit analýzu o kvalitativní parametry EOD, jako je amplituda, tvar signálu, nebo elektrolokační manévry, případně korelovat EOD výboje s trajektorií pohybu z videozáznamu.

Získaná data podporují teorii, že NMDA receptory hrají klíčovou roli v regulaci neuronální aktivity, která může být narušena při psychotických stavech. Výsledky této práce tak přispívají k lepšímu pochopení mechanismů schizofrenie a zároveň zdůrazňují význam *G. petersii* jako modelového organismu pro neurobiologický výzkum.

## 8. Závěr

Tato diplomová práce se zaměřila na zhodnocení účinků ketaminu, nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů, na neuronální aktivitu, behaviorální projevy a elektrickou aktivitu ryb druhu *G. petersii*. Hlavním cílem bylo ověřit validitu tohoto modelového organismu pro studium neurobiologických mechanismů ve vztahu k modelaci symptomů schizofrenie.

V experimentální části byly sledovány změny v chování, elektrické aktivitě a neuronální aktivaci pomocí imunohistochemického značení proteinu c-Fos, jehož detekce byla u tohoto druhu provedena vůbec poprvé. Přestože nebyl v cílených oblastech pozorován jasný specifický signál, zavedení metody bylo technicky úspěšné. V rámci práce byl rovněž vytvořen základní atlas mozkových struktur, který výrazně napomohl orientaci při analýze a představuje důležitou pomůcku pro další výzkum.

Výsledky ukázaly, že aplikace ketaminu vedla k signifikantnímu zvýšení lokomotorické aktivity, což podporuje využitelnost *G. petersii* pro modelaci pozitivních schizofrenii podobných symptomů. Naproti tomu u elektrické aktivity EOD zde nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.

Tato práce poskytuje důležitý metodický základ nejen pro budoucí studie zaměřené na glutamátergní signalizaci, ale také ukazuje potenciál druhu *G. petersii* jako alternativního modelového organismu v experimentální neurobiologii. Jeho využití může přispět k hlubšímu porozumění neuronální plasticity, sensorickému zpracování i farmakologické modulaci nervové aktivity, což je relevantní nejen pro základní výzkum, ale také pro vývoj nových strategií v psychiatrii, neuropsychofarmakologii a medicíně. Identifikované metodické limity zároveň naznačují směr další optimalizace, přičemž vytvořený protokol může sloužit jako výchozí rámec pro zpřesnění detekčních metod a další rozvoj experimentální neuropsychofarmakologie.

## 9. Seznam použité literatury

- Ahn, JiYun, Tae, H.-J., Cho, J.-H., Kim, I., Ahn, JiHyeon, Park, J., Kim, D., Cho, J., Won, M.-H., Hong, S., Lee, J.-C., Seo, J., 2015. Activation of immediate-early response gene c-Fos protein in the rat paralimbic cortices after myocardial infarction. *Neural Regen. Res.* 10, 1251. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.162757>
- Alkadhi, K.A., 2021. Review. NMDA receptor-independent LTP in mammalian nervous system. *Prog. Neurobiol.* 200, 101986. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101986>
- Alsenani, F., Ashour, A.M., Alzubaidi, M.A., Azmy, A.F., Hetta, M.H., Abu-Baih, D.H., Elrehany, M.A., Zayed, A., Sayed, A.M., Abdelmohsen, U.R., Elmaidomy, A.H., 2021. Wound Healing Metabolites from Peters' Elephant-Nose Fish Oil: An In Vivo Investigation Supported by In Vitro and In Silico Studies. *Mar. Drugs* 19, 605. <https://doi.org/10.3390/md19110605>
- Amey-Özel, M., Anders, S., Grant, K., Von Der Emde, G., 2019. Central connections of the trigeminal motor command system in the weakly electric Elephantnose fish ( *GNATHONEMUS PETERSII* ). *J. Comp. Neurol.* 527, 2703–2729. <https://doi.org/10.1002/cne.24701>
- Arnsten, A.F.T., Woo, E., Yang, S., Wang, M., Datta, D., 2022. Review. Unusual Molecular Regulation of Dorsolateral Prefrontal Cortex Layer III Synapses Increases Vulnerability to Genetic and Environmental Insults in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 92, 480–490. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2022.02.003>
- Babineau, D., Longtin, A., Lewis, J.E., 2006. Modeling the electric field of weakly electric fish. *J. Exp. Biol.* 209, 3636–3651. <https://doi.org/10.1242/jeb.02403>
- Bago Rožanković, P., Rožanković, M., Badžak, J., Stojić, M., Šušak Sporiš, I., 2021. Impact of Donepezil and Memantine on Behavioral and Psychological Symptoms of Alzheimer Disease: Six-month Open-label Study. *Cogn. Behav. Neurol.* 34, 288–294. <https://doi.org/10.1097/WNN.0000000000000285>
- Barros, V.N., Mundim, M., Galindo, L.T., Bittencourt, S., Porcionatto, M., Mello, L.E., 2015. The pattern of c-Fos expression and its refractory period in the brain of rats and monkeys. *Front. Cell. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00072>
- Barry, D.N., Coogan, A.N., Commins, S., 2016. The time course of systems consolidation of spatial memory from recent to remote retention: A comparison of the Immediate Early Genes Zif268, c-Fos and Arc. *Neurobiol. Learn. Mem.* 128, 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.12.010>
- Bell, C.C., Meek, J., Yang, J.Y., 2005. Immunocytochemical identification of cell types in the mormyrid electrosensory lobe. *J. Comp. Neurol.* 483, 124–142. <https://doi.org/10.1002/cne.20414>
- Bell, C.C., Zakon, H., Finger, T.E., 1989. Mormyromast electroreceptor organs and their afferent fibers in mormyrid fish: I. Morphology. *J. Comp. Neurol.* 286, 391–407. <https://doi.org/10.1002/cne.902860309>
- Bissoli, R., Niso, R., Contestabile, A., Szabo, T., 1987. Regional levels of neurotransmitter-related markers in the brain of the weakly electric fish *Gnathonemus petersii*. *Brain Res.* 405, 380–383. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90310-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90310-6)
- Blackman, R.K., MacDonald, A.W., Chafee, M.V., 2013. Effects of Ketamine on Context-Processing Performance in Monkeys: A New Animal Model of Cognitive Deficits in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 38, 2090–2100. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.118>
- Boast, C.A., Gerhardt, S.C., Pastor, G., Lehmann, J., Etienne, P.E., Liebman, J.M., n.d. The N-rnethyl-D-aspartate antagonists CGS 19755 and CPP reduce ischemic brain damage in gerbils.
- Bojovic, O., Panja, D., Bittins, M., Bramham, C.R., Tjølsen, A., 2015. Time Course of Immediate Early Gene Protein Expression in the Spinal Cord following Conditioning Stimulation of the Sciatic Nerve in Rats. *PLOS ONE* 10, e0123604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123604>
- Bouhadoun, S., Poulin, C., Berrahmoune, S., Myers, K.A., 2021. A retrospective analysis of memantine use in a pediatric neurology clinic. *Brain Dev.* 43, 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2021.05.012>
- Braun, U., Schäfer, A., Bassett, D.S., Rausch, F., Schweiger, J.I., Bilek, E., Erk, S., Romanczuk-Seiferth, N., Grimm, O., Geiger, L.S., Haddad, L., Otto, K., Mohnke, S., Heinz, A., Zink, M., Walter, H., Schwarz, E., Meyer-Lindenberg, A., Tost, H., 2016. Dynamic brain network reconfiguration as a potential

- schizophrenia genetic risk mechanism modulated by NMDA receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 12568–12573. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608819113>
- Brown, J., Grayson, B., Neill, J.C., Harte, M., Wall, M.J., Ngomba, R.T., 2023. Oscillatory Deficits in the Sub-Chronic PCP Rat Model for Schizophrenia Are Reversed by mGlu5 Receptor-Positive Allosteric Modulators VU0409551 and VU0360172. *Cells* 12, 919. <https://doi.org/10.3390/cells12060919>
- Brudzynski, S.M., Fletcher, N.H., 2010. Rat ultrasonic vocalization: short-range communication, in: *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Elsevier, pp. 69–76. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374593-4.00008-5>
- Bryda, E.C., 2013. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo. Med.* 110, 207–211.
- Bygrave, A.M., Kilonzo, K., Kullmann, D.M., Bannerman, D.M., Kätzel, D., 2019. Can N-Methyl-D-Aspartate Receptor Hypofunction in Schizophrenia Be Localized to an Individual Cell Type? *Front. Psychiatry* 10, 835. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00835>
- Caputi, A.A., Budelli, R., 2006. Peripheral electrosensory imaging by weakly electric fish. *J. Comp. Physiol. A* 192, 587–600. <https://doi.org/10.1007/s00359-006-0100-2>
- Chen, H.V., Lipton, S.A., 2006. Review. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J. Neurochem.* 97, 1611–1626. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03991.x>
- Cheval, H., Chagneau, C., Levasseur, G., Veyrac, A., Faucon-Biguët, N., Laroche, S., Davis, S., 2012. Distinctive features of Egr transcription factor regulation and DNA binding activity in CA1 of the hippocampus in synaptic plasticity and consolidation and reconsolidation of fear memory. *Hippocampus* 22, 631–642. <https://doi.org/10.1002/hipo.20926>
- Choi, D.W., 2020. Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. *Front. Neurosci.* 14, 579953. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.579953>
- Choi, K.H., Berman, R.Y., Zhang, M., Spencer, H.F., Radford, K.D., 2020. Effects of Ketamine on Rodent Fear Memory. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7173. <https://doi.org/10.3390/ijms21197173>
- Chopra, S., Segal, A., Oldham, S., Holmes, A., Sabaroedin, K., Orchard, E.R., Francey, S.M., O'Donoghue, B., Copley, V., Nelson, B., Graham, J., Baldwin, L., Tiego, J., Yuen, H.P., Allott, K., Alvarez-Jimenez, M., Harrigan, S., Fulcher, B.D., Aquino, K., Pantelis, C., Wood, S.J., Bellgrove, M., McGorry, P.D., Fornito, A., 2023. Network-Based Spreading of Gray Matter Changes Across Different Stages of Psychosis. *JAMA Psychiatry* 80, 1246. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2023.3293>
- Chrtkova, I., Vlastimil Koudelka, Veronika Langova, Jan Hubeny, Petra Horka, Karel Vales, Roman Cmejla, Jiri Horacek, 2025. Unsupervised Approach for Electric Signal Separation in *Gnathonemus petersii*: Linking Behavior and Electrocommunication.
- Chvojkova, M., Kolar, D., Kovacova, K., Cejkova, L., Misiachna, A., Hakenova, K., Gorecki, L., Horak, M., Korabecny, J., Soukup, O., Vales, K., 2024. Pro-cognitive effects of dual tacrine derivatives acting as cholinesterase inhibitors and NMDA receptor antagonists. *Biomed. Pharmacother.* 176, 116821. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116821>
- Ciali, S., Gordon, J., Moller, P., 1997. Spectral sensitivity of the weakly discharging electric fish *Gnathonemus petersii* using its electric organ discharges as the response measure. *J. Fish Biol.* 50, 1074–1087. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb01631.x>
- Das, S., Lituma, P.J., Castillo, P.E., Singer, R.H., 2023. Maintenance of a short-lived protein required for long-term memory involves cycles of transcription and local translation. *Neuron* 111, 2051–2064.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.04.005>
- Demski, L.S., 2013. The Pallium and Mind/Behavior Relationships in Teleost Fishes. *Brain. Behav. Evol.* 82, 31–44. <https://doi.org/10.1159/000351994>
- Ding, L., Patel, A., Shankar, S., Driscoll, N., Zhou, C., Rex, T.S., Vitale, F., Gallagher, M.J., 2022. An Open-Source Rodent Chronic EEG Array System with High Density MXene-Based Skull Surface Electrodes. <https://doi.org/10.1101/2022.12.28.522126>
- Driesen, N.R., McCarthy, G., Bhagwagar, Z., Bloch, M., Calhoun, V., D'Souza, D.C., Gueorguieva, R., He, G., Ramachandran, R., Suckow, R.F., Anticevic, A., Morgan, P.T., Krystal, J.H., 2013. Relationship of resting brain hyperconnectivity and schizophrenia-like symptoms produced by the NMDA receptor

- antagonist ketamine in humans. *Mol. Psychiatry* 18, 1199–1204.  
<https://doi.org/10.1038/mp.2012.194>
- Duda, W., Wesierska, M., Ostaszewski, P., Vales, K., Nekovarova, T., Stuchlik, A., 2016. MK-801 and memantine act differently on short-term memory tested with different time-intervals in the Morris water maze test. *Behav. Brain Res.* 311, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.024>
- Dudziak, K., Nowak, M., Sozoniuk, M., 2022. Review. One Host-Multiple Applications: Zebrafish (*Danio rerio*) as Promising Model for Studying Human Cancers and Pathogenic Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 10255. <https://doi.org/10.3390/ijms231810255>
- Dunstan, R.W., Wharton, K.A., Quigley, C., Lowe, A., 2011. The Use of Immunohistochemistry for Biomarker Assessment—Can It Compete with Other Technologies? *Toxicol. Pathol.* 39, 988–1002.  
<https://doi.org/10.1177/0192623311419163>
- Eifert, C., Farnworth, M., Schulz-Mirbach, T., Riesch, R., Bierbach, D., Klaus, S., Wurster, A., Tobler, M., Streit, B., Indy, J.R., Arias-Rodriguez, L., Plath, M., 2015. Brain size variation in extremophile fish: local adaptation versus phenotypic plasticity. *J. Zool.* 295, 143–153.  
<https://doi.org/10.1111/jzo.12190>
- Engelmann, J., Nöbel, S., Röver, T., Emde, G., 2009. The Schnauzenorgan-response of *Gnathonemus petersii*. *Front. Zool.* 6, 21. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-21>
- Ezran, C., Karanewsky, C.J., Pendleton, J.L., Sholtz, A., Biermann, M.R., Willick, J., Razafindrakoto, A., Zohdy, S., Albertelli, M.A., Krasnow, M.A., 2017. The Mouse Lemur, a Genetic Model Organism for Primate Biology, Behavior, and Health. *Genetics* 206, 651–664.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.116.199448>
- Falkenberg, I., Bitsch, F., Liu, W., Matsingos, A., Noor, L., Vogelbacher, C., Yildiz, C., Kircher, T., 2023. The effects of esketamine and treatment expectation in acute major depressive disorder (Expect): study protocol for a pharmacological fMRI study using a balanced placebo design. *Trials* 24, 514.  
<https://doi.org/10.1186/s13063-023-07556-x>
- Fechner, S., Grant, K., Von Der Emde, G., Engelmann, J., 2018. Physiological evidence of sensory integration in the electrosensory lateral line lobe of *Gnathonemus petersii*. *PLOS ONE* 13, e0194347.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194347>
- Feng, B., Morley, R., Jane, D., Monaghan, D., 2005. The effect of competitive antagonist chain length on NMDA receptor subunit selectivity. *Neuropharmacology* 48, 354–359.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.11.004>
- Flores-Prieto, B., Caycho-Salazar, F., Manzo, J., Hernández-Aguilar, M.E., Coria-Avila, A.G., Herrera-Covarrubias, D., Rojas-Dúran, F., Aranda-Abreu, G.E., Pérez-Estudillo, C.A., Toledo-Cárdenas, M.R., 2024. Effect of Enriched Environment on Cerebellum and Social Behavior of Valproic Zebrafish. *NeuroSci* 5, 128–140. <https://doi.org/10.3390/neurosci5020009>
- Gallas-Lopes, M., Benvenuti, R., Sachett, A., Chitolina, R., Guilherme Reis, C., Herrmann, A.P., Piato, A., 2020. S30. SCHIZOPHRENIA IN A FISH: EFFECTS OF NMDA ANTAGONISM ON LOCOMOTOR BEHAVIOR AND SOCIAL INTERACTION IN ZEBRAFISH. *Schizophr. Bull.* 46, S42–S43.  
<https://doi.org/10.1093/schbul/sbaa031.096>
- Galstyan, D.S., Krotova, N.A., Lebedev, A.S., Kotova, M.M., Martynov, D.D., Golushko, N.I., Perederiy, A.S., Zhukov, I.S., Rosemberg, D.B., Lim, L.W., Yang, L., De Abreu, M.S., Gainetdinov, R.R., Kalueff, A.V., 2025. Trace amine signaling in zebrafish models: CNS pharmacology, behavioral regulation and translational relevance. *Eur. J. Pharmacol.* 991, 177312.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2025.177312>
- Ganz, J., Kroehne, V., Freudenreich, D., Machate, A., Geffarth, M., Braasch, I., Kaslin, J., Brand, M., 2015. Subdivisions of the adult zebrafish pallium based on molecular marker analysis. *F1000Research* 3, 308. <https://doi.org/10.12688/f1000research.5595.2>
- Gao, X.-M., Elmer, G.I., Adams-Huet, B., Tamminga, C.A., 2009. Social memory in mice: Disruption with an NMDA antagonist and attenuation with antipsychotic drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 92, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.11.016>
- Gerhard, D.M., Pothula, S., Liu, R.-J., Wu, M., Li, X.-Y., Girgenti, M.J., Taylor, S.R., Duman, C.H., Delpire, E., Picciotto, M., Wohleb, E.S., Duman, R.S., 2020. GABA interneurons are the cellular trigger for

- ketamine's rapid antidepressant actions. *J. Clin. Invest.* 130, 1336–1349. <https://doi.org/10.1172/JCI130808>
- Ghafari, M., Whittle, N., Miklósi, A.G., Kotlowsky, C., Schmuckermair, C., Berger, J., Bennett, K.L., Singewald, N., Lubec, G., 2015. Dietary magnesium restriction reduces amygdala–hypothalamic GluN1 receptor complex levels in mice. *Brain Struct. Funct.* 220, 2209–2221. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0779-8>
- Gordon, E.M., Angel, N.L., Omelchenko, N., Chua-Alcala, V.S., Moradkhani, A., Quon, D., Wong, S., 2023. A Phase I/II Investigation of Safety and Efficacy of Nivolumab and *nab*-Sirolimus in Patients With a Variety of Tumors With Genetic Mutations in the mTOR Pathway. *Anticancer Res.* 43, 1993–2002. <https://doi.org/10.21873/anticancer.16360>
- Hansen, K.B., Yi, F., Perszyk, R.E., Menniti, F.S., Traynelis, S.F., 2017. Review. NMDA Receptors in the Central Nervous System, in: Burnashev, N., Szepietowski, P. (Eds.), *NMDA Receptors, Methods in Molecular Biology*. Springer New York, New York, NY, pp. 1–80. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7321-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7321-7_1)
- Hauser, M.J., Isbrandt, D., Roeper, J., 2017. Disturbances of novel object exploration and recognition in a chronic ketamine mouse model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.* 332, 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.013>
- Hedegaard, M., Hansen, K.B., Andersen, K.T., Bräuner-Osborne, H., Traynelis, S.F., 2012. Molecular pharmacology of human NMDA receptors. *Neurochem. Int.* 61, 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.11.016>
- Heekeren, K., Daumann, J., Neukirch, A., Stock, C., Kawohl, W., Norra, C., Waberski, T.D., Gouzoulis-Mayfrank, E., 2008. Mismatch negativity generation in the human 5HT2A agonist and NMDA antagonist model of psychosis. *Psychopharmacology (Berl.)* 199, 77–88. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1129-4>
- Helbling, S., Teki, S., Callaghan, M.F., Sedley, W., Mohammadi, S., Griffiths, T.D., Weiskopf, N., Barnes, G.R., 2015. Structure predicts function: Combining non-invasive electrophysiology with in-vivo histology. *NeuroImage* 108, 377–385. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.12.030>
- Herdegen, T., Zimmermann, M., 1995. Chapter 17 Immediate early genes (IEGs) encoding for inducible transcription factors (ITFs) and neuropeptides in the nervous system: functional network for long-term plasticity and pain, in: *Progress in Brain Research*. Elsevier, pp. 299–321. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61797-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61797-5)
- Hofmann, V., Sanguinetti-Scheck, J.I., Gómez-Sena, L., Engelmann, J., 2013. From static electric images to electric flow: Towards dynamic perceptual cues in active electroreception. *J. Physiol.-Paris* 107, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2012.06.003>
- Horka, P., Langova, V., Hubeny, J., Vales, K., Chrtkova, I., Horacek, J., 2024. Open field test for the assessment of anxiety-like behavior in *Gnathonemus petersii* fish. *Front. Behav. Neurosci.* 17, 1280608. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2023.1280608>
- Hurst, K.T., Vogeley, A., Greenstein, D.K., Durland, L., Makel, S., Wang, P.R., Yavi, M., Zarate, C.A., Ballard, E.D., 2024. Long-term follow-up of participants in ketamine clinical trials for mood disorders. *J. Affect. Disord.* 357, 134–137. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2024.04.062>
- Ikonomidou, C., Turski, L., 2002. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol.* 1, 383–386. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(02\)00164-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(02)00164-3)
- Irifune, M., Shimizu, T., Nomoto, M., 1991. Ketamine-induced hyperlocomotion associated with alteration of presynaptic components of dopamine neurons in the nucleus accumbens of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40, 399–407. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90571-I](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90571-I)
- Jiricek, S., Koudelka, V., Lacik, J., Vejmla, C., Kuratko, D., Wójcik, D.K., Raida, Z., Hlinka, J., Palenicek, T., 2021. Electrical Source Imaging in Freely Moving Rats: Evaluation of a 12-Electrode Cortical Electroencephalography System. *Front. Neuroinformatics* 14, 589228. <https://doi.org/10.3389/fninf.2020.589228>
- Kew, J.N.C., Kemp, J.A., 2005. Review. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl.)* 179, 4–29. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2200-z>
- Khan, H.N., Perlee, D., Schoenmaker, L., Van Der Meer, A.-J., Franitza, M., Toliat, M.R., Nürnberg, P., Zwinderman, A.H., Van Der Poll, T., Scicluna, B.P., 2019. Leukocyte transcriptional signatures

- dependent on LPS dosage in human endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* 106, 1153–1160. <https://doi.org/10.1002/JLB.4A0219-050R>
- Khormali, M., Heidari, S., Ahmadi, S., Arab Bafrani, M., Baigi, V., Sharif-Alhoseini, M., 2022. Review. N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in improving cognitive deficits following traumatic brain injury: a systematic review. *Brain Inj.* 36, 1071–1088. <https://doi.org/10.1080/02699052.2022.2109749>
- Kikuchi, T., 2020. Review. Is Memantine Effective as an NMDA Receptor Antagonist in Adjunctive Therapy for Schizophrenia? *Biomolecules* 10, 1134. <https://doi.org/10.3390/biom10081134>
- Kimmel, C.B., Warga, R.M., Schilling, T.F., 1990. Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development* 108, 581–594. <https://doi.org/10.1242/dev.108.4.581>
- Klingner, C.M., Langbein, K., Dietzek, M., Smesny, S., Witte, O.W., Sauer, H., Nenadic, I., 2014. Thalamocortical connectivity during resting state in schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 264, 111–119. <https://doi.org/10.1007/s00406-013-0417-0>
- Kovacic, P., Somanathan, R., 2010. Clinical Physiology and Mechanism of Dizocilpine (MK-801): Electron Transfer, Radicals, Redox Metabolites and Bioactivity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3, 13–22. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.1.10028>
- Krystal, J.H., Kavalali, E.T., Monteggia, L.M., 2024. Ketamine and rapid antidepressant action: new treatments and novel synaptic signaling mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 49, 41–50. <https://doi.org/10.1038/s41386-023-01629-w>
- Landsberger, M., Emde, G.V.D., Haverkate, D., Schuster, S., Gentsch, J., Ulbricht, E., Reichenbach, A., Makarov, F., Wagner, H.-J., 2008. Dim light vision – Morphological and functional adaptations of the eye of the mormyrid fish, *Gnathonemus petersii*. *J. Physiol.-Paris* 102, 291–303. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2008.10.015>
- Landsman, R.E., 1993. Sex differences in external morphology and electric organ discharges in imported *Gnathonemus petersii* (Mormyriiformes). *Anim. Behav.* 46, 417–429. <https://doi.org/10.1006/anbe.1993.1211>
- Landsman, R.E., Harding, C.F., Moller, P., Thomas, P., 1990. The effects of androgens and estrogen on the external morphology and electric organ discharge waveform of *Gnathonemus petersii* (Mormyridae, Teleostei). *Horm. Behav.* 24, 532–553. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(90\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0018-506X(90)90040-5)
- Langova, V., Horka, P., Hubeny, J., Novak, T., Vales, K., Adamek, P., Holubova, K., Horacek, J., 2023. Ketamine disrupts locomotion and electrolocation in a novel model of schizophrenia, *Gnathonemus petersii* fish. *J. Neurosci. Res.* 101, 1098–1106. <https://doi.org/10.1002/jnr.25186>
- Langova, V., Vales, K., Horka, P., Horacek, J., 2020. Review. The Role of Zebrafish and Laboratory Rodents in Schizophrenia Research. *Front. Psychiatry* 11, 703. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2020.00703>
- Lara Aparicio, S.Y., Laureani Fierro, Á. de J., Aranda Abreu, G.E., Toledo Cárdenas, R., García Hernández, L.I., Coria Ávila, G.A., Rojas Durán, F., Aguilar, M.E.H., Manzo Denes, J., Chi-Castañeda, L.D., Pérez Estudillo, C.A., 2022. Review. Current Opinion on the Use of c-Fos in Neuroscience. *NeuroSci* 3, 687–702. <https://doi.org/10.3390/neurosci3040050>
- Li, H., Chen, Y., Zhang, J., Lin, Y., Yang, Z., Tan, J., Qiao, W., 2021. Identification of the internal ribosome entry sites in the 5'-untranslated region of the *c-fos* gene. *Int. J. Mol. Med.* 47, 56. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4889>
- Li, J., Wang, J., Yang, Y., Gao, J., Zhang, X., 2025. The Effect of Electroconvulsive and Magnetic Seizure Therapy ( MST ) on Cortical Thickness in Schizophrenia. *CNS Neurosci. Ther.* 31, e70309. <https://doi.org/10.1111/cns.70309>
- Lipton, S.A., 2005. Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development: Molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders. *J. Alzheimers Dis.* 6, S61–S74. <https://doi.org/10.3233/JAD-2004-6S610>
- Lü, W., Du, J., Goehring, A., Gouaux, E., 2017. Cryo-EM structures of the triheteromeric NMDA receptor and its allosteric modulation. *Science* 355, eaal3729. <https://doi.org/10.1126/science.aal3729>
- Luby, E.D., Gottlieb, J.S., Cohen, B.D., Rosenbaum, G., Domino, E.F., 1962. MODEL PSYCHOSES AND SCHIZOPHRENIA. *Am. J. Psychiatry* 119, 61–67. <https://doi.org/10.1176/ajp.119.1.61>

- Lundt, A., Wormuth, C., Siwek, M.E., Müller, R., Ehninger, D., Henseler, C., Broich, K., Papazoglou, A., Weiergräber, M., 2016. EEG Radiotelemetry in Small Laboratory Rodents: A Powerful State-of-the Art Approach in Neuropsychiatric, Neurodegenerative, and Epilepsy Research. *Neural Plast.* 2016, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2016/8213878>
- Ma, Y.-N., Sun, Y.-X., Wang, T., Wang, H., Zhang, Y., Su, Y.-A., Li, J.-T., Si, T.-M., 2020. Subchronic MK-801 treatment during adolescence induces long-term, not permanent, excitatory-inhibitory imbalance in the rat hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* 867, 172807. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172807>
- Makki, J.S., 2016. Diagnostic Implication and Clinical Relevance of Ancillary Techniques in Clinical Pathology Practice. *Clin. Med. Insights Pathol.* 9, CPath.S32784. <https://doi.org/10.4137/CPath.S32784>
- Malayev, A., Gibbs, T.T., Farb, D.H., 2002. Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids: Subtype selective NMDA receptor modulation by steroids. *Br. J. Pharmacol.* 135, 901–909. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704543>
- Malhotra, M.D., A., 1997. Ketamine-Induced Exacerbation of Psychotic Symptoms and Cognitive Impairment in Neuroleptic-Free Schizophrenics. *Neuropsychopharmacology* 17, 141–150. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(97\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(97)00036-5)
- Martinez-Ramirez, L., Slate, A., Price, G.D., Duhaime, A.-C., Staley, K.J., Costine-Bartell, B.A., 2022. Robust, Long-Term Video EEG Monitoring in a Porcine Model of Post-Traumatic Epilepsy. *eneuro* 9, ENEURO.0025-22.2022. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0025-22.2022>
- Marwick, K.F.M., Skehel, P.A., Hardingham, G.E., Wyllie, D.J.A., 2019. The human NMDA receptor GluN2A<sup>N615K</sup> variant influences channel blocker potency. *Pharmacol. Res. Perspect.* 7. <https://doi.org/10.1002/prp2.495>
- Masayuki Hiramatsu, Cho, A.K., Toshitaka, N., 1989. Comparison of the behavioral and biochemical effects of the NMDA receptor antagonists, MK-801 and phencyclidine. *Eur. J. Pharmacol.* 166, 359–366. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(89\)90346-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(89)90346-4)
- Mathews, M.J., Mead, R.N., Galizio, M., 2018. Effects of N-Methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists ketamine, methoxetamine, and phencyclidine on the odor span test of working memory in rats. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 26, 6–17. <https://doi.org/10.1037/pha0000158>
- Meek, J., Hafmans, T.G.M., Joosten, H.W.J., 1992. An intriguing pitfall in chemical neuroanatomy: Specific populations of unspecifically immunoreactive neurons in the brain of the mormyrid fish *Gnathonemus petersii*. *J. Chem. Neuroanat.* 5, 181–191. [https://doi.org/10.1016/0891-0618\(92\)90043-P](https://doi.org/10.1016/0891-0618(92)90043-P)
- Meek, J., Joosten, H.W.J., 1993. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive cell groups in the brain of the teleost fish *Gnathonemus petersii*. *J. Chem. Neuroanat.* 6, 431–446. [https://doi.org/10.1016/0891-0618\(93\)90017-X](https://doi.org/10.1016/0891-0618(93)90017-X)
- Meek, J., Nieuwenhuys, R., Elsevier, D., 1986. Afferent and efferent connections of cerebellar lobe C<sub>1</sub> of the mormyrid fish *Gnathonemus petersii*: An HRP study. *J. Comp. Neurol.* 245, 319–341. <https://doi.org/10.1002/cne.902450304>
- Meenakshi, P., Kumar, S., Balaji, J., 2020. Immediate early gene expression dynamics in vivo segregates neuronal ensemble of multiple memories. <https://doi.org/10.1101/2020.12.17.423270>
- Melicher, T., Horacek, J., Hlinka, J., Spaniel, F., Tintera, J., Ibrahim, I., Mikolas, P., Novak, T., Mohr, P., Hoschl, C., 2015. White matter changes in first episode psychosis and their relation to the size of sample studied: A DTI study. *Schizophr. Res.* 162, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.01.029>
- Misgeld, T., Kerschensteiner, M., 2006. In vivo imaging of the diseased nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 449–463. <https://doi.org/10.1038/nrn1905>
- Mishra, A., Patni, P., Hegde, S., Aleya, L., Tewari, D., 2021. Review. Neuroplasticity and environment: A pharmacotherapeutic approach toward preclinical and clinical understanding. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* 19, 100210. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.09.004>

- Morales, M., Spear, L.P., 2014. The effects of an acute challenge with the NMDA receptor antagonists, MK-801, PEAQX, and ifenprodil, on social inhibition in adolescent and adult male rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 231, 1797–1807. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3278-3>
- Mueller, T., Dong, Z., Berberoglu, M.A., Guo, S., 2011. The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). *Brain Res.* 1381, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.089>
- Muguruza, C., Callado, L.F., 2022. Review. Glutamate, Glutamatergic Drugs and Schizophrenia, in: Pavlovic, Z.M. (Ed.), *Glutamate and Neuropsychiatric Disorders*. Springer International Publishing, Cham, pp. 493–521. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-87480-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-87480-3_17)
- Murakami, Y., Uchida, K., Rijli, F.M., Kuratani, S., 2005. Review. Evolution of the brain developmental plan: Insights from agnathans. *Dev. Biol.* 280, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.02.008>
- Nakamura, T., Dinh, T.H., Asai, M., Nishimaru, H., Matsumoto, J., Takamura, Y., Hori, E., Honda, S., Yamada, H., Mihara, T., Matsumoto, M., Nishijo, H., 2020. Non-invasive electroencephalographical (EEG) recording system in awake monkeys. *Heliyon* 6, e04043. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04043>
- Nakazawa, K., Jeevakumar, V., Nakao, K., 2017. Spatial and temporal boundaries of NMDA receptor hypofunction leading to schizophrenia. *Npj Schizophr.* 3, 7. <https://doi.org/10.1038/s41537-016-0003-3>
- Nikiforuk, A., Hołuj, M., Kos, T., Popik, P., 2016. The effects of a 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist in a ketamine-based rat model of cognitive dysfunction and the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropharmacology* 105, 351–360. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.01.035>
- Nilsson, G.E., 1996. Brain and Body Oxygen Requirements of *Gnathonemus Petersii*, a Fish with an Exceptionally Large Brain. *J. Exp. Biol.* 199, 603–607. <https://doi.org/10.1242/jeb.199.3.603>
- Oliveira, R.F., Silva, J.F., Simões, J.M., 2011. Fighting Zebrafish: Characterization of Aggressive Behavior and Winner–Loser Effects. *Zebrafish* 8, 73–81. <https://doi.org/10.1089/zeb.2011.0690>
- Olney, J.W., Wozniak, D.F., Jevtovic-Todorovic, V., Farber, N.B., Bittigau, P., Ikonomidou, C., 2006. Drug-induced Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Brain. *Brain Pathol.* 12, 488–498. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2002.tb00467.x>
- Owen, T.A., Cosenza, S.C., Soprano, D.R., Soprano, K.J., 1987. Time of c-fos and c-myc expression in human diploid fibroblasts stimulated to proliferate after prolonged periods in quiescence. *J. Biol. Chem.* 262, 15111–15117. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48145-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48145-8)
- Özdemir, S., Altun, S., Özkaraca, M., Ghosi, A., Toraman, E., Arslan, H., 2018. Cypermethrin, chlorpyrifos, deltamethrin, and imidacloprid exposure up-regulates the mRNA and protein levels of bdnf and c-fos in the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 203, 318–326. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.190>
- Pafundo, D.E., Pretell Annan, C.A., Fulginiti, N.M., Belforte, J.E., 2021. Early NMDA Receptor Ablation in Interneurons Causes an Activity-Dependent E/I Imbalance in vivo in Prefrontal Cortex Pyramidal Neurons of a Mouse Model Useful for the Study of Schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 47, 1300–1309. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbab030>
- Paoletti, P., Bellone, C., Zhou, Q., 2013. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
- Park, E., He, C., Abbasi, A.Z., Tian, M., Huang, S., Wang, L., Georgiou, J., Collingridge, G.L., Fraser, P.E., Henderson, J.T., Wu, X.Y., 2025. Brain microenvironment-remodeling nanomedicine improves cerebral glucose metabolism, mitochondrial activity and synaptic function in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Biomaterials* 318, 123142. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2025.123142>
- Parsons, C.G., 2001. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01307-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01307-3)
- Passie, T., Adams, H.-A., Logemann, F., Brandt, S.D., Wiese, B., Karst, M., 2021. Comparative effects of (S)-ketamine and racemic (R/S)-ketamine on psychopathology, state of consciousness and neurocognitive performance in healthy volunteers. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 44, 92–104. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.01.005>

- Pedraja, F., Herzog, H., Engelmann, J., Jung, S.N., 2021. The Use of Supervised Learning Models in Studying Agonistic Behavior and Communication in Weakly Electric Fish. *Front. Behav. Neurosci.* 15, 718491. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.718491>
- Pedraja, F., Sawtell, N.B., 2024. Collective sensing in electric fish. *Nature* 628, 139–144. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07157-x>
- Pezzanite, B., Moller, P., 1998. A sexually dimorphic basal anal-fin ray expansion in the weakly discharging electric fish *Gnathonemus petersii*. *J. Fish Biol.* 53, 638–644. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01007.x>
- Pichardo-Rojas, D., Pichardo-Rojas, P.S., Cornejo-Bravo, J.M., Serrano-Medina, A., 2023. Memantine as a neuroprotective agent in ischemic stroke: Preclinical and clinical analysis. *Front. Neurosci.* 17, 1096372. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1096372>
- Plataki, M.E., Diskos, K., Sougklakos, C., Velissariou, M., Georgilis, A., Stavroulaki, V., Sidiropoulou, K., 2021. Effect of Neonatal Treatment With the NMDA Receptor Antagonist, MK-801, During Different Temporal Windows of Postnatal Period in Adult Prefrontal Cortical and Hippocampal Function. *Front. Behav. Neurosci.* 15, 689193. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.689193>
- Pomarol-Clotet, E., Honey, G.D., Murray, G.K., Corlett, P.R., Absalom, A.R., Lee, M., McKenna, P.J., Bullmore, E.T., Fletcher, P.C., 2006. Psychological effects of ketamine in healthy volunteers: Phenomenological study. *Br. J. Psychiatry* 189, 173–179. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.105.015263>
- Powers Iii, A.R., Gancsos, M.G., Finn, E.S., Morgan, P.T., Corlett, P.R., 2015. Ketamine-Induced Hallucinations. *Psychopathology* 48, 376–385. <https://doi.org/10.1159/000438675>
- Prechtel, J.C., Von Der Emde, G., Wolfart, J., Karamürsel, S., Akoev, G.N., Andrianov, Y.N., Bullock, T.H., 1998. Sensory Processing in the Pallium of a Mormyrid Fish. *J. Neurosci.* 18, 7381–7393. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-18-07381.1998>
- Premoli, M., Pietropaolo, S., Wöhr, M., Simola, N., Bonini, S.A., 2023. Review. Mouse and rat ultrasonic vocalizations in neuroscience and neuropharmacology: State of the art and future applications. *Eur. J. Neurosci.* 57, 2062–2096. <https://doi.org/10.1111/ejn.15957>
- Qin, Z., Zhang, L., Zasloff, M.A., Stewart, A.F.R., Chen, H.-H., 2021. Ketamine’s schizophrenia-like effects are prevented by targeting PTP1B. *Neurobiol. Dis.* 155, 105397. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105397>
- Rawat, V., 2015. Role of AP-1 protein c-fos in regulation of neuronal survival (Order No. 3719450). Available from ProQuest Dissertations & Theses Global. (1713688651). Retrieved from <http://ezproxy.techlib.cz/login?url=https://www.proquest.com/dissertations-theses/role-ap-1-protein-c-fos-regulation-neuronal/docview/1713688651/se-2, 2015th ed>.
- Riehl, R., Kyzar, E., Allain, A., Green, J., Hook, M., Monnig, L., Rhymes, K., Roth, A., Pham, M., Razavi, R., DiLeo, J., Gaikwad, S., Hart, P., Kalueff, A.V., 2011. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 658–667. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.05.011>
- S Berndt, L.C., Singh, K.D., Shaw, A.D., 2024. Restoring Synaptic Balance in Schizophrenia: Insights from a thalamo-cortical conductance-based model. <https://doi.org/10.1101/2024.11.13.623344>
- Sakurai, K., 2024. Rethinking c-Fos for understanding drug action in the brain. *J. Biochem. (Tokyo)* 175, 377–381. <https://doi.org/10.1093/jb/mvad110>
- Samizadeh, M.-A., Abdollahi-Keyvani, S.-T., Fallah, H., Beigi, B., Motamedi-Manesh, A., Adibian, S., Vaseghi, S., 2024. Sex difference alters the behavioral and cognitive performance in a rat model of schizophrenia induced by sub-chronic ketamine. *J. Psychiatr. Res.* 178, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2024.08.014>
- Schiller, K., Berrahmoune, S., Dassi, C., Corriveau, I., Ayash, T.A., Osterman, B., Poulin, C., Shevell, M.I., Simard-Tremblay, E., Sébire, G., Myers, K.A., 2023. Randomized placebo-controlled crossover trial of memantine in children with epileptic encephalopathy. *Brain* 146, 873–879. <https://doi.org/10.1093/brain/awac380>

- Schuler, H., Bonapersona, V., Joëls, M., Sarabdjitsingh, R.A., 2022. Effects of early life adversity on immediate early gene expression: Systematic review and 3-level meta-analysis of rodent studies. *PLOS ONE* 17, e0253406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253406>
- Scimemi, A., Schorge, S., Kullmann, D.M., Walker, M.C., 2006. Epileptogenesis Is Associated With Enhanced Glutamatergic Transmission in the Perforant Path. *J. Neurophysiol.* 95, 1213–1220. <https://doi.org/10.1152/jn.00680.2005>
- Sehatpour, P., Iosifescu, D.V., De Baun, H.M., Shope, C., Mayer, M.R., Gangwisch, J., Dias, E., Sobeih, T., Choo, T.-H., Wall, M.M., Medalia, A., Saperstein, A.M., Kegeles, L.S., Girgis, R.R., Carlson, M., Kantrowitz, J.T., 2023. Dose-Dependent Augmentation of Neuroplasticity-Based Auditory Learning in Schizophrenia: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized, Target Engagement Clinical Trial of the NMDA Glutamate Receptor Agonist d-serine. *Biol. Psychiatry* 94, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2023.01.015>
- Shaulian, E., Karin, M., 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131–E136. <https://doi.org/10.1038/ncb0502-e131>
- Shi, W., Hou, X., Peng, H., Zhang, L., Li, Y., Gu, Z., Jiang, Q., Shi, M., Ji, Y., Jiang, J., 2014. MEK/ERK signaling pathway is required for enterovirus 71 replication in immature dendritic cells. *Viol. J.* 11, 227. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0227-7>
- Simola, N., Granon, S., 2019. Review. Ultrasonic vocalizations as a tool in studying emotional states in rodent models of social behavior and brain disease. *Neuropharmacology* 159, 107420. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.11.008>
- Simonini, A., Brogi, E., Cascella, M., Vittori, A., 2022. Review. Advantages of ketamine in pediatric anesthesia. *Open Med.* 17, 1134–1147. <https://doi.org/10.1515/med-2022-0509>
- Solmi, M., Seitidis, G., Mavridis, D., Correll, C.U., Dragioti, E., Guimond, S., Tuominen, L., Dargél, A., Carvalho, A.F., Fornaro, M., Maes, M., Monaco, F., Song, M., Il Shin, J., Cortese, S., 2023. Review. Incidence, prevalence, and global burden of schizophrenia - data, with critical appraisal, from the Global Burden of Disease (GBD) 2019. *Mol. Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02138-4>
- Spark, D.L., Ma, S., Nowell, C.J., Langmead, C.J., Stewart, G.D., Nithianantharajah, J., 2024. Sex-Dependent Attentional Impairments in a Subchronic Ketamine Mouse Model for Schizophrenia. *Biol. Psychiatry Glob. Open Sci.* 4, 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.bpsgos.2023.05.003>
- Squarcio, F., Hitrec, T., Luppi, M., Martelli, D., Occhinegro, A., Piscitiello, E., Taddei, L., Tupone, D., Amici, R., Cerri, M., 2023. Ultrasonic vocalisations during rapid eye movement sleep in the rat. *J. Sleep Res.* e13993. <https://doi.org/10.1111/jsr.13993>
- Steffens, M., Krämer, B., Weber, M.M., Spitzer, M., Nagels, A., Hüll, M., Vogeley, K., Shah, N.J., Habel, U., 2018. Effects of ketamine on brain function during response inhibition: a randomized, placebo-controlled, crossover fMRI study in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 43, 2210–2216. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0134-7>
- Sukhum, K.V., Freiler, M.K., Wang, R., Carlson, B.A., 2016. The costs of a big brain: extreme encephalization results in higher energetic demand and reduced hypoxia tolerance in weakly electric African fishes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283, 20162157. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2157>
- Surti, T.S., Ranganathan, M., Johannesen, J.K., Gueorguieva, R., Deaso, E., Kenney, J.G., Krystal, J.H., D'Souza, D.C., 2023. Randomized controlled trial of the glycine transporter 1 inhibitor PF-03463275 to enhance cognitive training and neuroplasticity in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 256, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2023.04.010>
- Tang, W., Beckley, J.T., Zhang, J., Song, R., Xu, Y., Kim, S., Quirk, M.C., Robichaud, A.J., Diaz, E.S., Myers, S.J., Doherty, J.J., Ackley, M.A., Traynelis, S.F., Yuan, H., 2023. Novel neuroactive steroids as positive allosteric modulators of NMDA receptors: mechanism, site of action, and rescue pharmacology on GRIN variants associated with neurological conditions. *Cell. Mol. Life Sci.* 80, 42. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04667-7>
- Terleph, T.A., Moller, P., 2003. Effects of social interaction on the electric organ discharge in a mormyrid fish, *Gnathonemus petersii* (Mormyridae, Teleostei). *J. Exp. Biol.* 206, 2355–2362. <https://doi.org/10.1242/jeb.00437>

- Tishler, T.A., Ellingson, B.M., Salvatore, G., Baker, P., Turkoz, I., Subotnik, K.L., De La Fuente-Sandoval, C., Nuechterlein, K.H., Alphas, L., 2023. Effect of treatment with paliperidone palmitate versus oral antipsychotics on frontal lobe intracortical myelin volume in participants with recent-onset schizophrenia: Magnetic resonance imaging results from the DREaM study. *Schizophr. Res.* 255, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2023.03.023>
- Topchiy, I., Fink, A.M., Maki, K.A., Calik, M.W., 2022. Validation of PiezoSleep Scoring Against EEG/EMG Sleep Scoring in Rats. *Nat. Sci. Sleep* Volume 14, 1877–1886. <https://doi.org/10.2147/NSS.S381367>
- Tordjman, S., Drapier, D., Bonnot, O., Graignic, R., Fortes, S., Cohen, D., Millet, B., Laurent, C., Roubertoux, P.L., 2007. Review. Animal Models Relevant to Schizophrenia and Autism: Validity and Limitations. *Behav. Genet.* 37, 61–78. <https://doi.org/10.1007/s10519-006-9120-5>
- Trevlopoulou, A., Touzlatzi, N., Pitsikas, N., 2016. The nitric oxide donor sodium nitroprusside attenuates recognition memory deficits and social withdrawal produced by the NMDA receptor antagonist ketamine and induces anxiolytic-like behaviour in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 233, 1045–1054. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4181-x>
- Uceda, S., Ocaña, F.M., Martín-Monzón, I., Rodríguez-Expósito, B., Durán, E., Rodríguez, F., 2015. Spatial learning-related changes in metabolic brain activity contribute to the delimitation of the hippocampal pallium in goldfish. *Behav. Brain Res.* 292, 403–408. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.06.018>
- Umesh Rudrapatna, S., Wieloch, T., Beirup, K., Ruscher, K., Mol, W., Yanev, P., Leemans, A., Van Der Toorn, A., Dijkhuizen, R.M., 2014. Can diffusion kurtosis imaging improve the sensitivity and specificity of detecting microstructural alterations in brain tissue chronically after experimental stroke? Comparisons with diffusion tensor imaging and histology. *NeuroImage* 97, 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.04.013>
- Vargas, J.P., López, J.C., Portavella, M., 2009. What are the functions of fish brain pallium? *Brain Res. Bull.* 79, 436–440. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.05.008>
- Vinnakota, C., Schroeder, A., Du, X., Ikeda, K., Ide, S., Mishina, M., Hudson, M., Jones, N.C., Sundram, S., Hill, R.A., 2024. Understanding the role of the NMDA receptor subunit, *GLUN2D*, in mediating NMDA receptor antagonist-induced behavioral disruptions in male and female mice. *J. Neurosci. Res.* 102, e25257. <https://doi.org/10.1002/jnr.25257>
- Von Der Emde, G., Amey, M., Engelmann, J., Fetz, S., Folde, C., Hollmann, M., Metzen, M., Pusch, R., 2008. Active electrolocation in *Gnathonemus petersii*: Behaviour, sensory performance, and receptor systems. *J. Physiol.-Paris* 102, 279–290. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2008.10.017>
- Von Der Emde, G., Fetz, S., 2007. Distance, shape and more: recognition of object features during active electrolocation in a weakly electric fish. *J. Exp. Biol.* 210, 3082–3095. <https://doi.org/10.1242/jeb.005694>
- Von Der Emde, G., Schwarz, S., 2002. Imaging of Objects through active electrolocation in *Gnathonemus petersii*. *J. Physiol.-Paris* 96, 431–444. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(03\)00021-4](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(03)00021-4)
- Von Der Emde, G., Schwarz, S., Gomez, L., Budelli, R., Grant, K., 1998. Electric fish measure distance in the dark. *Nature* 395, 890–894. <https://doi.org/10.1038/27655>
- Von Der Emde, G., Zelick, R., 1995. Behavioral detection of electric signal waveform distortion in the weakly electric fish, *Gnathonemus petersii*. *J. Comp. Physiol. A* 177, 493–501. <https://doi.org/10.1007/BF00187484>
- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M., Vyklicky, L., 2014. Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels. *Physiol. Res.* S191–S203. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932678>
- Vyklicky, V., Krausova, B., Cerny, J., Balik, A., Zapotocky, M., Novotny, M., Lichnerova, K., Smejkalova, T., Kaniakova, M., Korinek, M., Petrovic, M., Kacer, P., Horak, M., Chodounska, H., Vyklicky, L., 2015. Block of NMDA receptor channels by endogenous neurosteroids: implications for the agonist induced conformational states of the channel vestibule. *Sci. Rep.* 5, 10935. <https://doi.org/10.1038/srep10935>
- Wang, C., Tishler, T., Nuechterlein, K., Ellingson, B., 2023. Cortical thickness, gray-white matter contrast, and intracortical myelin in first-episode schizophrenia patients treated with long-acting

- paliperidone palmitate versus oral antipsychotics. *Psychiatry Res.* 326, 115364. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2023.115364>
- Wasserthal, S., Lehmann, M., Neumann, C., Delis, A., Philipsen, A., Hurlemann, R., Ettinger, U., Schultz, J., 2023. Effects of NMDA-receptor blockade by ketamine on mentalizing and its neural correlates in humans: a randomized control trial. *Sci. Rep.* 13, 17184. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44443-6>
- Williams, A., Roberts, P.D., Leen, T.K., 2003. Stability of negative-image equilibria in spike-timing-dependent plasticity. *Phys. Rev. E* 68, 021923. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.68.021923>
- Wong, S., Le, G.H., Mansur, R.B., Rosenblat, J.D., McIntyre, R.S., 2025. Functional Connectivity Between Glutamate Receptor Antagonism and Insulin Pathways: Implications for Modeling Mechanism of Action of Ketamine/Esketamine and Dextromethorphan in Depression Treatment. *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging* 10, 241–243. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2024.10.004>
- Woodward, M.L., Gicas, K.M., Warburton, D.E., White, R.F., Rauscher, A., Leonova, O., Su, W., Smith, G.N., Thornton, A.E., Vertinsky, A.T., Phillips, A.A., Goghari, V.M., Honer, W.G., Lang, D.J., 2018. Hippocampal volume and vasculature before and after exercise in treatment-resistant schizophrenia. *Schizophr. Res.* 202, 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.06.054>
- Wullimann, M.F., Grothe, B., 2013. Review. The Central Nervous Organization of the Lateral Line System, in: Coombs, S., Bleckmann, H., Fay, R.R., Popper, A.N. (Eds.), *The Lateral Line System*, Springer Handbook of Auditory Research. Springer New York, New York, NY, pp. 195–251. [https://doi.org/10.1007/2506\\_2013\\_18](https://doi.org/10.1007/2506_2013_18)
- Xie, R., Xie, J., Ye, Y., Wang, X., Chen, F., Yang, L., Yan, Y., Liao, L., 2020. mTOR Expression in Hippocampus and Prefrontal Cortex Is Downregulated in a Rat Model of Schizophrenia Induced by Chronic Administration of Ketamine. *J. Mol. Neurosci.* 70, 269–275. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01476-9>
- Xu, W., Li, H., Wang, L., Zhang, J., Liu, C., Wan, X., Liu, X., Hu, Y., Fang, Q., Xiao, Y., Bu, Q., Wang, H., Tian, J., Zhao, Y., Cen, X., 2020. Endocannabinoid signaling regulates the reinforcing and psychostimulant effects of ketamine in mice. *Nat. Commun.* 11, 5962. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19780-z>
- Yang, H., Shan, W., Zhu, F., Yu, T., Fan, J., Guo, A., Li, F., Yang, X., Wang, Q., 2019. C-Fos mapping and EEG characteristics of multiple mice brain regions in pentylentetrazol-induced seizure mice model. *Neurol. Res.* 41, 749–761. <https://doi.org/10.1080/01616412.2019.1610839>
- Yoshimura, Y., Nakamura, K., Seno, M., Mochizuki, M., Kawai, K., Koba, S., Watanabe, T., 2023. Generation of *c-Fos* knockout rats, and observation of their phenotype. *Exp. Anim.* 72, 95–102. <https://doi.org/10.1538/expanim.22-0077>
- Yu, K., Song, Z., Zhang, B., Pan, Q., Gan, S., Yang, S., Yang, Q., Zuo, X., Yin, Y., 2023. Effect of postoperative application of esketamine on postoperative depression and postoperative analgesia in patients undergoing pancreatoduodenectomy: a randomized controlled trial protocol. *Trials* 24, 546. <https://doi.org/10.1186/s13063-023-07575-8>
- Zanos, P., Brown, K.A., Georgiou, P., Yuan, P., Zarate, C.A., Thompson, S.M., Gould, T.D., 2023. NMDA Receptor Activation-Dependent Antidepressant-Relevant Behavioral and Synaptic Actions of Ketamine. *J. Neurosci.* 43, 1038–1050. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1316-22.2022>
- Zeymer, M., Von Der Emde, G., Wullimann, M.F., 2018. The Mormyrid Optic Tectum Is a Topographic Interface for Active Electrolocation and Visual Sensing. *Front. Neuroanat.* 12, 79. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00079>