

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor:

Učitelství chemie pro střední školy – Učitelství biologie pro střední školy



Bc. Daniela Alexová

**Neurální aktivita u stereotypního chování v quinpirolem  
indukovaném zvířecím modelu obsedantně kompulsivní poruchy  
(OCD)**

Neuronal activity during stereotypical behavior in quinpirole induced animal model  
of Obsessive Compulsive Disorder (OCD)

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Karel Valeš, PhD.

Praha, 2019



## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně na základě konzultací s vedoucím práce, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k zisku jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 29. dubna 2019

Bc. Daniela Alexová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Karlovi Valešovi, Ph.D. za průběžné konzultace a množství konstruktivních rad a připomínek ke tvorbě diplomové práce. Velké díky patří taktéž Mgr. Hance Brožce za pomoc při přípravě experimentální části této práce, asistenci při statistickém vyhodnocování získaných dat a za cenné rady týkající se psaní diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Dominice Radostové za cenná doporučení týkající se pravidel manipulace se zvířaty a práce v RNáz prostém prostředí. V neposlední řadě děkuji svému příteli, rodině a přátelům za neutuchající podporu při psaní diplomové práce.

## ABSTRAKT

Hlavním cílem této práce bylo určit změny v neuronální aktivitě anteriorní cingulární kůry (ACC), orbitofrontální kůry (OFC) a mediální prefrontální kůry (MPC) potkanů senzitivovaných agonistou D2/D3 receptorů quinpirolem (QNP) během exploračního obohaceného otevřeného pole. Během experimentu byly také vyhodnoceny změny v chování potkanů vyvolané senzitivací QNP a srovnány s předchozími výsledky.

K experimentu bylo využito 22 dospělých samců potkanů kmene Long-Evans. Polovině potkanů byla každý den podávána subkutánní injekce quinpirolu v dávce 0,5 mg/kg, zatímco druhé polovině potkanů byl podáván fyziologický roztok. Obě skupiny absolvovaly 10 habituálních sezení v otevřeném poli obohaceném o dva kovové objekty. Chování potkanů bylo nahráváno a byly získány data o lokomoční aktivitě a frekvenci návštěv zón arény. Jedenáctý experimentální den část QNP senzitivovaných a kontrolních zvířat explorovala obohacené otevřené pole ( $t = 5$  minut), zatímco druhá část potkanů byla ponechána jako klecová kontrola. Ihned po skončení experimentu byla pokusná zvířata dekapitována a extrahované mozky byly kryoprezervovány. Za účelem vizualizace neuronální aktivity ACC, OFC a MPC byla na ultratenkých řezech získané mozkové tkáně provedena *Arc* fluorescenční *in situ* hybridizace a byly získány podíly *Arc* exprimujících neuronů jednotlivých oblastí.

V souladu s předchozími výsledky i v naší studii vedla senzitivace QNP k významnému nárůstu lokomoce a frekvence návštěv zón arény. Quinpirolem senzitivovaná zvířata vykazovala časově stabilní rozdíly v preferenci jednotlivých zón. Pozorovali jsme významně zvýšený podíl *Arc* exprimujících neuronů v OFC QNP senzitivovaných potkanů. Tyto rozdíly v expresi *Arc* neuronů OFC byly dány vysokou bazální expresí *Arc* u QNP senzitivovaných zvířat. V ACC a MPC nebyly pozorovány významné rozdíly v podílech *Arc* exprimujících neuronů QNP mezi QNP senzitivovanými a kontrolními potkany. Výsledky této studie naznačují, že quinpirolem indukované kompulzivní kontrolování není reflektováno změnami v aktivitách OFC a ACC, struktur implikovaných v patofyziologii OCD, avšak bazální aktivita neuronů OFC je zvýšena samotným podáním QNP.

**Klíčová slova:** obsedantně-kompulzivní porucha, quinpirol, neuroanatomické koreláty, animální model, dopamin, *Arc*, geny s časovou expresí (IEG), fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

## ABSTRACT

The main aim of this study was to determine the changes in neuronal activity of anterior cingulate cortex (ACC), orbitofrontal cortex (OFC) and medial prefrontal cortex (MPC) in rats sensitized to D2/D3 receptor agonist quinpirole (QNP) during exploration of enriched open field arena. During the experiment, the evaluation of behavioural changes induced by quinpirole sensitization were also assessed and compared to previous results.

For the purpose of this study, twenty-two adult male Long-Evans rats were used. The half of the rats was sensitized to QNP by receiving daily subcutaneous injections of quinpirole (0,5 mg/kg) while the other half received saline. Both groups were habituated for ten days to open-field arena enriched with two metal objects. The behaviour of animals was videotaped and the data about locomotion and the number of visits of each locale was obtained. On the eleventh day, the part of saline and quinpirole treated groups explored the open-field arena ( $t = 5$  min) while the other two subgroups were left as respective cage-controls. Immediately after the end of experiment, all rats were sacrificed, and the extracted brains were cryopreserved. To determine the changes in neuronal activity of selected brain regions, fluorescence *in situ* hybridization of immediate early gene *Arc* was performed on the brain tissue of sacrificed rats and the proportion of neurons expressing *Arc* mRNA were obtained.

In agreement with previous studies, QNP sensitization led to the significant increase of locomotion and the checking behaviour compared to controls. Quinpirole sensitized animals displayed temporally stable preference of locales. We observed a significant increase in proportion of *Arc* expressing neurons of OFC of QNP sensitized animals. These differences in expression of *Arc* in OFC were caused by high baseline expression of QNP sensitized cage-controls. There were no significant differences in proportions of *Arc* expressing neurons in MPC or ACC in QNP sensitized animals compared to controls. The significant changes rather than by elevated *Arc* expression during compulsive checking. The results of this study suggest quinpirole induced compulsive checking is not reflected in altered activity of OFC and ACC, structures implicated in OCD pathophysiology. The injection of QNP, however, increases the baseline activity of OFC neurons.

**Key words:** obsessive-compulsive disorder, quinpirole, neuroanatomic correlates, animal model, dopamine, *Arc*, immediate early genes (IEG), fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

## SEZNAM ZKRATEK

<b>8-OHDPAT</b>	8-hydroxy-2-(di-n-propylamin)-tetralin hydrobromid	<i>8-hydroxy-2-(di-n-propylamine)-tetraline hydrobromide</i>
<b>ACC</b>	anteriorní cingulární kůra	<i>anterior cingulate cortex</i>
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina	<i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionic acid</i>
<b>AMPAR</b>	receptor $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové kyseliny	<i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionic acid receptor</i>
<b>ANOVA</b>	analýza rozptylu	<i>analysis of variance</i>
<b>Arc</b>	gen pro aktivitou regulovaný s cytoskeletem asociovaný protein	<i>activity-regulated cytoskeleton associated protein gene</i>
<b>Arc</b>	aktivitou regulovaný s cytoskeletem asociovaný protein	<i>activity-regulated cytoskeleton associated protein</i>
<b>cAMP</b>	cyklický adenosin monofosfát	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
<b>CNS</b>	centrální nervový systém	<i>central nervous system</i>
<b>CREB</b>	protein vázající element responzivní pro cAMP	<i>cAMP regulatory element-binding protein</i>
<b>CY3</b>	tyrkysová barva 3	<i>cyanine dye 3</i>
<b>CY-BOCS</b>	dětská verze Yale-Brownovy obsedantně-kompulzivní škály	<i>Children Yale-Brown obsessive-compulsive scale</i>
<b>DA</b>	dopaminergní	<i>dopaminergic</i>
<b>DAPI</b>	4',6-diamidin-2-fenylindol	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
<b>DARPP-32</b>	dopaminem a cAMP regulovaný fosfoprotein 32	<i>dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein 32</i>
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina	<i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>DR</b>	dopaminové receptory	<i>dopamine receptors</i>
<b>DSM-V</b>	Diagnostický a statistický manuál mentálních poruch, 5. vydání	<i>Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th edition</i>
<b>ERC</b>	extracelulárním signálem regulovaná kináza	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>EVH1</b>	Ena/VASP homologická doména A	<i>Ena/VASP homologic domain A</i>
<b>FISH</b>	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace	<i>fluorescence in situ hybridization</i>
<b>FS</b>	fronto-striální	<i>fronto-striatal</i>
<b>GABA</b>	kyselina $\gamma$ -aminomáselná	<i><math>\gamma</math>-aminobutanoic acid</i>

<b>GPe</b>	<i>globus pallidus pars externa</i>	<i>globus pallidus pars externa</i>
<b>GPI</b>	<i>globus pallidus pars interna</i>	<i>globus pallidus pars interna</i>
<b>HB</b>	domovská základna	<i>home-base</i>
<b>IEG</b>	geny okamžité exprese	<i>immediate-early genes</i>
<b>LRG</b>	geny pozdní odpovědi	<i>late-response genes</i>
<b>MPC</b>	mediální prefrontální kůra	<i>medial prefrontal cortex</i>
<b>MSN</b>	středně velké trnité projekční neurony	<i>medium spiny neurons</i>
<b>MQIKK</b>	model quinpirolem indukovaného kompulzivního kontrolování	<i>the model of quinpirole-induced compulsive checking</i>
<b>NAc</b>	nucleus accumbens	<i>nucleus accumbens</i>
<b>NET</b>	noradrenalinový transportér	<i>norepinephrine transporter</i>
<b>NMDAR</b>	receptor N-methyl-D-asparagové kyseliny	<i>N-methyl-D-aspartate acid receptor</i>
<b>OCD</b>	obsedantně-kompulzivní porucha	<i>obsessive-compulsive disorder</i>
<b>OCT</b>	médium pro optimální teplotu při krájení	<i>optimal cutting temperature medium</i>
<b>OF</b>	otevřené pole	<i>open field</i>
<b>OFC</b>	orbitofrontální kůra	<i>orbitofrontal cortex</i>
<b>PFC</b>	prefrontální kůra	<i>prefrontal cortex</i>
<b>QNP</b>	quinpirol/(4aR,8aR)-5-propyl-1,4,4a,6,7,8,8a,9-octahydropyrazol [3,4-g]chinolín	<i>quinpirole/(4aR,8aR)-5-propyle-1,4,4a,6,7,8,8a,9-octahydropyrazole [3,4-g]chinoline</i>
<b>ROI</b>	oblast zájmu	<i>region of interest</i>
<b>RNA</b>	ribonukleová kyselina	<i>ribonucleic acid</i>
<b>SAL</b>	fyzilogický roztok	<i>saline</i>
<b>SD</b>	dimenze symptomů	<i>symptom dimension</i>
<b>SET</b>	serotoninový transportér	<i>serotonin transporter</i>
<b>SNr</b>	<i>substantia nigra pars reticulata</i>	<i>substantia nigra pars reticulata</i>
<b>SNRI</b>	inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu	<i>serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors</i>
<b>SSC</b>	roztok citronanu sodného a chloridu sodného	<i>saline sodium citrate solution</i>



<b>SSRI</b>	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu	<i>selective serotonin reuptake inhibitors</i>
<b>STN</b>	subtalamičká jádra	<i>subthalamic nucleus</i>
<b>TBS</b>	Tris pufovaný fyziologickým roztokem	<i>Tris buffered saline</i>
<b>TBS-T</b>	Tris pufovaný fyziologickým roztokem a Tween 20	<i>Tris buffered saline with Tween 20</i>
<b>Tris</b>	trisaminomethan	<i>trisaminomethane</i>
<b>TSA</b>	tyramidová amplifikace signálu	<i>tyramide signal amplification</i>
<b>Tween 20</b>	<i>polysorbát 20</i>	<i>polysorbate 20</i>
<b>Y-BOCS</b>	Yale-Brownova obsedantně-kompulzivní škála	<i>Yale-Brown obsessive-compulsive scale</i>

# OBSAH

## Teoretická část

1	ÚVOD .....	1
2	OBSEDANTNĚ-KOMPULZIVNÍ PORUCHA .....	2
	2.1 Obecná charakteristika onemocnění .....	2
	2.2 Animální model kompulzivního kontrolování .....	5
	2.2.1 Charakteristika quinpirolem indukovaného kompulzivního kontrolování ....	5
	2.2.2 Validita modelu quinpirolem indukovaného kompulzivního kontrolování ...	6
3	DOPAMIN .....	9
	3.1 Dopamin a dopaminergní dráhy .....	9
	3.2 Dopaminové receptory .....	10
	3.3 Zapojení dopaminergního systému u OCD .....	12
4	NEUROANATOMICKÉ KORELÁTY OCD .....	13
	4.1 Fronto-striatální okruhy .....	13
	4.1.1 Anatomie fronto-striatálních okruhů .....	13
	4.1.2 Neurochemie fronto-striatálního okruhu .....	16
	4.2 Neurobiologické teorie OCD .....	17
5	MAPOVÁNÍ NEURONÁLNÍ AKTIVITY V MOZKU .....	20
	5.1 Geny okamžité exprese .....	20
	5.1.1 Aktivitou regulovaný s cytoskeletem asociovaný protein .....	20

## Experimentální část

6	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....	22
7	MATERIÁL A METODY .....	23
	7.1 Pokusná zvířata .....	23
	7.2 Použité chemické látky .....	23
	7.2.1 Sensitizace quinpirolem .....	23

7.2.2	Perfuze .....	23
7.2.3	<i>In situ</i> hybridizace.....	24
7.3	Behaviorální aparatura .....	24
7.4	Metodické postupy .....	25
7.4.1	Behaviorální část experimentu .....	25
7.4.2	Imunohistochemická část experimentu.....	27
7.4.3	Statistické vyhodnocení dat .....	30
8	VÝSLEDKY .....	32
8.1	Behaviorální část experimentu .....	32
8.1.1	Explorace OF prostředí za účelem indukce exprese IEG .....	37
8.2	Mapování neuronální aktivity.....	38
8.2.1	Imunohistochemická část .....	38
9	DISKUZE .....	42
10	ZÁVĚR .....	47
11	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	48

# 1 ÚVOD

Obsedantně kompulzivní porucha (OCD) je rozšířená neuropsychiatrická porucha charakterizovaná výskytem obsesí a/nebo kompulzí. OCD je spojena se sníženou kvalitou osobního a pracovního života pacientů i jejich blízkých. Dopady na život pacientů jsou tak rozsáhlé, že byla OCD Světovou zdravotnickou organizací (WHO) v roce 2001 zařazena mezi 20 hlavních příčin disability jedinců ve věku 15–44 let. I přes rozsáhlý výzkum terapeutických intervencí jsou v současnosti možnosti léčby tohoto onemocnění pouze omezené a jejich úspěšnost není příliš vysoká.

K výzkumu nových a efektivnějších možností léčby OCD přispívají dobře definované a detailně charakterizované animální modely. Jedním z takových animálních modelů OCD je model chronické administrace agonisty dopaminových receptorů typu D2/D3 quinpirolu (QNP) laboratorním potkanům, který u potkanů vyvolává chování připomínající kompulzivní kontrolování pacientů s OCD. Chování QNP senzitivizovaných potkanů bylo v minulosti již z velké části detailně popsáno (pro přehled viz Szechtman et al., 2001), dosud však nebylo specifikováno, zda je kontrolování potkanů stabilní v čase, ani zda toto kontrolování souvisí s abnormální aktivitou stejných oblastí mozku, jako u pacientů s OCD.

V behaviorální části této práce jsme se zaměřili na replikaci předchozích výsledků popisujících lokomoční a behaviorální senzitivizaci při chronické administraci QNP a na charakteristiku temporální stability kontrolování u QNP senzitivizovaných potkanů. V histochemické části diplomové práce byla zmapována aktivita oblasti anteriorní cingulární kůry (ACC), mediální prefrontální kůry (MPC) a orbitofrontální kůry (OFC) při exploraci obohaceného otevřeného pole QNP senzitivizovanými potkany. Tyto oblasti jsou součástí frontostriatálních okruhů, přičemž dysfunkce fronto-striatálních okruhů byla implikována v patofyziologii OCD na základě klinicko-patologických a neurovizuálních studií. Pokud by byly symptomy kompulzivního kontrolování vykazované QNP senzitivizovanými potkany mediovány změnami aktivity stejných struktur, jako u pacientů s OCD, pozitivně by to přispělo ke konstrukční validitě tohoto modelu.

## 2 OBSEDANTNĚ-KOMPULZIVNÍ PORUCHA

### 2.1 Obecná charakteristika onemocnění

Obsedantně-kompulzivní porucha (OCD, synonymum obsedantně-nutková porucha) je celosvětově rozšířená neuropsychiatrická porucha charakterizovaná přítomností obsedantních symptomů a/nebo kompulzivního jednání. Obsedantní symptomy jsou definovány jako opakovaně se vracející a perzistující rušivé myšlenky, které u pacientů vyvolávají úzkost či tíseň. Pacient obsedantní symptomy ignoruje, suprimuje nebo je neutralizuje prováděním kompulzivního jednání. Kompulzivní jednání je definováno jako: (1) repetitivní činnosti či mentální pochody, které pacient vykonává na základě rigidních pravidel a/nebo obsesivních symptomů; (2) činnosti vykonávané pacientem v prevenci obávané události, které však nejsou realisticky s obávanou událostí asociovány nebo jsou vykonávány excesivně (DSM-V).

Dle epidemiologických dat je prevalence perzistující formy OCD přibližně 2 – 3 % (Ruscio et al., 2010; Subramaniam et al., 2012). K nástupu onemocnění dochází nejčastěji v dětství (přibližně 30 – 50 % případů (Zohar, 1999)) či v rané dospělosti. Průměrně dochází k nástupu onemocnění ve 21 letech (Subramaniam et al., 2012). OCD se častěji vyskytuje u žen než u mužů (2,1 : 1), stejně tak perzistující formy onemocnění jsou častější u žen (2,2 : 1) (Ruscio et al., 2010). OCD je spojena se zhoršenou kvalitou osobního života pacientů, kdy přibližně 70 % pacientů udává, že jim porucha způsobila obtíže v rodinných vztazích (Koran, 2000). OCD interferuje i s pracovním životem pacientů. Přibližně 38 % pacientů s OCD popisuje, že během svého pracovního života nebyli v důsledku symptomatických projevů OCD schopni po dobu delší než rok vykonávat své zaměstnání (Hollander et al., 1998). Více než 30 % pacientů udává, že během svého života přemýšleli o sebevraždě (Torres et al., 2011).

Prozatím nebyly popsány přímé příčiny vzniku OCD. Na rozvoji onemocnění se však nejspíše podílí množství genetických a environmentálních faktorů. Dědivost symptomů OCD se pohybuje v rozmezí 25 – 30 % (Arnold et al., 2018). Nejčastěji diskutovanými environmentálními faktory jsou zánětlivé procesy (Mell et al., 2005) a traumatické životní události (Cromer et al., 2007).

Terapie OCD je v praxi nejčastěji prováděna farmakologickými (klomipramin, selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu atd.) a nefarmakologickými (např. terapie expozicí a prevencí odpovědi, kognitivně-behaviorální terapie aj.) léčebnými

přístupy. Ke zlepšení projevů symptomů nastává průměrně ve 25 – 74 % případů v případě nefarmakologických a ve 20 – 30 % případů v případě farmakologických přístupů (Eddy et al., 2004). U 22 – 39 % pacientů absolvujících terapii dochází k remisi (Eddy et al., 2004; Eisen et al., 2013), avšak u cca 59 % těchto pacientů dochází po čase k relapsu nemoci (Eisen et al., 2013).

Diagnostika OCD v České republice je v současnosti prováděna dle Mezinárodní statistické klasifikace onemocnění a přidružených zdravotních problémů, 10. revize (MKN-10), která vychází z International Classification of Disorders, 10th revision (ICD-10). Převážně na Americkém kontinentu je diagnostika OCD prováděna pomocí Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth edition (DSM-V). Stupeň závažnosti symptomů OCD je hodnocen pomocí diagnostických škál, např. dle Yale-Brownovy obsedantně-kompulzivní škály (Y-BOCS) (Wayne K. Goodman et al., 1989) či její dětské verze (CY-BOCS) (Scahill et al., 1997). Diagnostická kritéria dle ICD-10 pro OCD jsou pro přehlednost shrnuta v Tabulce 1.

<b>DIAGNOSTICKÁ KRITÉRIA OCD (ICD-10)</b>
1. Přítomnost obsedantních symptomů a/nebo kompulzivního jednání po většinu dní minimálně dvou po sobě jdoucích týdnů.
2. Obsedantní symptomy musí mít následující společné rysy: <ul style="list-style-type: none"> <li>● Pacient rozpoznává obsedantní symptomy jako své vlastní myšlenky či vnitřní impulzy.</li> <li>● Prožívání obsedantních symptomů není pacientovi samo o sobě příjemné.</li> <li>● Pacient se snaží obsedantním myšlenkám bránit. Existuje alespoň jeden obsedantní symptom, kterému se pacient brání neúspěšně.</li> <li>● Myšlenky, představy či vnitřní impulzy se nepříjemně opakují.</li> </ul>
3. Obsedantní a/nebo kompulzivní symptomy vyvolávají nepříjemné pocity/tíseň a/nebo narušují sociální a pracovní život pacienta.
4. Obsedantní a/nebo kompulzivní symptomy nejsou důsledkem jiné duševní poruchy (F20 – F29), poruchy nálady (F30 – F39) ani užívání léků či omamných látek.

**Tabulka 1** - Diagnostická kritéria OCD. Převzato a upraveno dle World Health Organization (1993).

Diagnostiku OCD komplikuje výskyt řady přidružených onemocnění. Nejčastějšími komorbiditami OCD jsou generalizovaná úzkostná porucha (Ruscio et al., 2010;

Subramaniam et al., 2012), tiky (Bokor & Anderson, 2014; Pallanti et al., 2011), depresivní porucha (Pallanti et al., 2011; Subramaniam et al., 2012), Tourettův syndrom (Bokor & Anderson, 2014), bipolární porucha (Pallanti et al., 2011; Subramaniam et al., 2012) či schizofrenie (Pallanti et al., 2011). Symptomy OCD se objevují také u pacientů s lézemi inferiorní parietální kůry (Simpson & Baldwin, 1995), orbitofrontální kůry (Ogai et al., 2005), prefrontálního laloku (Berthier et al., 1996), bazálních ganglií (Carmin et al., 2002) či *nucleus caudatus* (Berthier et al., 1996).

Jelikož diagnostické manuály využívané k diagnostice OCD (DSM-V, ICD-10) pacienty dále nediverzifikují dle charakteru obsedantních symptomů či kompulzivního jednání, využívají se k popisu interindividuálních rozdílů mezi pacienty dimenze symptomů (SD) vycházející z multidimenzionálního modelu OCD (Mataix-Cols et al., 2005). Dle meta-analýz faktor-analytických studií jsou rozlišovány tři nejčastější SD: dimenze obsesí/kontrolování, dimenze symetrie/třídění a dimenze kontaminací/čištění (Bloch et al., 2008; Mataix-Cols et al., 2005). SD jsou v průběhu života pacientů relativně stabilní. Ke změnám symptomů dochází většinou v rámci jedné SD, přesmyky mezi SD jsou pouze vzácné (Rufer et al., 2005). SD jsou asociovány s predikcí odpovědi na farmakologickou i behaviorální léčbu (Mataix-Cols et al., 2002, 1999). Dimenze OCD a s nimi korelované symptomy OCD jsou pro přehled uvedeny v Tabulce 2.

<b>DIMENZE OCD</b>	<b>OBSESIVNÍ/KOMPULZIVNÍ SYMPTOMY</b>
Dimenze obsesí/kontrolování	obsese kontrolováním, obsese agresí, obsese náboženskou ideologií
Dimenze symetrie/třídění	obsese symetrií, provádění repetitivních rituálů, obsese počítáním, obsese tříděním a aranžováním
Dimenze kontaminace/čistoty	obsese kontaminacemi, kompulzivní čištění

**Tabulka 2** - Dimenze OCD a obsedantní symptomy/kompulzivní jednání korelující s příslušnou SD. Vytvořeno a upraveno na základě dat Mataix-Cols et al. (2005) a Van Den Heuvel et al. (2009).

## **2.2 Animální model kompulzivního kontrolování**

Animální modely jsou obecně definovány jako „výzkumné procedury provedené u jednoho živočišného druhu za účelem studia specifického fenoménu objevujícího se u jiného živočišného druhu“ (McKinney, 2012, str. 212). Nové terapeutické přístupy léčby neuropsychiatrických onemocnění se z velké části opírají právě o využití animálních modelů napodobujících behaviorální projevy těchto onemocnění (Albelda & Joel, 2012). Uvedené platí obzvláště pro OCD, jelikož neuropatologický základ tohoto onemocnění dosud nebyl uspokojivě objasněn a řada pacientů nereaguje na v současnosti dostupné možnosti terapie. Model quinpirolem indukovaného kompulzivního kontrolování je rozšířeným modelem OCD modelujícím jednu z dimenzí symptomů – kompulzivní kontrolování.

### **2.2.1 Charakteristika quinpirolem indukovaného kompulzivního kontrolování**

Model quinpirolem indukovaného kompulzivního kontrolování (MQIKK), zavedený výzkumným týmem prof. Szechtmana (1998), využívá k vyvolání kompulzivního jednání chronické subkutánní či intraperitoneální administrace D2/D3 agonisty quinpirolu (QNP, 0,5 mg/kg) laboratornímu potkanovi. QNP-senzitizovaní i QNP-nesenzitizovaní potkani jsou denně po dobu deseti až čtrnácti dnů vkládáni do otevřeného pole (Open field, OF), obohaceného o nejčastěji 4 objekty s fixní lokalizací. Do OF jsou potkani vkládáni nejčastěji 50-60 minut od podání QNP a jejich chování je po celou dobu experimentu monitorováno kamerou. Nejčastěji analyzovanými parametry chování potkanů jsou: (1) četnost návštěv jednotlivých objektů, (2) interval mezi dvěma po sobě jdoucími návštěvami stejného objektu, (3) průměrná doba kontrolování jednotlivých objektů, (4) průměrná lokomoce, (5) počet návštěv jiných objektů, které potkan navštíví mezi dvěma po sobě jdoucími návštěvami stejného objektu (Albelda & Joel, 2012). U QNP-senzitizovaných potkanů se vyvíjí motorické rituály zahrnující kaskádu čtyř behaviorálních procesů – zvýšenou lokomoční aktivitou, stereotypní trajektorií pohybu v OF, preferencí určitých objektů a vykonáváním specifického sledu pohybů při kontrole preferovaných objektů (Ben-Pazi et al., 2001).

Akutní aplikace QNP má bifázický účinek na lokomoční aktivitu potkanů (Eilam & Szechtman, 1989). V časně fázi dochází k útlumu lokomoce, v pozdější fázi (přibližně 60 minut od podání QNP) je lokomoce potkanů výrazně zvýšena (De Haas et al., 2011). Sensitizace QNP vyvolává postupné zkracování fáze lokomočního útlumu a prodlužování hyperlokomoční fáze (Szechtman et al., 1998). Lokomoce



QNP-senzitizovaných potkanů má postupně se zvyšující repetitivní charakter projevující se stereotypními trajektoriemi lokomoce mezi kontrolovanými objekty (Ben-Pazi et al., 2001).

Ve srovnání s QNP-nesenzitizovanými potkany kontrolují QNP-senzitizovaní potkani jednotlivé objekty OF v nenáhodné sekvenci (De Haas et al., 2011; Szechtman et al., 2001). QNP senzitivizovaní i QNP-nesenzitizovaní potkani si postupně vymezují jeden až dva objekty (tzv. home-base, HB), které preferují. V porovnání s QNP-nesenzitizovanými potkany navštěvují QNP-senzitizovaní potkani HB až 20 krát častěji (Servaes et al., 2016) a vykonávají při kontrole HB charakteristický sled pohybů, jenž má následující charakteristiku: (1) potkani preferují určitý směr příchodu k HB, (2) potkani provádí v prostředí HB menší množství laterálních a vertikálních pohybů, (3) průměrný čas strávený kontrolou HB je snížen, (4) potkani v prostředí HB neprovádí péči o srst (Ben-Pazi et al., 2001).

### **2.2.2 Validita modelu quinpirolem indukovaného kompulzivního kontrolování**

K posouzení platnosti modelu, tedy do jaké míry model skutečně odpovídá charakteristikám daného onemocnění, je hodnocena validita modelu. Posuzována je v této souvislosti především fenomenologická, prediktivní a konstrukční validita modelu.

Fenomenologická validita určuje míru fenomenologické shody modelu a modelovaného onemocnění (Geyer & Markou, 2000). Přímé srovnání kompulzivního jednání lidí a QNP senzitivizovaných potkanů však není možné, jelikož je dané jednání považováno za kompulzivní, pokud má jedinec nutkavou potřebu toto chování vykonávat (Szechtman et al., 1998). Z tohoto důvodu byla navržena formální etologická kritéria kompulzivního kontrolování u pacientů a laboratorních zvířat (viz Tab. 3). MQIKK vykazuje fenomenologickou validitu, jelikož splňuje etologická kritéria kompulzivního kontrolování.

Prediktivní validita modelu vyjadřuje, do jaké míry model onemocnění predikuje výsledky studií prováděných na pacientech (Geyer & Markou, 2000). MQIKK vykazuje prediktivní validitu. Chronická koadministrace klomipraminu, užívaného k terapii OCD, snižuje QNP indukovanou lokomoci a kompulzivní kontrolování potkanů (Szechtman et al., 1998). Podobně nikotin, agonista acetylcholinových receptorů nikotinového typu, snižuje kompulzivní jednání u pacientů s OCD i kompulzivní kontrolování QNP senzitivizovaných potkanů (Lundberg et al., 2004)

Etologická kritéria kompulzivního kontrolování objektů u potkanů a pacientů
1. Existuje jeden nebo více objektů, které subjekt kontroluje mnohem častěji než jiné objekty, vykazuje tedy ve vztahu k nim určitou preferenci.
2. Subjekt se vrací k preferovaným objektům po kratším časovém intervalu než k ostatním objektům.
3. V období mezi kontrolami preferovaných objektů subjekt navštěvuje pouze několik málo dalších objektů.
4. Subjekt vykazuje při kontrole preferovaného objektu charakteristické chování odlišné od chování vykazovaného v případě nepreferovaných objektů.
5. Dojde-li ke změnám environmentálních charakteristik objektů, chování subjektu je pozměněno.

**Tabulka 3** - Etologická kritéria kompulzivního kontrolování. Body č. 1.–3. hodnotí míru zaujatosti subjektu objektem a jeho neochotu objekt opustit. Tyto body vychází z diagnostické škály Y-BOCS pro pacienty s OCD. Bod č. 4 hodnotí, zda má chování ritualizovaný charakter. Bod č. 5 hodnotí interakci ritualizovaného chování s kontextem prostředí. Upraveno dle Szechtman et al. (1998).

Konstruktivní validita modelu vyjadřuje, do jaké míry jsou modelem modelovány patologické mechanicky stojící za vznikem a projevem onemocnění (Geyer & Markou, 2000). Jelikož fyziologické a/nebo psychologické příčiny OCD nejsou v současné době zcela objasněny, dle Albelda et al. (2012) může být konstrukční validita modelu odvozena od zapojení mozkových struktur a implikovaných neurotransmiterových systémů. Konstrukční validitu MQIKK v současnosti podporuje, že je založen na manipulaci s dopaminergním systémem. Abnormality v dopaminergním systému již byly dříve implikovány v patofyziologii OCD (Min-Seong et al., 2010). Také vysokofrekvenční hluboká mozková stimulace dřeně a pláště *nucleus accumbens* (NAc), účinná při léčbě terapie-rezistentní formy OCD, snižuje kontrolování i u QNP senzitivovaných potkanů (Mundt et al., 2009). Zapojení NAc podporuje, že neurotoxické léze NAc u QNP nesenzitivovaných potkanů vyvolávají kontrolování srovnatelné s QNP indukovaným kontrolováním (Dvorkin et al., 2010). Dočasná inaktivace subtalamických jader (STN) muscimolem snižuje kompulzivní kontrolování u QNP senzitivovaných potkanů (Winter et al., 2008) podobně jako léze bazálních ganglií snižují kompulzivní jednání u k terapii-rezistentních forem OCD (Lopes et al., 2004).

Měření aktivace vybraných struktur, u nichž byly popsány funkční abnormality (ACC, OFC, MPC, viz dále), budou součástí i této studie. Studované struktury jsou součástí bazálních ganglií, jež jsou regulované mezolimbickými dopaminovými drahami.

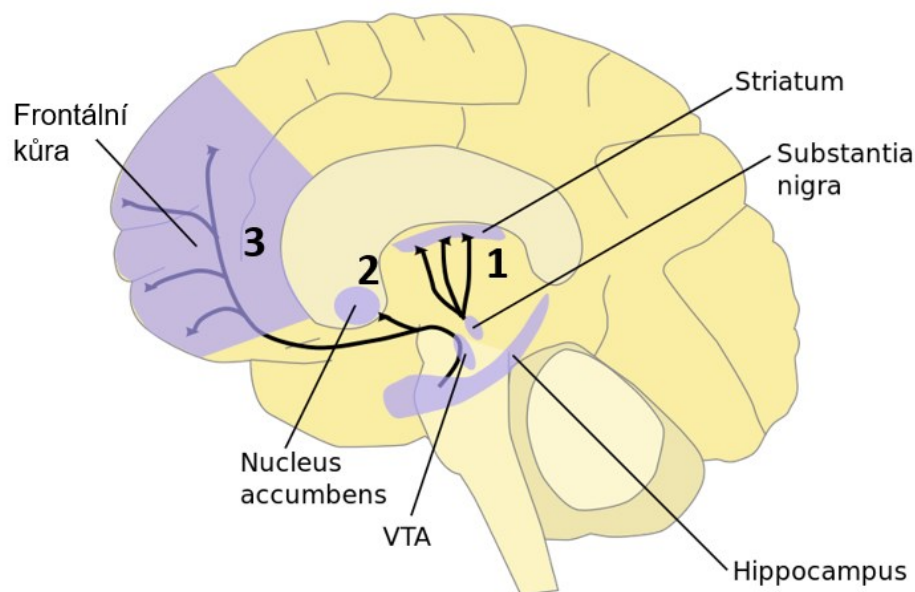
### 3 DOPAMIN

Dysfunkce v DA signalizaci je spojována s rozvojem mnohých psychiatrických a neurologických onemocnění, např. Parkinsonovy choroby, schizofrenie či deprese (Dailly et al., 2004; Howes et al., 2012) Hypotetickou úlohu má dysfunkce v DA transmisi také v patofyziologii OCD či Tourettova syndromu (Bilder et al., 2004; Denys et al., 2013). V první podkapitole této kapitoly bude obecně shrnuta role dopaminu a hlavních dopaminergních drah u savců. Ve druhé podkapitole bude pojednáno o typech dopaminových receptorů a jejich výskytu v mozcích savců. Ve třetí kapitole budou shrnuty v současnosti dostupné poznatky o zapojení dopaminergního systému v patofyziologii OCD.

#### 3.1 Dopamin a dopaminergní dráhy

Dopamin (DA) je katecholaminový neurotransmitter a neuromodulátor v mozku savců. Účastní se mimo jiné řízení lokomoční aktivity, kognice, příjmu potravy či endokrinní regulace (Missale et al., 1998). Významnou úlohu hraje DA také v motivaci a odměňování (Di Chiara & Bassareo, 2007). Na periférii účinkuje jako modulátor kardiovaskulárních funkcí, výlevu katecholaminů, sekrece hormonů či gastrointestinální motility (Missale et al., 1998).

DA vzniká procesem dekarboxylace z L-DOPA ve specifických neuronech či buňkách dřeně nadledvin. Těla dopaminergních neuronů jsou seskupena do skupin a uložena v několika oblastech mozku. Axony dopaminergních neuronů moduluji pomocí nigrostriatální, mezolimbické, mezokortikální a tuberoinfundibulární dráhy (viz Obr. 1) činnost řady cílových nervových struktur. Dopaminergní neurony *substantia nigra pars compacta* projikují nigrostriatální drahou do *nucleus caudatus* a *putamen* dorzálního striata. Nigrostriatální dráha má významnou úlohu v kontrole motorických funkcí. Zánik dopaminergních neuronů *substantia nigra* vyvolává parkinsonismus (Dauer & Przedborski, 2003). Mezulimbická dráha zahrnuje dopaminergní neurony ventrálního tegmenta projikující do *nucleus accumbens*, čichového tuberkulu a části limbického systému. Významnou úlohu hraje v systémech motivace a odměny (Di Chiara & Bassareo, 2007). Ve ventrálním tegmentu se taktéž nachází těla dopaminergních neuronů projikujících mezokortikální drahou do frontální kůry. Mezokortikální dráha se primárně účastní regulace kognitivních funkcí a emočních stavů (Casterano et al., 1976). Dopaminergní neurony *nucleus arcuatus* a *nucleus periventricularis* projikují tuberoinfundibulární drahou do předního laloku hypofýzy, kde moduluji produkci prolaktinu (Gudelsky, 1981).



**Obr. 1** - Schematické znázornění hlavních DA drah v mozku savců. (1) nigrostriatální dráha – těla DA neuronů substantia nigra projikující do nucleus caudatus a putamen (2) mezolimbická dráha – těla DA neuronů ventrálního tegmenta (VTA) projikující do NAc, čichového tuberkulu a struktur limbického systému (3) mezokortikální dráha – těla DA neuronů VTA projikující do frontální kůry. Tuberoinfundibulární dráha není znázorněna. Autorem schématu je National Institute of Drug Abuse, Bethesda, USA.

### 3.2 Dopaminové receptory

Dopamin uvolněný z presynaptických zakončení se váže na receptory lokalizované na membráně recipientních neuronů či na presynapticky umístěné autoreceptory. Dopaminové receptory (DR) jsou metabotropní receptory funkčně spřažené s G-proteiny. Doposud bylo popsáno a naklonováno pět subtypů dopaminových receptorů (DR1, DR2, DR3, DR4, DR5) lišících se strukturou, farmakologickou specifitou a efektorovou odpovědí (Neve, 2010). DR jsou sdruženy do dvou rodin na základě rozdílné interakce s enzymem adenylátcyklázou.

Rodina receptorů typu D1R, zahrnuje receptory DR1 a DR5. Receptory typu D1R se nachází převážně postsynapticky. DR1 je ze všech DR zastoupen nejhojněji. Rodinu receptorů typu D2R tvoří receptory D2R, D3R a D4R. Receptory typu D2R se vyskytují postsynapticky i presynapticky (autoreceptory) (Neve, 2010). Převažující lokalizace receptorů typu D1R a D2R je pro přehlednost shrnuta v Tabulce 4.

Rodina receptorů	Receptor	Převažující lokalizace	Reference
Receptory typu D1R	D1R	<ul style="list-style-type: none"> <li>• striatum</li> <li>• <i>nucleus accumbens</i></li> <li>• čichový tuberkulus</li> </ul>	(Deary et al., 1990) (Meador-Woodruff et al., 1991)
	D5R	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hipokampus</li> <li>• mamilární jádra hypothalamu</li> <li>• parafascikulární jádra thalamu</li> </ul>	(Meador-Woodruff et al., 1992)
Receptory typu D2R	D2R	<ul style="list-style-type: none"> <li>• striatum</li> <li>• čichový tuberkulus</li> <li>• <i>nucleus accumbens</i></li> <li>• <i>substantia nigra</i></li> <li>• ventrální tegmentum</li> </ul>	(Meador-Woodruff et al., 1989) (Landwehrmeyer et al., 1993)
	D3R	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>nucleus accumbens</i></li> <li>• čichový tuberkulus</li> <li>• ventrální striatum</li> </ul>	(Landwehrmeyer et al., 1993)
	D4R	<ul style="list-style-type: none"> <li>• frontální kůra</li> <li>• amygdala</li> <li>• hipokampus</li> <li>• hypothalamus</li> </ul>	(Primus et al., 1997)

**Tabulka 4** - Převažující lokalizace receptorů typu D1R a typu D2R v mozku savců.

Aktivace receptorů typu D1R a D2R vede k rozdílné postsynaptické odpovědi. Vazba ligandu na receptory typu D1R vede k aktivaci adenylátcyklázy a k nárůstu koncentrace cAMP (Kebabian & Greengard, 1971). Uvolněný cAMP disinhibuje cAMP dependentní protein kinázu A (PKA), která fosforyluje řadu buněčných substrátů downstream signálních drah, např. protein vázající element responzivní pro cAMP (CREB), dopaminem a cAMP-regulovaný fosfoprotein 32 (DARPP-32) či některé iontové kanály. Stimulace cAMP/PKA kaskády a asociovaných buněčných dějů pomocí receptorů typu D1R má mimo jiné roli ve specifických formách učení (Beninger & Miller, 1998). Aktivace receptorů typu D2R oproti tomu aktivitu adenylátcyklázy inhibuje a vede tak ke snížení produkce cAMP. Důsledkem toho je fosforylace výše zmíněných signálních molekul (CREB, DARPP-32, ...) a iontových kanálů snížena. Funkcí receptorů typu D2R autoreceptorů je kontrola syntézy a uvolňování dopaminu (De Mei et al., 2009). Postsynapticky uložené typu D2R se účastní mimo jiné regulace motoriky a lokomoce (Durieux et al., 2009). Látky specificky se vázající

na receptory typu D2R účinkují jako antipsychotika při léčbě schizofrenie (D2R antagonisté) či farmaka užívané k léčbě Parkinsonovy choroby (D2 a D3 agonisté) (Chen et al., 2012).

### **3.3 Zapojení dopaminergního systému u OCD**

I přes rozsáhlý výzkum OCD nebyl dosud patofyziologický průběh tohoto onemocnění uspokojivě objasněn. Mezi jinými však byly implikovány dysfunkce v dopaminergním systému (Klanker et al., 2013).

První dopaminová teorie byla formulována Goodmanem et al. jenž postulovali, že dříve popsané disturbance v serotoninergním systému nedokáží zcela vysvětlit patofyziologii OCD a některé typy OCD souvisí s narušením nejen serotoninergní, ale i dopaminergní signalizace (W K Goodman et al., 1990). Tento postulát byl odvozen od poznatků, že aktivita dopaminergního systému je modulována činností serotoninergního systému, a později byl podpořen závěry, že deficity v serotoninergním systému mohou vést ke zvýšené aktivitě dopaminergního systému a k downregulaci dopaminových receptorů, která byla u OCD popsána (W K Goodman et al., 1990; Perani et al., 2008).

Hypotézy týkající se zapojení dopaminergního systému v OCD se opírají především o následující poznatky: (1) Dopaminovým agonistou (např. amfetamin, bromokriptin, apomorfin) indukované zvýšení aktivity dopaminergního systému vyvolává u zvířat stereotypizované chování (Pitman, 1989) (Borcherding et al., 1990). (2) U pacientů nereagujících na léčbu SSRI dochází ke zlepšení symptomů OCD po podání antagonisty D2 receptorů klomipraminu (Cartwright & Hollander, 1998) či antipsychotik nové generace (Hollander et al., 2002). (3) U pacientů s OCD byla popsána snížená dostupnost striatálních D2/D3 receptorů (Denys et al., 2013, 2004) jenž implikuje zvýšenou hladinu dopaminu ve striatu pacientů s OCD (Perani et al., 2008) (4) Klinický profil pacientů s lézemi bazálních ganglií připomíná profil pacientů s OCD (Carmin et al., 2002) (5) Symptomy OCD jsou přítomné u pacientů s neurologickými onemocněními, jako je Tourettův syndrom, Sydenhamova chorea či Von Ecomova encefalitida, které jsou spojené s dysfunkcemi dopaminergního systému (Pauls et al., 1986) (6) Dopamin, prekurzory dopaminu a agonisté a antagonisté dopaminových receptorů modulují aktivitu fronto-striatálních okruhů, implikovaných v OCD (Robbins, 2000). Shrňeme-li výše popsané, o roli dopaminergního systému v OCD nepřímě svědčí množství preklinických i klinických studií.

## **4 NEUROANATOMICKÉ KORELÁTY OCD**

Přestože patofyziologický průběh OCD doposud nebyl uspokojivě objasněn, byly u pacientů s OCD především na základě zobrazovacích studií opakovaně popsány strukturní a funkční abnormality ve fronto-striálních (FS) okruzích (Burguière et al., 2013; Modell et al., 1989; Ting & Feng, 2011). V první podkapitole této kapitoly bude popsána obecná anatomie FS okruhů. Druhá podkapitola bude věnována neurochemii FS okruhů a interakci neurotransmiterových systémů. Ve třetí podkapitole budou shrnuty dosud popsané anatomické a morfologické patologie struktur FS okruhů u pacientů s OCD.

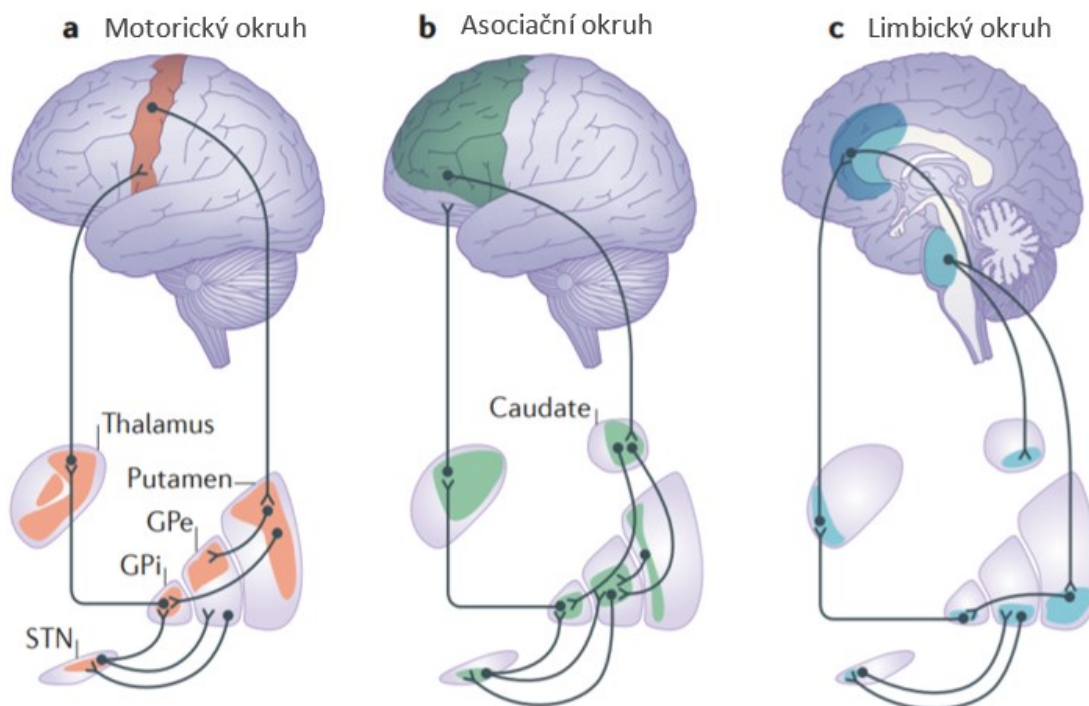
### **4.1 Fronto-striální okruhy**

#### **4.1.1 Anatomie fronto-striálních okruhů**

Fronto-striální okruhy (FS, taktéž kortiko-striato-talamo-kortikální okruhy) zahrnují sérii pěti paralelně probíhajících, částečně segregovaných okruhů propojujících frontální kůru s bazálními ganglii a talamem. FS okruhy zajišťují koordinovanou činnost funkčně spřažených oblastí mozku a vykonávají řadu funkcí spojených s reakcí jedince na okolní prostředí, adaptací a učením (Tekin & Cummings, 2002).

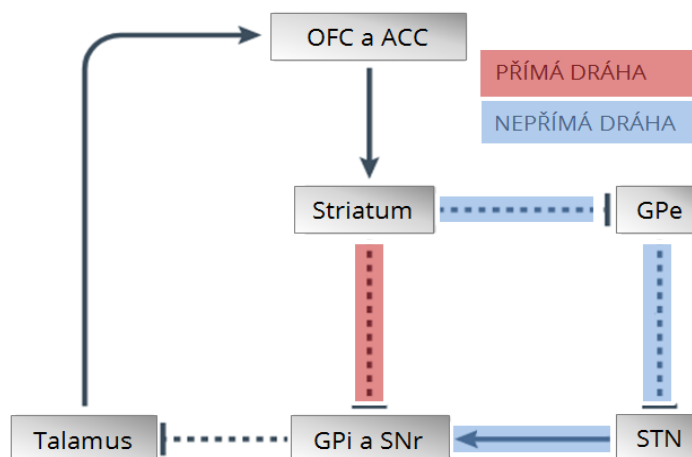
Počátky FS okruhů se nacházejí v doplňkových motorických oblastech kůry (motorický okruh), frontálním okohybném poli (okulomotorický okruh), dorsolaterální prefrontální kůře (dorzální prefrontální okruh), laterální orbitofrontální kůře (orbitofrontální okruh) a v anteriorní cingulární kůře (anteriorní cingulární okruh) (Tekin & Cummings, 2002). Dle funkčního a anatomického zařazení bývají tyto okruhy dále sdružovány do projekčních skupin. Rozlišovány jsou: (1) motorické projekce zahrnující okulomotorický a motorický okruh, (2) asociační projekce sestávající z dorzolaterálního prefrontálního a orbitofrontálního okruhu a (3) limbické projekce zahrnující anteriorní cingulární okruh (Morris et al., 2015)(Tekin & Cummings, 2002). Zjednodušená anatomická schémata motorických, asociačních a limbických projekcí jsou znázorněna na Obr 2.





**Obr. 2** - Schematické znázornění hlavních funkčních podjednotek FS motorických (a), asociačních (b) a limbických (c) projekcí. *Globus pallidus pars externa* (GPe) a subtalamičká jádra (STN) jsou vstupní drahou bazálních ganglií a získávají projekce z řady korových a podkorových struktur. *Globus pallidus pars interna* (GPi) a *substantia nigra pars reticulata* (SNr, není zobrazena) zajišťují hlavní výstupní projekce bazálních ganglií. Převzato a upraveno dle (Jahanshahi et al., 2015).

Vzájemné propojení struktur FS okruhů má charakter uzavřené smyčky. Neurony frontální kůry excitují středně velké trnité projekční neurony (MSN) striata, které prostřednictvím přímé a nepřímé dráhy moduluji výslednou aktivitu FS okruhu. Přímá dráha propojuje MSN striata a neurony komplexu *globus pallidus pars interna* (Gpi)/*substantia nigra pars reticulata* (SNr). Aktivace přímé dráhy vede prostřednictvím disinhibice thalamičských neuronů ke zvýšení excitační transmise zpět do frontální kůry. Nepřímá dráha taktéž vychází z MSN striata a zahrnuje *globus pallidus pars externa* (Gpe), STN a komplex Gpi/SNr. Skrze nepřímou dráhu dochází k omezení aktivity talamu a snížení excitační transmise talamu do frontální kůry (Tekin & Cummings, 2002). Obecné schéma přímé a nepřímé dráhy FS okruhů je znázorněno na Obr. 3.



**Obr. 3** - Obecné znázornění přímé a nepřímé dráhy FS okruhů. Přímá dráha (červeně) zahrnuje inhibiční projekce ze striata do komplexu GPi/SNr. Činnost přímé dráhy je asociována se zvýšením aktivity talamu. Součástí nepřímé dráhy (modře) jsou inhibiční projekce ze striata do GPe, inhibiční projekce z GPe do STN a excitační projekce z STN do GPi/SNr. Prostřednictvím nepřímé dráhy dochází ke snížení aktivity talamických neuronů. Převzato a upraveno dle (Pauls et al., 2014).

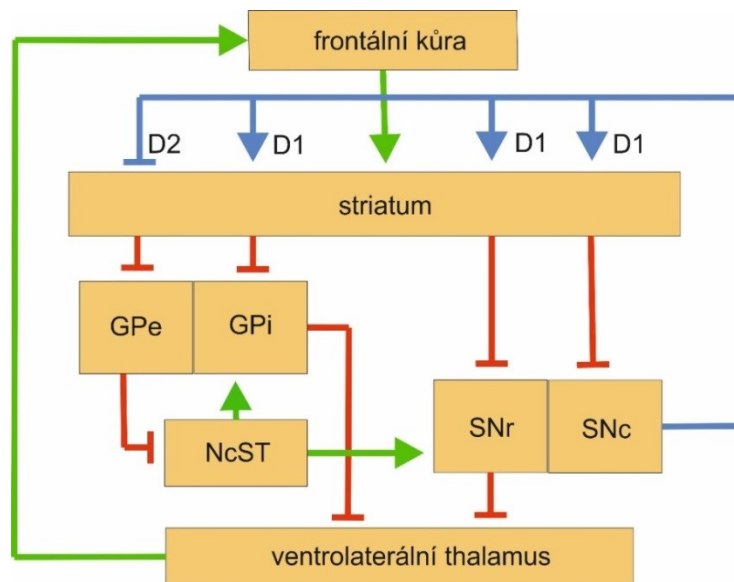
Struktury FS okruhu mají taktéž otevřená propojení s dalšími oblastmi mozku, které primárně nejsou součástí FS okruhu. Tyto eferentní a aferentní projekce zajišťují integraci informací z anatomicky oddělených, ale funkčně spřažených struktur (Bonelli & Cummings, 2007). Hlavní otevřená eferentní a aferentní propojení orbitofrontálního, dorsolaterálního prefrontálního a anteriorního cingulárního okruhu jsou pro přehlednost uvedena v Tab. 5.

Okruh	Hlavní aferentní projekce	Hlavní eferentní projekce
<b>Dorsolaterální prefrontální</b> (asociativní)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Broadmanova oblast 46</li> <li>parietální oblast 7a</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Broadmanova oblast 46</li> <li>Broadmanova oblast 8</li> </ul>
<b>Orbitofrontální</b> (asociativní)	<ul style="list-style-type: none"> <li>temporální kůra</li> <li>dorzální raphe nucleí</li> <li>tegmentum</li> <li>insula</li> <li>amygdala</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>entorhinální kůra</li> <li>septum</li> <li>laterální hypothalamus</li> </ul>
<b>Anteriorní cingulární</b> (limbický)	<ul style="list-style-type: none"> <li>hipokampus</li> <li>perirhinální oblast</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>subtalamičká jádra</li> <li>laterální hypothalamus</li> </ul>

**Tab. 5** - Aferentní a eferentní projekce vybraných frontostriálních okruhů. Převzato a upraveno dle Tekin & Cummings (2002).

#### 4.1.2 Neurochemie fronto-striálního okruhu

Všechny FS okruhy sdílí základní neurochemickou organizaci (viz Obr. 4). Glutamatergní vlákna neuronů frontální kůry zprostředkovávají excitaci striatálních MSN. Tyto striatální neurony projikují inhibiční vlákna uvolňující kyselinu  $\gamma$ -amino-máselnou (GABA) na synapsích s neurony komplexu GPi/SNr (přímá dráha) a GPe (nepřímá dráha). Prostřednictvím nepřímé dráhy projikuje GPe inhibiční GABAergní vlákna do STN, která jsou propojena s GPi/SNr souborem excitačních glutamatergních vláken. GPi/SNr komplex projikuje inhibiční GABAergní vlákna do talamu, který je zpětně propojen s frontální kůrou excitačními glutamatergními vlákny (Tekin & Cummings, 2002).



**Obr. 4** - Schematické znázornění neurotransmiterových systémů FS okruhu a modulačního účinku dopaminergního systému na striatální transmissi. Glutamatergní transmise (zeleně) z frontální kůry, talamu a subthalamických jader (NcST) mají excitační charakter. GABA (červeně) mediuje inhibiční působení striatálních neuronů, GPi, GPe a SNr na další struktury. Dopamin (modře) moduluje aktivitu striata prostřednictvím D1 (excitace) a D2 (inhibice) receptorů.

Komunikace mezi striatem a thalamem je modulována vstupy z dopaminergních, cholinergních, serotoninergních a noradrenergických buněk (Robbins, 2000). Dopaminergní neurony SNc projikují z retrorubrální oblasti a z ventrální tegmentální oblasti do celého striata. Aktivita je modulována zejména ve striatu, kde MSN přímé a nepřímé dráhy exprimují odlišné typy dopaminových receptorů. MSNs přímé dráhy exprimují výhradně D1R, zatímco MSNs nepřímé dráhy selektivně exprimují D2R (Wall et al., 2013). Zvýšení hladiny dopaminu potencuje aktivitu přímé dráhy (vazbou DA na D1R exprimující MSN)

a inhibuje aktivitu nepřímé dráhy (vazbou DA na D2R exprimující MSN). Jelikož je aktivita SNc ovlivněna vstupy z limbického systému a prefrontální kůry, představuje dopaminergní transmise důležitý krok v integraci emočních inputů do motorické aktivity a kognice (Bonelli & Cummings, 2007). Aktivitu FS okruhů ovlivňuje taktéž cholinergní transmise neuronů pedunculopontine a laterálního tegmenta, jež mimo jiné moduluje talamem zprostředkovanou excitaci frontální kůry (Parent et al., 1988).

Neurotransmitterové systémy zastoupené v FS drahách spolu do velké míry interagují a vzájemně se ovlivňují. Například dopamin prostřednictvím dopaminových receptorů inhibuje (D2R) či umocňuje (D1R) výlev acetylcholinu z cholinergních interneuronů (De Boer & Abercrombie, 1996). Acetylcholin umocňuje uvolnění dopaminu ze striata prostřednictvím muskarinových acetylcholinových receptorů lokalizovaných na presynaptických dopaminerních terminálách (Zhang et al., 2002). Serotoninové receptory typu 5-HT3 uložené ve ventrálním striatu, hipokampu a amygdale se účastní modulace aktivity mezokortikální a mezolimbické dopaminergní dráhy (Hagan et al., 1993) a v neposlední řadě glutamát stimuluje prostřednictvím NMDA receptorů uvolnění dopaminu a acetylcholinu z presynaptických zakončení (Tekin & Cummings, 2002)(Graybiel, 1990).

## **4.2 Neurobiologické teorie OCD**

Neurobiologické teorie OCD jsou z velké části založeny na výsledcích neurovizuálních studií pacientů s OCD. Funkční zobrazovací studie (např. pozitronová emisní tomografie, funkční magnetická rezonance, jednofotonová výpočetní tomografie) zobrazují aktivaci a rozdíly v aktivaci daných oblastí mozku v reakci na specifické podněty. Strukturální zobrazovací studie (mj. strukturální magnetická rezonance, na voxelech založená morfometrie) se zaměřují na rozdíly ve anatomii mozkových struktur, jako jsou hustota tkáně či objemy šedé a bílé hmoty. Doposud bylo popsáno množství strukturních a funkčních abnormalit mozkových struktur u pacientů s OCD. Výsledky studií jsou však v některých případech nekonzistentní. Pro základní přehled popsaných abnormalit včetně referencí viz Tab 6. Nejednoznačnost výsledků může být mj. důsledkem rozdílů mezi metodikami jednotlivých studií (měření v klidovém stavu/měření při vyvolání symptomů OCD), měřením rozsáhlejší struktury a následným zprůměrováním výsledků vedoucím k zániku sledovatelného efektu (Whiteside et al., 2004) či zahrnutím pacientů s medikací a s komorbiditami. Presentovaná data naznačují, že neexistuje pouze jeden patofyziologický

mechanismus, který by byl základem celého spektra klinických projevů OCD, ale spíše, že jsou různé profily symptomů OCD zprostředkované specifickými neurobiologickými mechanismy (Szechtman et al., 2017).

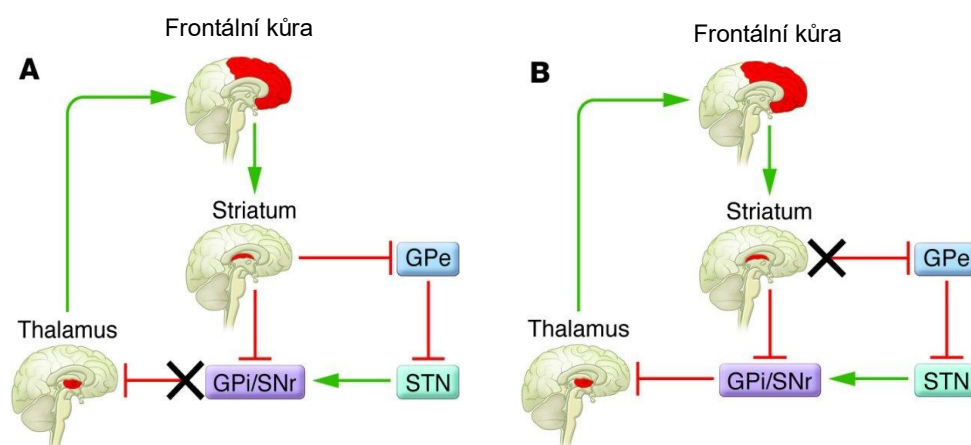
Mozková struktura	Popsané odchylky ve struktuře a funkci			
	Snížená aktivita	Zvýšená aktivita	Menší objem šedé hmoty	Vyšší objem šedé hmoty
ACC	↓ <sup>1</sup>	↑ <sup>7,9</sup>	↓ <sup>1</sup>	↑ <sup>4</sup>
MPC	↓ <sup>1</sup>		↓ <sup>1</sup>	
caudate nucleus	↓ <sup>1</sup>	↑ <sup>9, 10</sup>		
Amygdala	↓ <sup>1, 2</sup>			↑ <sup>1</sup>
Insula		↑ <sup>1</sup>		↑ <sup>1</sup>
PFC		↑ <sup>1, 7</sup>	↓ <sup>1</sup>	
Putamen		↑ <sup>1,9</sup>		↑ <sup>1</sup>
OFC	↓ <sup>6</sup>	↑ <sup>7, 10</sup>	↓ <sup>1, 3, 8</sup>	
hipokampus		↑ <sup>9</sup>	↓ <sup>1,8</sup>	
NAc		↑ <sup>9</sup>		

Tab. 6 - Strukturální a funkční abnormality vybraných struktur implikovaných v OCD.

Doposud bylo popsáno několik neurobiologických teorií OCD. Modell et al. postulovali, že primárním patogenním mechanismem rozvoje OCD je dysregulace bazálních ganglií/limbického okruhu vedoucí k talamem mediované hyperaktivaci frontální kůry (viz Obr. 5) (Modell et al., 1989). Později Saxena et al. (2001) uveřejnili domněnky, o klíčové roli laterálního OFC. Hyperaktivaci OFC považují za důsledek dysbalance aktivity striatopalidárních drah vycházející z MSN striata (Obr. X B) (Saxena et al., 2001). Milad et al. (2012) rozšířili okruh neuroanatomických korelátů OCD o mediální OFC a dorzální ACC. Postulovali možné role mediálního OFC ve zpracování odměny (reward processing) a regulaci afektu a dorzálního ACC ve zpracování chyby (error processing) (Milad et al., 2012). Milad et al. dále poukázali na deficity ve vymizení strachu (fear extinction) u OCD (Milad et al., 2013). Vymizení strachu zahrnuje interakce mezi ventromediálním PFC/mediálním OFC, dorzálním ACC a amygdalou, struktur, u nichž byly popsány

<sup>1</sup> (Norman et al., 2016) <sup>2</sup> (Thorsen et al., 2018) <sup>3</sup> (Menzies et al., 2010) <sup>4</sup> (Szeszko et al., 2004) <sup>5</sup> (Kim et al., 2001) <sup>6</sup> (Chamberlain et al., 2008) <sup>7</sup> (Rotge et al., 2008) <sup>8</sup> (Atmaca et al., 2009) <sup>9</sup> (McGuire et al., 1994) <sup>10</sup> (Whiteside et al., 2004)

abnormality ve struktuře či funkci u OCD (Milad et al., 2012). Mataix-cols et al. ve svém multidimensionálním modelu OCD zdůvodňují nekonzistentnost výsledků zobrazovacích studií tím, že různé dimenze symptomů OCD mohou být asociovány s rozdílnými mozgovými strukturami nebo s jejich odlišnou aktivací (Mataix-Cols et al., 2004). Odkazují v této souvislosti zobrazovací studie segregující pacienty dle dimenzí symptomů popisující mj. hyperaktivace striatu a snížený objem šedé a bílé hmoty mediálního spánkového laloku u dimenzí obsesí/kontrolování, zvýšené aktivace PFC a OFC u dimenze kontaminací/čistoty a snížení objemu šedé hmoty PC a hypoaktivaci levé insulární kůry u dimenze symetrie/třídění (Mataix-Cols et al., 2004; Rauch et al., 1998; Van Den Heuvel et al., 2009). V neposlední řadě Moreira et al. rozšiřují neurobiologický model OCD o data ze studií funkční konektivity u OCD. Postulují dvě hypotézy: (1) Volumetrické abnormality implikovaných struktur přímo či nepřímo přispívají ke snížené konektivě mezi STS a OFC a mezi OFC a posteriorními oblastmi mozku a vedou tak k narušení behaviorální a emoční regulace chování (2) Volumetrické abnormality implikovaných struktur jsou důsledkem, nikoliv příčinou aberantní konektivity talamo-kortikálních projekcí (Moreira et al., 2017). Obě tyto hypotézy však dosud nebyly uspokojivě testovány.



**Obr. 5** - Schematická znázornění dvou hypotéz aberantního fungování FS drah u OCD. (A) Zvýšená glutamatergní signalizace z frontálního kůry vede ke zvýšené excitaci striatálních neuronů. Zvýšení GABAergní signalizace ze striata vede ke snížení inhibiční aktivity GPi/SNr vůči talamu. Talamus prostřednictvím glutamatergní signalizace overexcituje neurony frontální kůry. (B) Hypofunkce inhibiční dráhy mezi striatem a GPe vede ke zvýšené inhibici STN. Excitační aktivita STN vůči GPi/SNr je snížena a dochází tak ke snížení inhibiční odpovědi GPi/Snr vůči talamu. Důsledkem toho je opět zvýšená excitační signalizace z talamu a neurony frontální kůry jsou hyperexcitovány. Převzato a upraveno dle Kalra et al. (2009).

## 5 MAPOVÁNÍ NEURONÁLNÍ AKTIVITY V MOZKU

Pro mapování neuronální aktivity je třeba metod, které umožňují zachytit a vizualizovat velké množství buněk aktivních v daném okamžiku. Metody, které umožňují vizualizovat časově závislé změny koncentrací mRNA a proteinových produktů genů okamžité exprese (IEG) splňují tyto podmínky a jsou proto užitečnými markery pro sledování neuronální aktivity v behaviorálních studiích. Tyto studie jsou do jisté míry paralelou funkční magnetické rezonance, široce využívané zejména u lidí. V porovnání s funkční magnetickou rezonancí však vizualizace exprese IEG umožňuje simultánní mapování aktivity mnoha oblastí mozku na buněčné úrovni bez nutnosti anestezizace zvířete a konstantního monitoringu a kontroly jeho fyziologických parametrů (tělesná teplota, parciální tlak CO<sub>2</sub>, ...) (Jonckers et al., 2015; Kubik et al., 2007)

### 5.1 Geny okamžité exprese

IEG je skupina genů rapidně a tranzientně exprimovaných na základě specifických stimulů. K expresi IEG dochází při vysokofrekvenční synaptické stimulaci vyvolávající dlouhodobou synaptickou potenciaci (LTP) (Cole et al., 1989), při dlouhodobé synaptické depresi (LTD) (Yilmaz-Rastoder et al., 2011), v přítomnosti růstového faktoru/mitogenu (Loebrich & Nedivi, 2009) či při behaviorálním zážitku (Guzowski et al., 1999; Montag-sallaz & Montag, 2003). Exprese IEG je za bazálních podmínek prakticky nedetekovatelná. K rapidnímu a tranzientnímu nárůstu exprese IEG v jádře buňky dochází již několik minut po extracelulární stimulaci a není vyžadována proteosyntéza *de novo* (Guzowski et al., 2005). IEG je možno dle funkce jejich genových produktů dělit do dvou skupin: (1) IEG kódující transkripční faktory (*zif268*, *c-jun* a *c-fos*) regulující transkripci dalších genů a (2) efektorové IEG (*Arc* a *Homer1a*) přímo ovlivňující různé buněčné funkce.

#### 5.1.1 Aktivitou regulovaný s cytoskeletem asociovaný protein

Gen pro aktivitou regulovaný s cytoskeletem asociovaný protein (*Arc*, synonymně označován jako *Arg 3.1*) je řazen mezi efektorové geny a přímo ovlivňuje specifické buněčné funkce. Významnou roli hraje ve formování dlouhodobé paměti (Kubik et al., 2007) a je klíčový pro stabilizaci aktivitou řízené synaptické plasticity (Link et al., 1995).

Bazální exprese *Arc* mRNA je velmi nízká a může být dále snížena aktivací receptorů  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové kyseliny (AMPA) (Rao et al., 2006). K transkripci *Arc* dochází při neuronální aktivitě provádějící učení

(Montag-sallaz & Montag, 2003; Ramirez-Amaya, 2005), při expozici mozkovému neurotrofickému faktoru (BDNF) (Ying et al., 2002), LTP a LTD (Yilmaz-Rastoder et al., 2011). Životnost *Arc* mRNA je velmi krátká, pouhých 47 minut (Rao et al., 2006). Zvýšení koncentrace *Arc* mRNA v jádře buňky je detekovatelné již cca 5 minut po expozici stimulu (Vazdarjanova et al., 2002). Přibližně 30 minut po expozici stimulu je *Arc* mRNA exportována do cytoplazmy a po cca 60 minutách dosahuje stimulovaných dendritických trnů, kde je translatována (Rao et al., 2006). Výsledné lokalizace *Arc* mRNA i *Arc* proteinu jsou striktně regulovány a vyžadují aktivaci receptorů N-methyl-D-asparagové kyseliny (NMDAR) (Steward et al., 1998; Steward & Worley, 2001).

Stejně jako lokalizace *Arc* produktů, i proces translace *Arc* mRNA je přísně kontrolován. Translace *Arc* mRNA je regulována konvergentními NMDAR a s G-proteiny asociovanými receptory zprostředkovanými signálními kaskádami (Bloomer et al., 2008). *Arc* protein hraje důležitou roli v procesu konsolidace paměťových stop (Plath et al., 2006) a v LTD a LTP, tedy formách Hebbovské synaptické plasticity. Úloha *Arc* v LTP a LTD může souviset s : (1) regulační úlohou *Arc* ve vztahu k dynamice aktinového cytoskeletu a morfologii dendritických trnů (Dillon & Goda, 2005) (2) interakcí *Arc* se specifickými izoformami endofilinů a dynaminů na povrchu buněk, čímž prostřednictvím receptorové endocytózy reguluje množství buněčných AMPAR (Chowdhury et al., 2006).

K výraznému nárůstu exprese *Arc* mRNA dochází při exploraci nového prostředí (Guzowski et al., 1999), při úlohách testujících prostorovou paměť (Guzowski & Worley, 2001), čichovou paměť (Desgranges et al., 2010) či při strachovém podmiňování (Barot et al., 2009). Úzké spojení synaptické aktivity a exprese *Arc* vedlo k jeho rozšířenému využití jako markeru neuronální aktivity provázející učení při různých behaviorálních úlohách. Pomocí *in situ* hybridizace (ISH) *Arc* a determinace buněčné lokalizace jeho produktů je možno vizualizovat jednotlivé buňky i klastry buněk aktivních ve vymezeném časovém okamžiku.



## 6 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

1. Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda jsou u modelu quinpirolem indukovaného kompulzivního kontrolování pozorovatelné stejné alterace aktivit vybraných korových struktur jako u pacientů s OCD, tj. zvýšení aktivace ACC, OFC a nezměněná aktivace MPC.
  
2. Dalšími cíli této práce bylo:
  - a. Ověřit, zda je frekvence návštěv objektů a lokomoce potkanů signifikantně vyšší u QNP senzitivovaných než u kontrolních zvířat.
  
  - b. Zjistit, zda je vzorec kontrolování objektů QNP senzitivovaných potkanů stabilní v čase.

## **7 MATERIÁL A METODY**

### **7.1 Pokusná zvířata**

K experimentům byli použiti dospělí samci ( $n = 24$ ) laboratorních potkanů kmene Long-Evans (stáří 12–15 týdnů, váha 300–400 g). Pokusná zvířata pocházela z chovu Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky. Potkani byli chováni ve standardních laboratorních polyethylenových boxech o rozměrech 50 x 25 x 25 cm. Boxy se zvířaty byly umístěny ve zvěřinci, kde byla udržována stabilní teplota 22 °C a vlhkost 50 %. Zvířatům byl umožněn volný přístup k vodě a ke standardnímu laboratornímu krmení pro hlodavce. Pokusná zvířata byla chována na 12hodinovém světelném cyklu (zapnutí světel v 6:00 ráno). Po dobu tří dnů před začátkem experimentu byla zvířata denně 2 minuty handlována.

Veškeré experimenty probíhaly ve světelné části dne a byly prováděny v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání a s vyhláškou č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

### **7.2 Použité chemické látky**

#### **7.2.1 Sensitizace quinpirolem**

Byl připraven fyziologický roztok (0,9 % NaCl, SAL) a roztok hydrochloridu quinpirolu (Sigma-Aldrich) ve fyziologickém roztoku (0,5 mg/ml, QNP). Objemy roztoků QNP a SAL podávaných potkanům byly přepočítány na váhu zvířete. Potkanům byl vždy aplikován 1 ml roztoku QNP/SAL na 1 kg tělesné hmotnosti. Roztoky byly zvířatům aplikovány 50 minut před začátkem experimentu subkutánní injekcí mezi lopatkové kosti. Tento přístup byl zvolen na základě bifázického působení quinpirolu. Quinpirol u potkanů nejprve působí sedačně, přibližně 45 minut od aplikace naopak indukuje hyperlokomoci (Horvitz, Williams, & Joy, 2001).

#### **7.2.2 Perfuze**

Pokusná zvířata byla ihned po ukončení experimentu dekapitována gilotinou. Mozky byly následně hluboce zmrazené v izopentanu vymraženém na -80 °C v lázni suchého ledu a denaturovaného 70% lihu.

### 7.2.3 *In situ* hybridizace

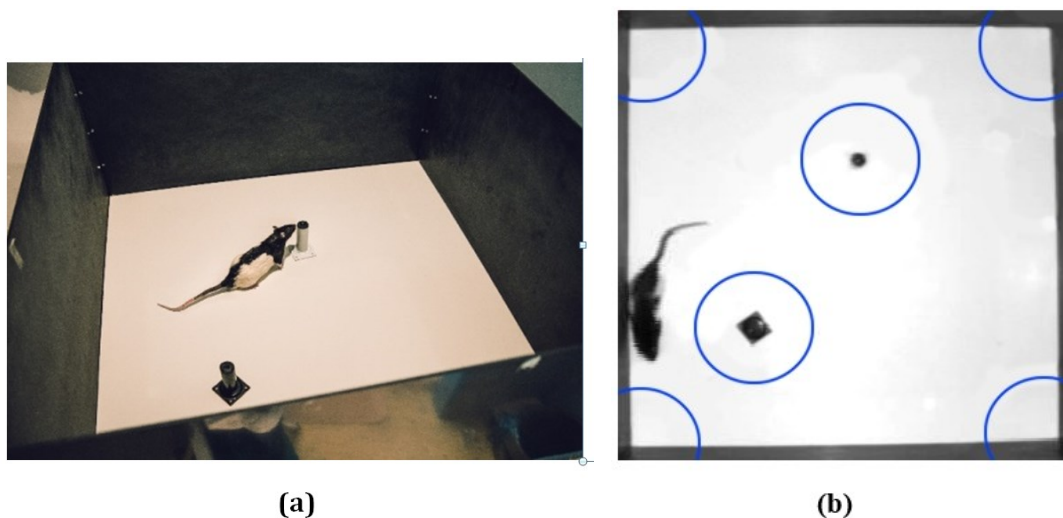
Pro fluorescenční *in situ* hybridizaci *Arc* mRNA byly připraveny a použity následující látky:

- **paraformaldehyd** (4 %)
- **SSC pufr** (175 g NaCl, 88 g dihydrátu citronanu sodného, 980 ml RNáz prosté voda)
- **roztok acetanhydridu** (250 ml RNáz prosté vody, 2,3 g chloridu sodného, 3,7 ml triethanolaminu, 1,25 ml acetanhydridu)
- **prehybridizační pufr** (formamid (50 %), SSC pufr, RNáz prostá voda, dextran sulfát (0,05 g/ml), Denhardtův roztok (0,02 %), RNA kvasinek (250 µl/ml) a sonikovaná DNA spermií lososa (500 µl/ml))
- **hybridizační pufr** (formamid (50 %), SSC pufr, RNáz prostá voda, dextran sulfát (0,05 g/ml), Denhardtův roztok (0,02 %), RNA kvasinek (250 µl/ml) a sonikovaná DNA spermií lososa (500 µl/ml), denaturované digoxigeninem značené *Arc* RNA sondy)
- **TBS pufr** (Tris pufrovaný chloridem sodným)
- **TBS-T pufr** (TBS s přísadkou Tween 20, TBS, 0,1 % Tween 20, destilovaná voda)
- **roztok RNázy 1** (25 µl zásobního roztoku (100µl/ml) ve 250µl SSC pufru)
- **roztok blokovacího pufru** (0,1 g blokovacího pufru (kat. č. FP1012, Perkin Elmer) v 250 ml TBS pufru)
- **roztok peroxidu vodíku** (3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v XX% SSC)
- **protilátka** (anti-digoxigenin konjugovaný s křenovou peroxidázou (Jackson labs), ředěno v poměru 1:300 v blokovacím pufru)
- **roztok tyramidu-CY3** (TSA Plus Cyanine 3 Kit, Perkin Elmer)
- **roztok 4',6'-diamidin-2-fenylindolu** (DAPI; Vector Laboratories) (ředění 1:10000 v TBS pufru)

### 7.3 Behaviorální aparatura

Pokusná zvířata podstoupila behaviorální senzitivizaci v otevřeném poli (open field, OF). Prostředí OF představovala aréna čtvercového půdorysu (95 x 95 cm), vyvýšená do výšky 1 m nad zemí, obklopená neprůhlednými černými stěnami o výšce 50 cm. K podlaze arény byly pevně připevněny dvě kovové tyče kruhového průřezu. Aréna se nacházela v malé samostatné místnosti a byla stejnoměrně osvětlena 40W žárovkou umístěnou nad arénou. Nad arénou byla umístěna kamera zaznamenávající chování potkana v průběhu experimentu, jenž byla kabelově propojena s počítačem umístěným ve vedlejší

místnosti. Fotografie arény s odstraněnou přední stěnou (a) a její schematické znázornění (b) jsou zobrazeny na Obr. 6.



**Obr. 6** - Open field aréna využitá k behaviorální části experimentů 1 a 2 (a) Fotografie zachycující potkana kontrolujícího objekt umístěný v OF aréně. (b) Snímek pořízený softwarem Viewer2 (Biobserve BmbH) znázorňující lokality zájmu (modře) při analýze chování potkana. Fotografii arény (a) laskavě poskytla Kristýna Malenínská (FGU AVČR).

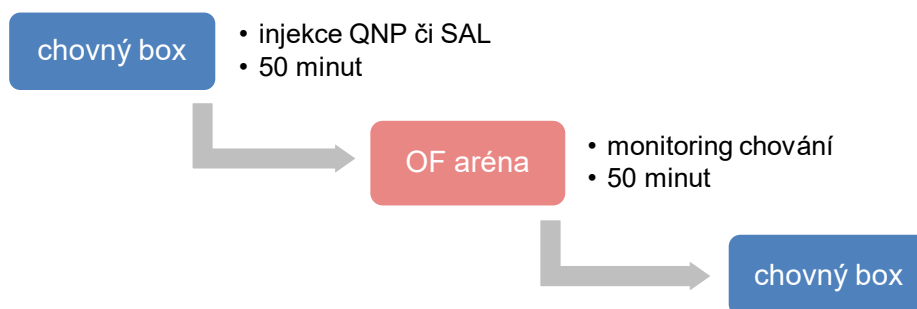
## 7.4 Metodické postupy

### 7.4.1 Behaviorální část experimentu

Pokusná zvířata ( $n = 24$ ) byla z důvodu časové náročnosti experimentu rozdělena do tří běhů (každý běh  $n = 8$ ). Na počátku experimentu byli potkani běhu náhodně rozděleni do dvou skupin. Potkanům první skupiny (v každém běhu  $n = 4$ ) byl po dobu experimentu podáván roztok quinpirolu (QNP skupina). Druhé skupině potkanů (kontrolní, v každém běhu  $n = 4$ ) byl injekčně podáván fyziologický roztok (SAL skupina).

#### 7.4.1.1 Senzitizace

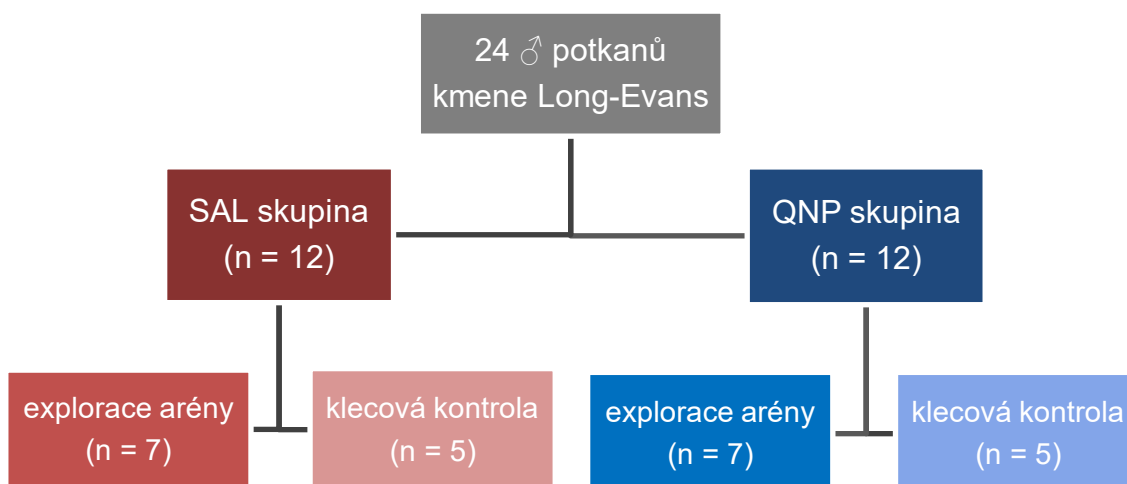
Potkanům byl denně po dobu deseti experimentálních dní podáván roztok QNP nebo SAL a potkani byli 50 minut po injekci jednotlivě vkládáni do otevřeného pole obohaceného o dva kovové objekty. Zvířata byla vkládána do arény vždy na stejné místo (přibližně 30 cm od pravého okraje arény), s hlavou otočenou ke stěně arény nejbližší vchodu do místnosti. Po dobu explorační arény bylo chování potkanů monitorováno kamerou. Schéma experimentu je znázorněno na Obr. 7.



**Obr. 7** - Schéma senzitivizačních sezení v OF prostředí. Po subkutánní injekci fyziologického roztoku (SAL skupina) nebo roztoku quinpirolu (QNP skupina) bylo zvíře vráceno zpět do boxu. Po 50 minutách bylo zvíře umístěno na 50 minut do arény a soustavně monitorováno kamerou.

#### 7.4.1.2 Expozice prostředí pro vyvolání exprese IEG

V jedenáctý experimentální den byla část potkanů běhu QNP skupiny ( $n = 5$ ) i SAL skupiny ( $n = 5$ ) ponechána jako klecová kontrola sloužící k vizualizaci bazální exprese *Arc* mRNA v nestimulovaných podmínkách. Zbýlá část QNP ( $n = 7$ ) a SAL skupiny ( $n = 7$ ) byla na 5 minut vložena do obohaceného OF za účelem indukce exprese *Arc* mRNA (rozdělení experimentálních zvířat schematicky znázorněno na Obr. 8). Ihned po sezení v aréně byli potkani uspáni anestetikem a dekapitováni. Klecové kontroly byly uspány a dekapitovány 55 minut od aplikace QNP či SAL. Extrahované mozky byly kryoprezervovány rychlým zmražením v izopentanu vymraženém na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v lázni suchého ledu a denaturovaného 70% lihu.



**Obr. 8** - Schéma rozdělení experimentálních zvířat před přípravou na imunohistochemickou část experimentu. K experimentu bylo využito 24 samců potkanů kmene Long-Evans (LE). Dvanácti potkanům byl vpraven QNP, dvanácti SAL. Část QNP ( $n = 7$ ) a SAL ( $n = 7$ ) skupiny explorovala arénu za účelem indukce exprese *Arc* mRNA, zatímco zbývající část sloužila jako nestimulovaná klecová kontrola (pro SAL i QNP skupinu  $n = 5$ ).

### 7.4.1.3 Analýza videozáznamů habituací

Analyzovány byly videozáznamy ze senzitivizačních sezení. K analýze byl využit software Viewer2 (Biobserve BmbH) zaznamenávající pozici hlavy, těla a ocasu zvířete. Měřenými parametry byly lokomoce potkanů, počty návštěv dvou kovových objektů a čtyř rohových oblastí arény (dohromady nazýváno „objekty“), průměrná rychlost pohybu potkana, čas strávený kontrolováním individuálních objektů a doba nečinnosti potkana. Získaná data o počtu návštěv lokalit A-E získané automatickou analýzou Viewer2 byly srovnány s ručními etogramy získanými analýzou náhodných 5minutových záznamů.

### 7.4.2 Imunohistochemická část experimentu

Pomocí *Arc* mRNA *in situ* hybridizace byly následně mapovány soubory neuronů OFC, MPC a ACC aktivních při pobytu v obohaceném OF prostředí u quinpirolem senzitivizovaných a nesenzitivizovaných potkanů. K experimentu byli využiti senzitivizovaní i nesenzitivizovaní potkani z behaviorálního experimentu.

#### 7.4.2.1 Histologizace

Histologizační fáze zahrnovala čtyři části:

- dělení vzorků tkáně
- zalévání řezů do OCT bloků
- krájení bloků
- kontrola nukleární morfologie

Z mozků byla při teplotě -17 °C nejprve odříznuta mícha a následně byly mozky v krájecí komůrce rozkrojeny třemi koronárními řezy na čtyři část. První část zahrnovala prefrontální kůru (PFC), druhá dorzální hipokampus, třetí ventrální hipokampus a čtvrtá mozeček. Dle velikosti bylo vždy 4-8 částí mozku zahrnujících PFC z různých experimentálních skupin uloženo vedle sebe do zalévací vaničky, překryto vrstvou OCT média (Optimal Cutting Temperature Medium) a uchováno při teplotě -80 °C. Pro účely této studie byly využity pouze části mozků obsahující PFC, zbylé části mozků byly uchovány.

Bloky byly krájeny na kryostatu (Leica CM 1850, Nussloch, Německo) při teplotě -17 °C na řezy o tloušťce 20 μm, které byly převedeny na mrazuvzdorná podložní skla pokrytá želatinou (Fisher). Kontrola intaktnosti buněčných jader v průběhu krájení byla provedena barvením DAPI (Vector Laboratories) a následnou fluorescenční mikroskopií.

#### 7.4.2.2 Fluorescenční in situ hybridizace

Pro *Arc* FISH byla použita metodika popsaná dříve (Guzowski & Worley, 2001; Vazdarjanova et al., 2002). Krycí skla s řezy mozků byla 5 minut fixována v pufrovaném vychlazeném roztoku paraformaldehydu (4%) a po opláchnutí v SSC pufru inkubovány 10 minut v roztoku acetanhydridu.

Po inkubaci byly vzorky omyty ve vodě prosté ribonukleáz, inkubovány 5 minut ve vymražené směsi ethanolu a metanolu (1:1) a opláchnuty v SSC pufru. Na každé podložní sklo se vzorkem bylo aplikováno 120  $\mu$ l prehybridizačního pufru neobsahujícího riboprůbu a vzorky byly inkubovány 30 minut při pokojové teplotě.

Na každé podložní sklo se vzorkem bylo nakapáno 120  $\mu$ l hybridizačního pufru obsahujícího denaturované digoxigeninem značené *Arc* antisense sondy. Skla byla ponechána hybridizovat do druhého dne (14 hodin) při teplotě 56 °C.

Po inkubaci vzorků s hybridizačním pufrům bylo provedeno post-hybridizační odmyváání. Podložní skla byla 5 a 10 minut promýváána SSC pufrům. Následně byla podložní skla 15 minut inkubována při teplotě 37 °C s roztokem RNázy A k odstranění nenavázané sondy.

Podložní skla byla dvakrát promyta v 2X SSC pufru a v ohřátém 0,5X SSC pufru (56 °C). Vzorky byly pro nasycení reziduální peroxidázové aktivity 15 minut inkubovány v 3% roztoku peroxidu vodíku. Po dvojitým promytím v SSC pufru byly vzorky ponechány inkubovat 10 minut v roztoku blokovacího pufru.

Na skla byla nanese naředěná protilátka (antidigoxigenin) a vzorky byly ponechány inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo provedeno post-imunodetekční odmyváání v TBS-T (3 x 5 minut).

Signál *Arc* mRNA byl amplifikován pomocí systému tyramidové signální amplifikace (TSA). Na podložní skla bylo nanese roztok tyramid-CY3 (TSA Plus Cyanine 3 Kit, Perkin Elmer) a skla byla ponechána inkubovat 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo opět provedeno několikanásobné odmyváání v TBS-T (2 x 5 minut).

V posledním kroku byla jádra buněk 15 minut barvena roztokem DAPI, vzorky byly dvakrát promyta v TBS, zakápnuty glycerolovým médiem (Vectashield) a překryta krycím sklem. Okraje krycích skel byly zalakovány průhledným lakem na nehty pro fixaci jejich polohy na podložních sklech.

#### 7.4.2.3 Konfokální mikroskopie

K mikroskopii byly vybrány 3 řezy z každé oblasti zájmu označené *in situ* hybridizací. Každé sklíčko obsahovalo 4-8 řezů PFC o stejné bregma pozici ze 4 – 8 experimentálních a kontrolních zvířat. ACC byl snímán v bregma pozici 1,2 – 4,2, MPC a OFC v pozici 3,4 – 5,2. Bylo pořízeno vždy 21 snímků (Z-stack) každé oblasti (ACC, MPC, OFC).

Vzorčky PFC potkanů byly mikroskopovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu Leica TCS SP8 (Nussloch, Německo) vybaveného 20X objektivem s olejovou imerzí. Modrý signál (DAPI) byl pořizován při 405 nm excitaci a pásmové propusti 415-490 nm a červený signál (TSA-Cy3) při 561 nm excitaci a pásmové propusti 610-680 nm. Nastavení laseru bylo optimalizováno pro jasnou viditelnost signálu *Arc* mRNA a bylo vždy jednotné pro všechny řezy jednoho sklíčka.

#### 7.4.2.4 Kvantifikace aktivních buněk

Snímky OFC, ACC a MPC mikroskopie byly analyzovány v open-source programu ImageJ (verze 1.48v) (Schneider et al., 2012) za použití poloautomatizovaných makro laskavě poskytnutých RNDr. Štěpánem Kubíkem Ph.D. K analýze byly vybrány pouze snímky reprezentující střední rovinu řezu (20 % optických vrstev zaostření). Tento krok byl zvolen pro snížení pravděpodobnosti analýzy neúplných jader, která by mohla vést k falešně negativním výsledkům.

Na vybraných snímcích byla označena kulatá a nepoškozená jádra neuronů, která tvořila oblasti zájmu (ROI) pro další analýzu. Jádra gliových buněk, rozpoznána dle jejich menšího rozměru a jasného, nestrukturovaného obarvení, nebyla do analýzy zahrnuta. Při určování ROI bylo dbáno na to, aby se jednotlivé ROI nepřekrývaly a nedošlo tak k započítání stejného signálu vícenásobně.

Po označení ROI byla složením dílčích optických rovin řezu vytvořena maximální projekce roviny. Na základě maximální projekce roviny byl odstraněn signál pozadí. K odstranění signálu pozadí byla vybrána právě čtyři ROI s nejvýraznějším signálem pozadí, na základě kterých byl programem vypočítán medián střední hodnoty hustoty signálu a odstraněn jako šum pozadí.

Projekce v ose Z obou barevných kanálů byly zkombinovány do jednoho kompozitního snímku. V kompozitním snímku byly stanoveny prahy citlivosti pro určení



*Arc* mRNA pozitivních buněk. Prahy citlivosti byly vždy stanovovány podle ROI s mezní hodnotou signálu. Jednotlivé neurony OFC, MPC a ACC byly softwarem automaticky označovány jako NEG (žádný signál) či *Arc*<sup>+</sup> (*Arc* mRNA signál) dle stanovených prahových hodnot. V průběhu analýzy ani vyhodnocování snímků nebylo experimentátorovi známo, které snímky přísluší zvířatům kontrolních a experimentálních skupin.

### 7.4.3 Statistické vyhodnocení dat

#### 7.4.3.1 Stereotypní chování

Statisticky vyhodnocovanými parametry z Viewer2 (Biobserve BmbH) byla lokomoce potkanů a frekvence návštěv jednotlivých objektů/lokalit během sensitizačních sezení. K vyhodnocení stability vzorce kontrolování byly jednotlivé objekty/lokality arény individuálně překódovány pro jednotlivá zvířata. Nejnavštěvovanější objekt zájmu byl vždy označen “A”, druhý nejnavštěvovanější “B” apod. Ilustračně je postup při překódování objektů arény znázorněn v Tab. 7). Díky tomuto přístupu mohla být data z QNP i SAL skupiny vzájemně porovnávána na úrovni skupin. Pokud byl vzorec kontrolování mezi jednotlivými sezeními stabilní, pak by: (a) se měly významně lišit celkové počty návštěv objektů A-F, (b) pořadí návštěvnosti objektů v rámci jednotlivých sezení by se nemělo významně lišit od celkového pořadí oblíbenosti objektů A-F. Oba předpoklady byly testovány samostatně pomocí dvoucestné ANOVA s opakovanými měřeními.

QNP5E PŮVODNÍ KÓD	FREKVENCE NÁVŠTĚV ZÓN										SUMA	NOVÝ KÓD
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10		
1	43	71	50	28	141	145	290	304	274	316	1662	→ A
2	24	24	39	11	114	31	36	51	24	28	382	→ D
3	13	21	19	76	30	28	21	10	7	12	237	→ F
4	20	79	60	106	20	83	75	56	32	20	551	→ C
5	23	18	46	138	46	190	157	151	237	168	1174	→ B
6	1	2	20	23	50	38	35	45	62	54	330	→ E

**Tab. 7** - Ilustrační ukázka metody překódování zón dle celkového pořadí návštěvnosti. Po sečtení všech frekvencí návštěv dané zóny byly zóny překódovány na A-F dle pořadí velikostí součtů. Překódování bylo provedeno jednotlivě pro každé zvíře, zde na příkladu potkana QNP skupiny.

#### **7.4.3.2 Vizualizace exprese *Arc* mRNA**

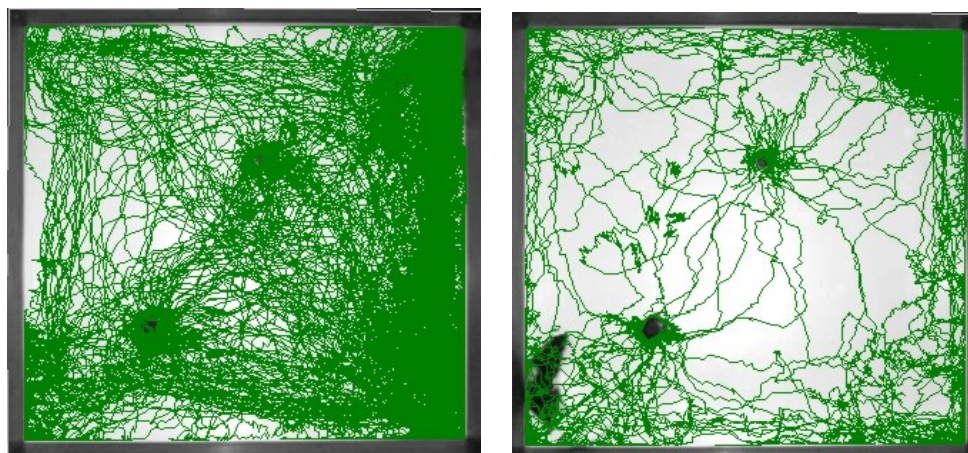
Statisticky vyhodnocena byla data získaná pomocí ImageJ software, tedy počty aktivních (*Arc*<sup>+</sup>) neuronů ACC, OFC a MPC. Rozdíly mezi aktivitami ACC, OFC a MPC byly analyzovány odděleně pro QNP a SAL skupiny za použití dvoucestné ANOVA bez opakovaných měření v softwaru SPSS.

## 8 VÝSLEDKY

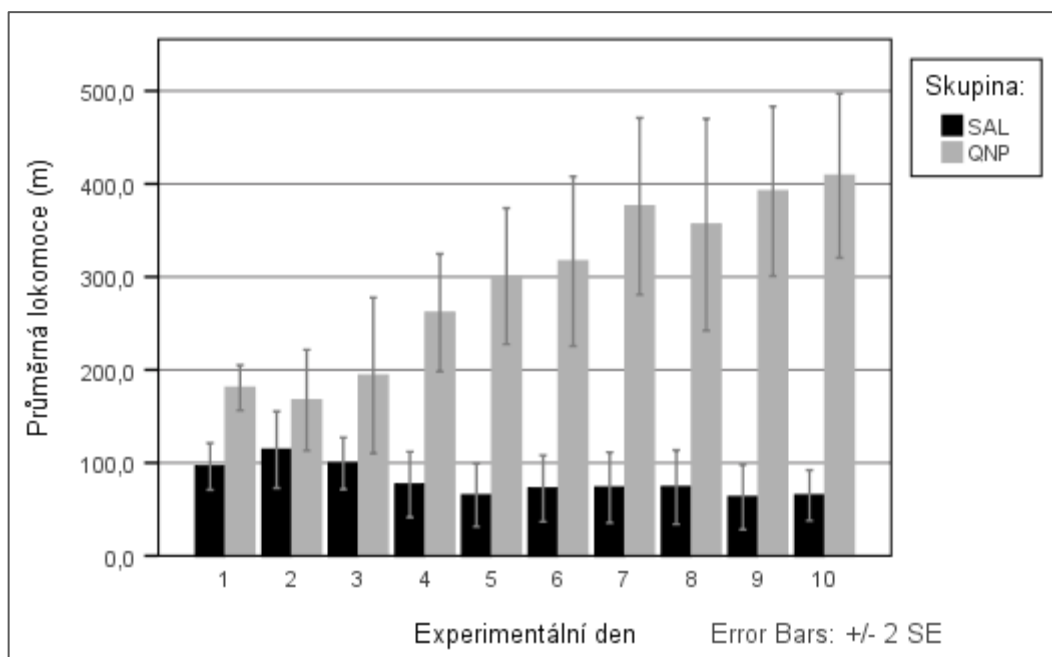
### 8.1 Behaviorální část experimentu

Statisticky vyhodnocena byla lokomoční aktivita, frekvence návštěv zón a stabilita preference zón potkanů QNP a SAL skupiny. Hladina signifikance byla univerzálně stanovena alfa = 0,05 s výjimkou vícenásobného srovnání návštěvnosti preferovaných zón, kde byla hladina signifikance upravena pomocí Bonferonniho korekce.

Grafický záznam **lokomoční aktivity** zvířat pořízený programem Viewer2 (Biobserve BmbH) je znázorněn na Obr 9. Data o lokomoční aktivitě zvířat měla parametrické rozložení. Změny v lokomoční aktivitě obou skupiny zvířat byly nejprve vyhodnoceny dvoucestnou ANOVA s opakovanými měřeními, kde byla nalezena signifikantní interakce mezi typem podané látky (QNP/SAL) a experimentálním dnem [ $F(9,199) = 3,701, p < 0,001$ ]. Lokomoční aktivita SAL potkanů se v průběhu experimentálních dnů signifikantně nelišila [ $F(9,98) = 0,675, p = 0,73$ ], 10. experimentální den byla délka ušlé trasy SAL potkany 1,3krát větší než 1. den. Lokomoční aktivita QNP skupiny se mezi jednotlivými experimentálními dny signifikantně lišila [ $F(9,101) = 3,265, p < 0,05$ ], přičemž 10. den byla délka ušlé trasy QNP potkany 4,9krát větší než 1. den. Průměrná lokomoce SAL a QNP potkanů během jednotlivých dnů je graficky porovnána v Grafu 1. Lokomoční aktivita QNP a SAL skupin zvířat během jednotlivých experimentálních dnů byla srovnána jednovýběrovým t-testem. Lokomoce QNP skupiny byla signifikantně vyšší než lokomoce SAL skupiny od 4. dne [ $t(12) = 5,839, p < 0,001$ ].

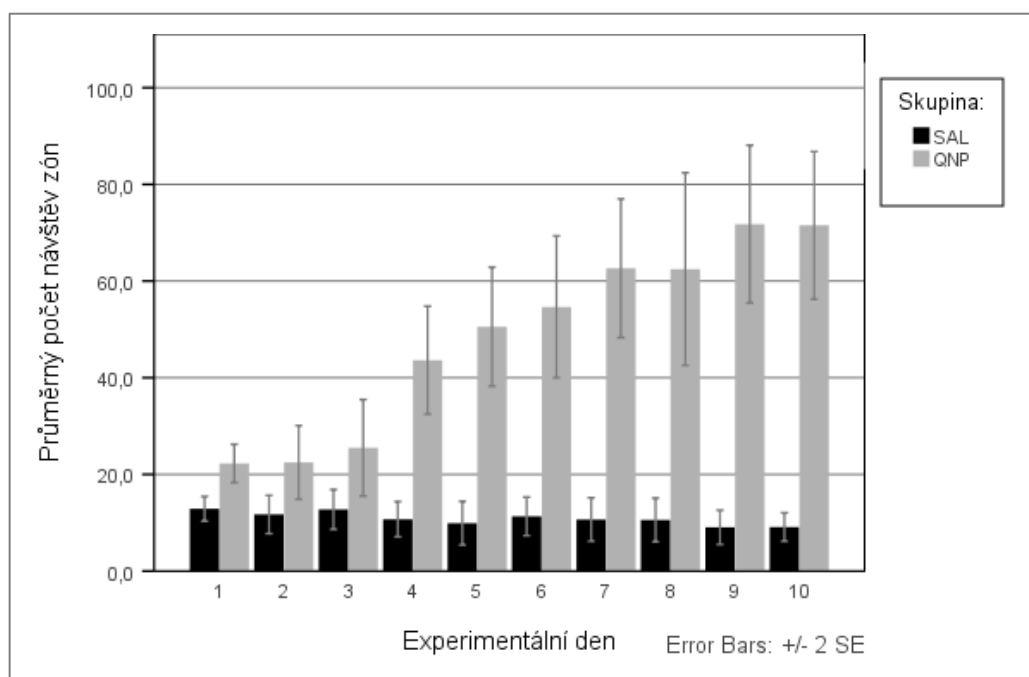


**Obr. 9** - Srovnání ušlých tras (zeleně) potkana QNP (**vlevo**) a SAL (**vpravo**) skupiny během 5. experimentálního dne ( $t = 60$  minut). Trasa ušlá potkanem byla zaznamenána programem Viewer2 (Biobserve BmbH).

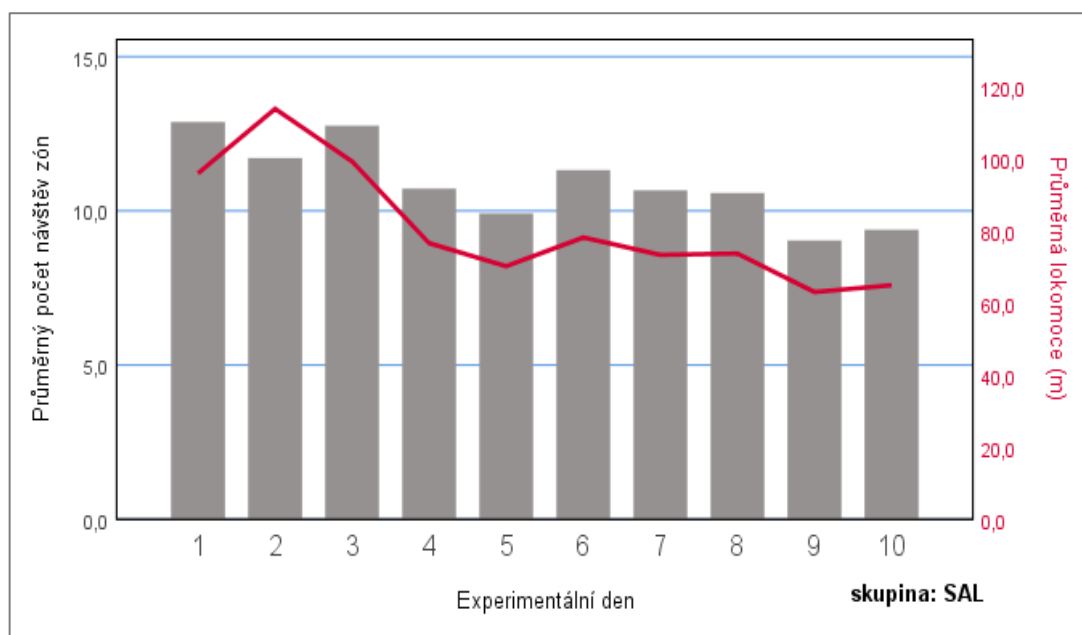


**Graf 1** - Srovnání průměrné lokomoce QNP a SAL potkanů během jednotlivých experimentálních dnů. Rozdíly mezi lokomoční aktivitou potkanů QNP a SAL skupiny byly signifikantně vyšší od 4. experimentálního dne ( $p < 0,001$ , v grafu není vyznačeno).

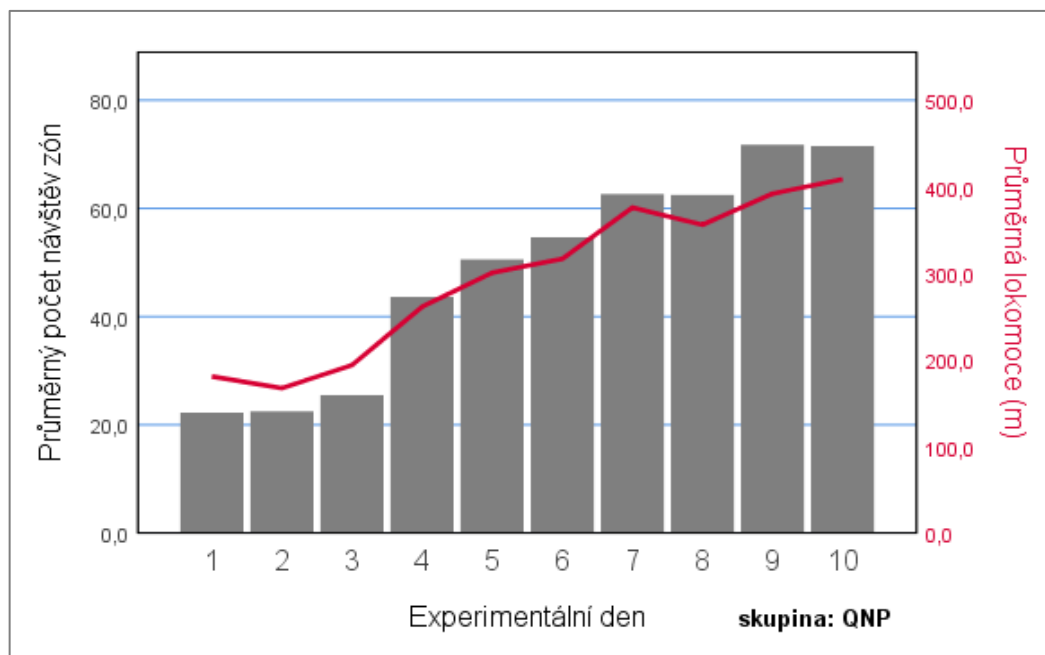
Změny v celkové **frekvenci návštěv zón** obou skupiny zvířat byly srovnány pomocí dvoucestné ANOVA s opakovanými měřeními, kdy byla nalezena signifikantní interakce typu podané látky (QNP/SAL) a pořadím experimentálního dne [ $F(9,198) = 5,410$ ,  $p < 0,001$ ]. Změny v celkové frekvenci návštěv zón během jednotlivých experimentálních dnů byly následně vyhodnoceny odděleně pro SAL a QNP skupiny pomocí jednocestné ANOVA. Průměrná frekvence návštěv zón SAL skupiny se mezi jednotlivými experimentálními dny signifikantně nelišila [ $F(9,97) = 0,352$ ,  $p = 0,995$ ], přičemž 10. den byla frekvence návštěv zón průměrně 1,5krát vyšší než 1. den. Průměrná frekvence návštěv zón QNP skupiny se mezi jednotlivými experimentálními dny signifikantně lišila [ $F(9,101) = 5,290$ ,  $p < 0,001$ ], kdy 10. den byla sumární frekvence návštěv zón průměrně 7krát vyšší než 1. den. Průměrné frekvence návštěv jednotlivých zón SAL a QNP potkany v průběhu jednotlivých dnů habituací jsou srovnány v Grafu 2. Průměrná frekvence návštěv zón QNP a SAL skupin zvířat během jednotlivých experimentálních dnů byla srovnána jednovýběrovým t-testem. Průměrná frekvence návštěv zón QNP skupiny byla signifikantně vyšší než průměrná frekvence návštěv zón SAL skupiny od 4. dne [ $t(35) = 4,315$ ,  $p < 0,001$ ]. Rozdíly v návštěvnosti zón korespondovaly s lokomoční aktivitou obou skupin potkanů (viz Graf 3 a Graf 4).



**Graf 2** - Srovnání průměrné návštěvnosti zón potkany QNP a SAL skupiny během jednotlivých experimentálních dnů. Rozdíly mezi lokomoční aktivitou potkanů QNP a SAL skupiny byly signifikantně vyšší od 1. experimentálního dne ( $p < 0,001$ , v grafu není vyznačeno)



**Graf 3** - Průměrná lokomoce a průměrný počet návštěv zón během jednotlivých experimentálních dnů potkanů SAL skupiny.

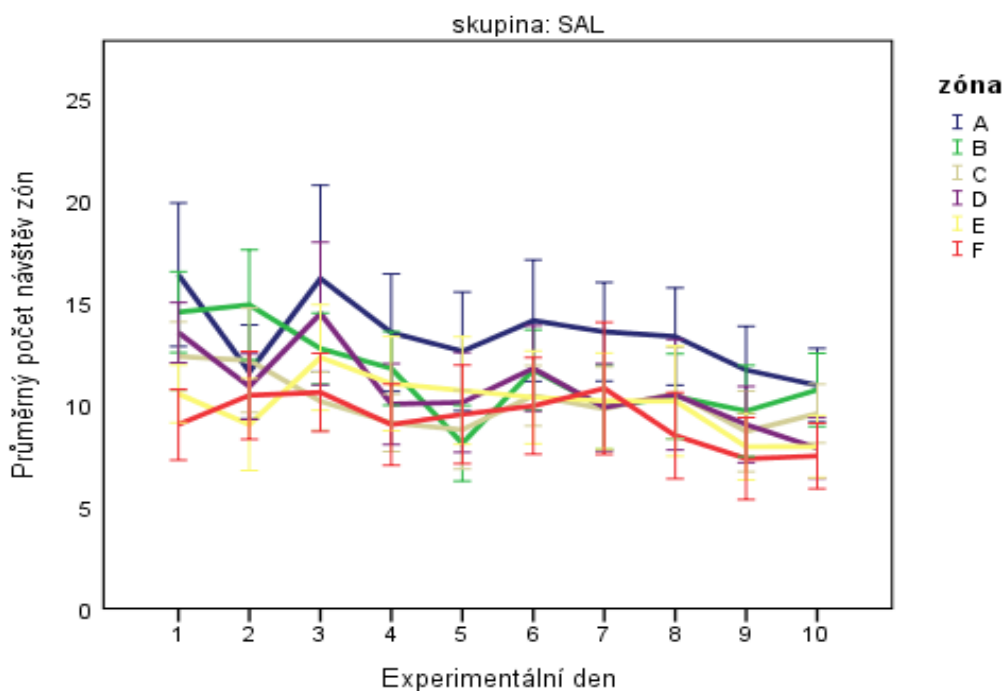


**Graf 4** - Průměrná lokomoce a průměrný počet návštěv zón během jednotlivých experimentálních dnů potkanů QNP skupiny.

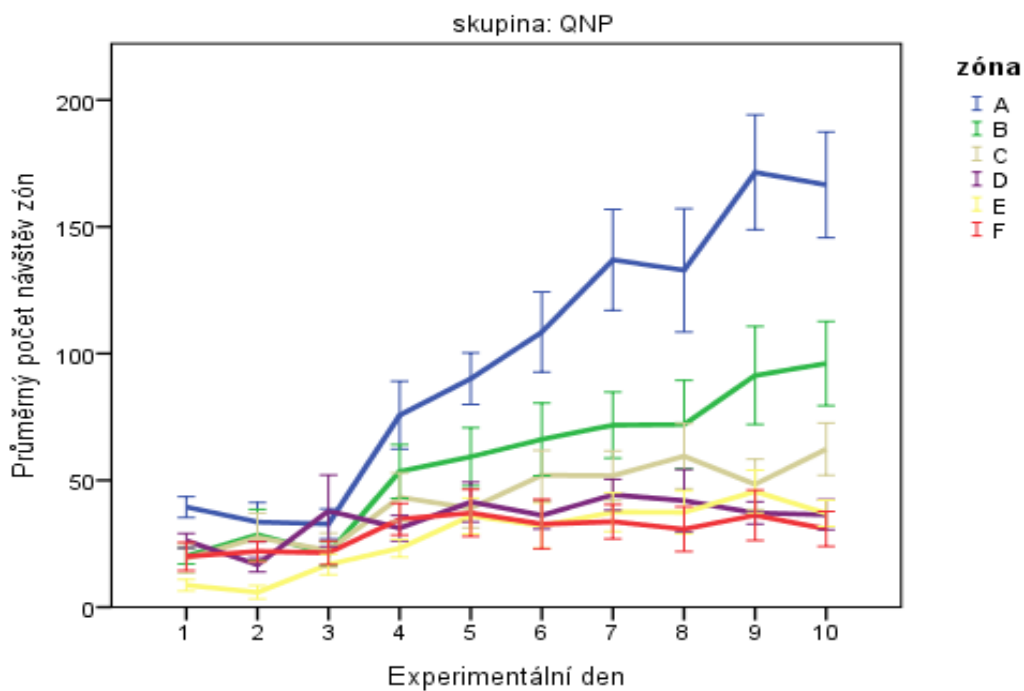
Za účelem vyhodnocení **stability vzorce preference zón** byly jednotlivé zóny arény překódovány na A-F dle celkové frekvence počtu návštěv dané zóny zvířetem (kde A byla celkově nejvíce a F celkově nejméně preferovanou zónou). Statistická analýza stability vzorce preference zón byla provedena dvoucestnou ANOVA s opakovanými měřeními (two-way ANOVA repeated measures), odděleně pro SAL a QNP skupinu, kde zóna byla meziskupinovým faktorem a experimentální den byl vnitroskupinovým faktorem. U SAL skupiny nebyla interakce mezi pořadím sezení a frekvencí návštěv zón A-F signifikantní [ $F(25, 209) = 0,422, p = 0,994$ ], zatímco u QNP skupiny byla tato interakce signifikantní [ $F(19, 276) = 3,011, p < 0,001$ ].

Rozdíly ve frekvenci návštěv zón A až F nebyly signifikantní u SAL [ $F(5, 60) = 0,993, p = 0,43$ ] a byly signifikantní u QNP skupiny [ $F(5, 72) = 20,737, p < 0,001$ ]. Při vícenásobném srovnání Bonferroniho post-hoc testem byly nalezeny signifikantní rozdíly ( $p < 0,001$ ) v návštěvnosti zón A až F u QNP skupiny. Zóna A byla signifikantně více navštěvovaná než zóny C, D, E, F a zóna B byla signifikantně více navštěvovaná než zóny D, E, F. U SAL skupiny nebyly rozdíly mezi návštěvností zón A-F v žádném případě signifikantní ( $p > 0,05$ ). U QNP skupiny byla zóna A navštěvována s 5,1krát vyšší frekvencí než zóna F (celkem 12 179 (A) návštěv oproti 2380 (F)), zatímco u SAL skupiny byla zóna A navštívena s 1,7krát vyšší frekvencí než zóna F (celkem 1436 (A) návštěv oproti

844 (F)). Průměrná návštěvnost zón A-F SAL skupiny je znázorněna v Grafu 5 a QNP skupiny v Grafu 6.



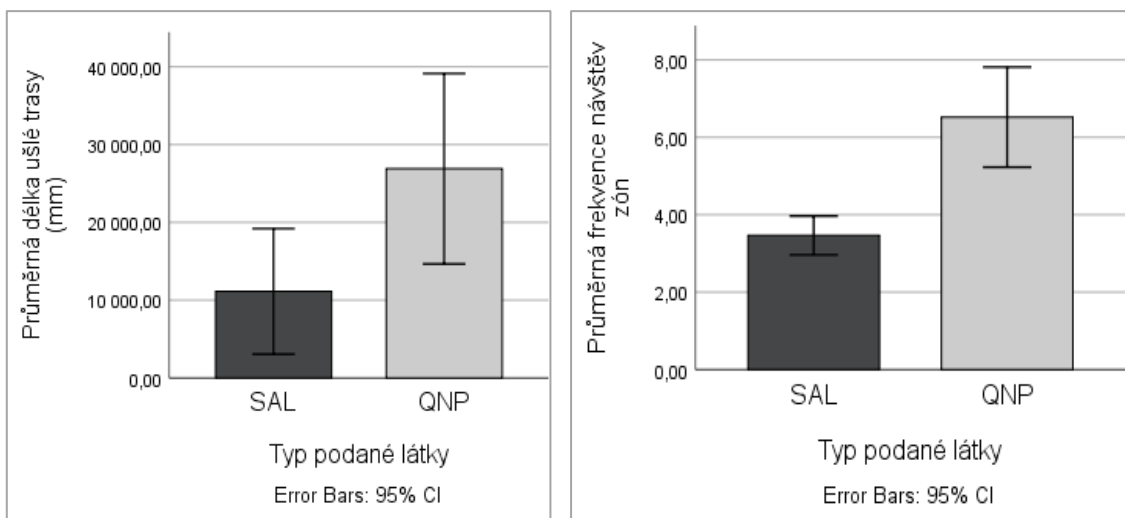
**Graf 5** - Průměrná návštěvnost jednotlivých zón překódovaných dle celkové preference SAL skupinou potkanů v průběhu jednotlivých experimentálních dnů.



**Graf 6** - Průměrná návštěvnost jednotlivých zón překódovaných dle celkové preference QNP skupinou potkanů v průběhu jednotlivých experimentálních dnů.

### 8.1.1 Explorace OF prostředí za účelem indukce exprese IEG

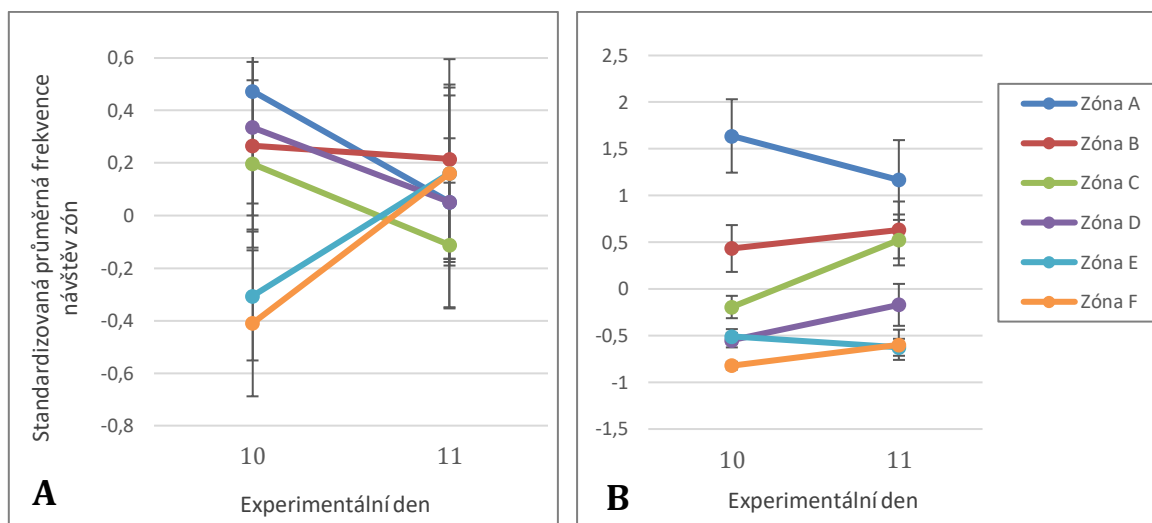
Za účelem následného sledování exprese IEG v mozku zvířat byla pokusná zvířata, jimž byl podáván QNP a SAL, náhodně rozdělena do dvou skupin. První část zvířat explorovala OF arénu po dobu 5 minut za účelem exprese IEG (aktivní zvířata,  $n = 7$  zvířat QNP skupiny a  $n = 7$  zvířat SAL skupiny). Druhá část zvířat byla ponechána v chovných boxech za účelem pozdějšího stanovení bazální exprese IEG (kontrolní zvířata,  $n = 5$  zvířat QNP a  $n = 5$  zvířat SAL skupiny). **Průměrná délka ušlé trasy a průměrná frekvence návštěv zón** potkanů aktivních zvířat jsou znázorněny v Grafu 7a a 7b.



**Graf 7** - Porovnání lokomoční a behaviorální aktivity zvířat explorujících arénu dle typu podané látky (QNP či SAL). (a) Průměrná délka ušlé trasy v mm, (b) průměrná frekvence návštěv zón.

Pro srovnání **stability preference zón** byly frekvence návštěv zón z 11. experimentálního dne překódovány na A-F dle celkového pořadí preference zón z předcházejících experimentálních dnů. Data o frekvenci návštěv zón A-F z 10. ( $t = 60$  minut) a 11. sezení v aréně ( $t = 5$  minut) byla za účelem porovnání standardizována. Srovnání průměrných standardizovaných frekvencí návštěv zón A-F SAL a QNP senzitivovaných zvířat explorujících arénu je vyobrazeno v Grafu 8A a 8B.





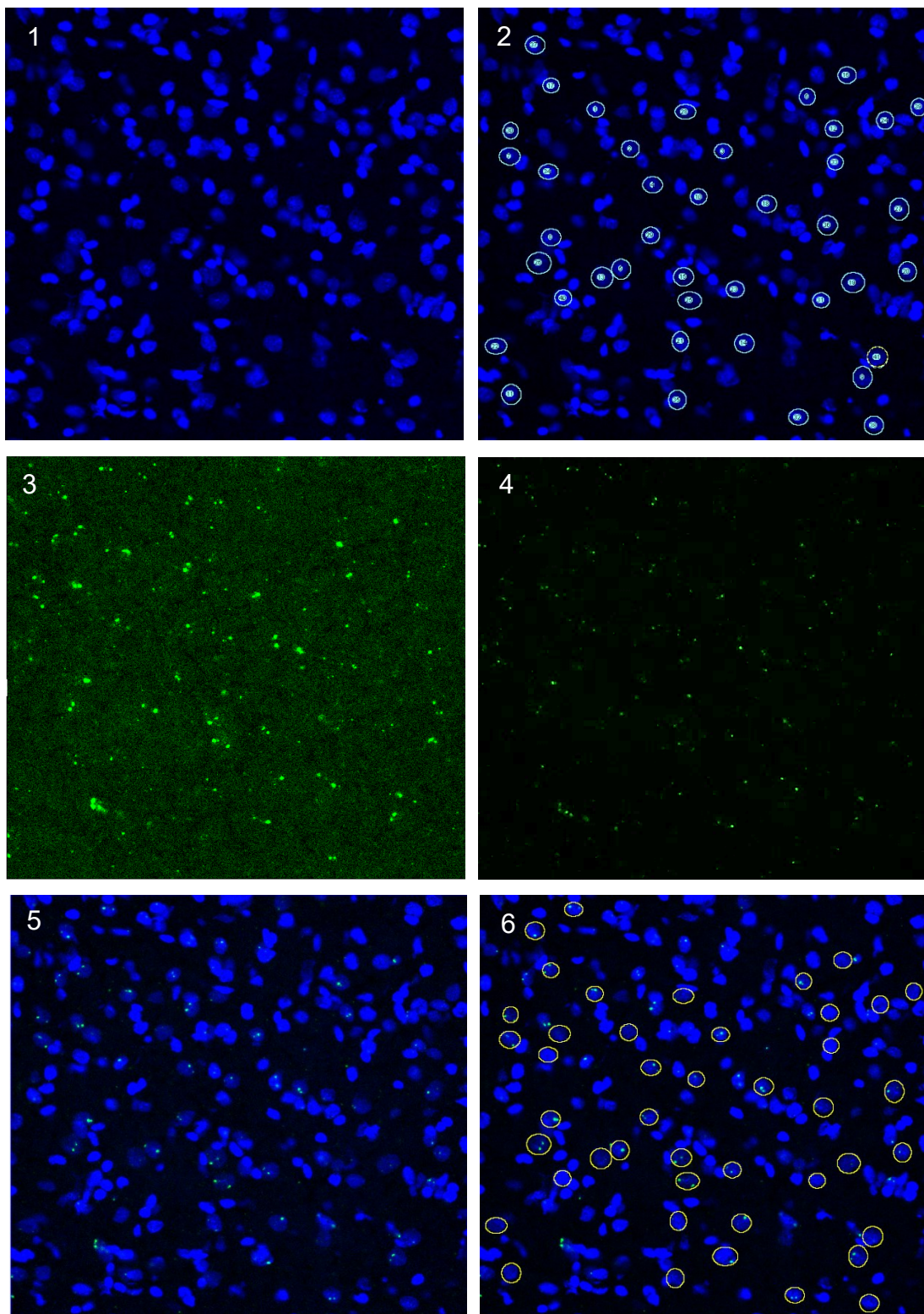
**Graf 8** - Srovnání průměrné standardizované frekvence návštěv jednotlivých zón překódovaných dle celkového pořadí preference z předcházejících 10 experimentálních dnů. **(A)** Srovnání dat z 10. dne a 11. experimentálního dne SAL aktivní skupiny zvířat. **(B)** Srovnání dat z 10. dne a 11. experimentálního dne QNP aktivní skupiny zvířat.

## 8.2 Mapování neuronální aktivity

### 8.2.1 Imunohistochemická část

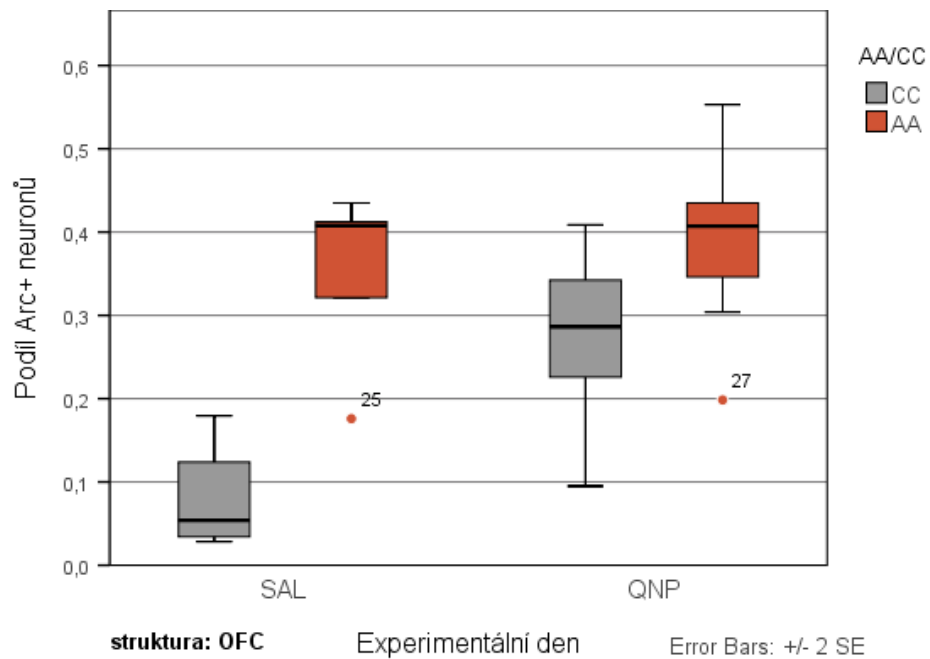
K mapování aktivních neuronů ACC, OFC a MPC aktivních i kontrolních potkanů byla využita *in situ* hybridizace IEG *Arc*. Na základě softwaru ImageJ (Schneider et al., 2012) byly určeny počty jader neuronů ACC, OFC a MPC pozitivních pro *Arc* mRNA signál (*Arc+*) a celkové počty detekovaných jader neuronů oblastí. Schematicky je postup detekce *Arc+* neuronů zachycen na Obrázku 10. Pro statistickou analýzu byla hladina signifikance univerzálně stanovena na  $\alpha = 0,05$ . Podíly *Arc+* jader neuronů z ACC, MPC a OFC z vícenásobného měření jednoho zvířete byly zprůměrovány.

Statistické vyhodnocení **podílů *Arc+* buněk** z celkového počtu detekovaných jader neuronů potkanů byla provedena samostatně pro oblasti ACC, OFC a MPC. Statistická analýza byla provedena pomocí dvoucestné ANOVA bez opakovaných měření, kde stimulace zvířete (explorující/neexplorující arénu) a typ podané látky (QNP/SAL) byly meziskupinovými faktory.

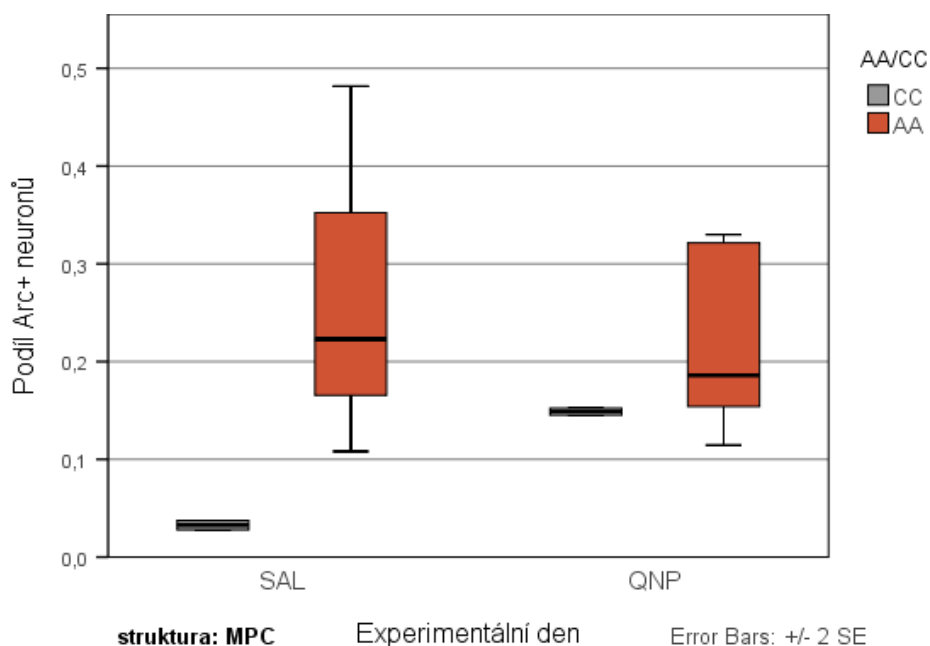


**Obr 10.** Ilustrativní postup analýze snímků v softwaru ImageJ. (1) Středních 20% DAPI (2) Označena jádra neuronů (3) Signál *Arc* (zeleně) před odstraněním šumu pozadí. (4) Signál *Arc* po odstranění šumu pozadí. (5) Kompozitní snímek *Arc* signálu a signálu DAPI (modře). (6) Automatická detekce *Arc*+ buněk na základě předem stanoveného prahu signálu.

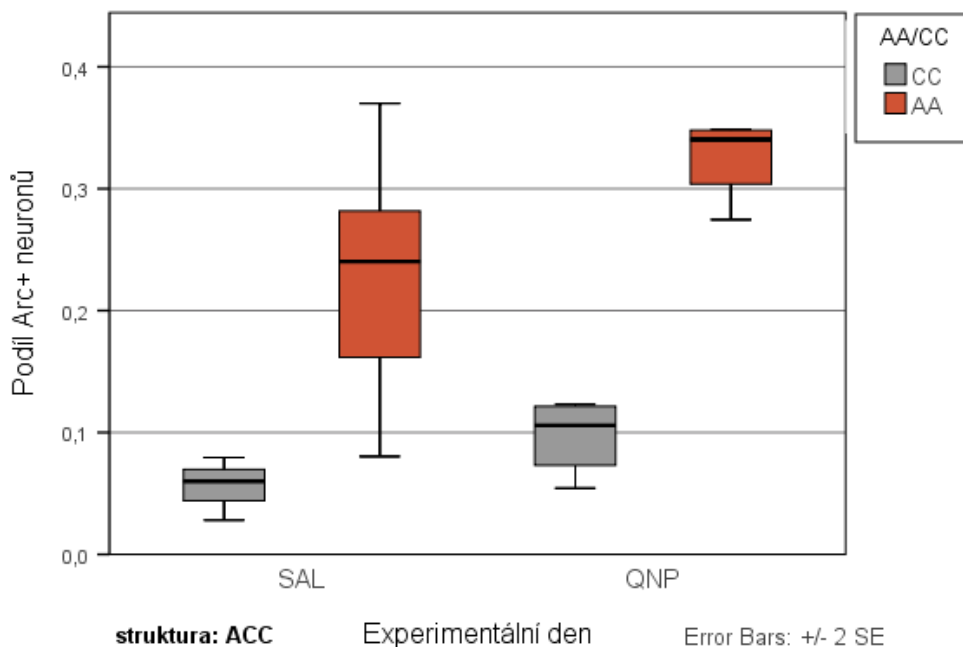
Při srovnání podílů *Arc+* neuronů OFC byl nalezen signifikantní efekt stimulace zvířete [ $F(1, 20) = 16,830$ ;  $p = 0,001$ ] i efekt podané látky [ $F(1, 20) = 5,938$ ;  $p = 0,026$ ]. Nebyla nalezena signifikantní interakce efektu stimulace zvířete a efektu podané látky ( $p > 0,05$ ). Rozdíly v podílech *Arc+* neuronů MPC byly ve všech případech nesignifikantní (všechna  $p > 0,05$ ). Při srovnání podílů *Arc+* jader neuronů ACC byl nalezen signifikantní efekt stimulace zvířete [ $F(1, 13) = 15,064$ ;  $p < 0,001$ ]. V případě efektu podané látky (QNP/SAL) byl zaznamenán pouze trend ke zvýšení exprese *Arc* u QNP senzitivovaných potkanů [ $F(1, 13) = 4,265$ ;  $p = 0,059$ ]. Interakce mezi efektem podané látky a efektem stimulace zvířete nebyla signifikantní ( $p > 0,05$ ). Podíly *Arc+* jader neuronů OFC jsou znázorněny v Grafu 9, podíly *Arc+* jader neuronů MPC v Grafu 10 a podíly *Arc+* jader neuronů ACC v Grafu 11.



**Graf 9** - Srovnání podílů *Arc+* jader neuronů OFC u skupin potkanů dělených dle typu podané látky na SAL (podáván fyziologický roztok) a QNP (podáván roztok QNP). Skupiny SAL i QNP obsahovaly podskupinu stimulovaných (AA, explorace arény,  $t = 5$  minut) a kontrolních nestimulovaných zvířat (CC, ponechání v chovných boxech).



**Graf 10** - Srovnání podílů *Arc+* jader neuronů MPC u skupin potkanů dělených dle typu podané látky na SAL (podáván fyziologický roztok) a QNP (podáván roztok QNP). Skupiny SAL i QNP obsahovaly podskupinu stimulovaných (AA, explorace arény,  $t = 5$  minut) a kontrolních nestimulovaných zvířat (CC, ponechání v chovných boxech).



**Graf 11** - Srovnání podílů *Arc+* jader neuronů ACC u skupin potkanů dělených dle typu podané látky na SAL (podáván fyziologický roztok) a QNP (podáván roztok QNP). Skupiny SAL i QNP obsahovaly podskupinu stimulovaných (AA, explorace arény,  $t = 5$  minut) a kontrolních nestimulovaných zvířat (CC, ponechání v chovných boxech).

## 9 DISKUZE

Model quinpirolem indukovaného kompulzivního kontrolování je všeobecně ustanovený model OCD zohledňující relevanci dopaminergního systému v projevu repetitivních symptomů: Kombinace environmentálního kontextu a opakované stimulace agonistou D2/D3 receptorů quinpirolem vyvolává u potkanů chování připomínající kompulzivní kontrolování lidí (Szechtman et al., 1998). Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda je QNP indukované kompulzivní kontrolování spojené s alteracemi aktivit mozkových struktur implikovaných u OCD a ověřit tak konstrukční validitu tohoto modelu. V naší studii nebyly pozorovány alterace aktivit OFC a ACC u QNP senzitivizovaných potkanů kontrolujících objekty arény. Naším hlavním zjištěním je však signifikantní zvýšení bazální aktivity OFC u QNP senzitivizovaných zvířat. Vedlejšími cíli této práce bylo (1) zhodnotit, zda model quinpirolem indukovaného kompulzivního kontrolování splňuje kritérium signifikantního zvýšení frekvence návštěv preferovaného objektu v čase a (2) replikovat předchozí výsledky studií popisujících signifikantní zvýšení lokomoce a frekvence návštěv objektů u QNP senzitivizovaných zvířat. Z našich výsledků vyplývá, že QNP indukované kompulzivní kontrolování výše popsané kritérium signifikantního zvýšení frekvence návštěv splňuje. Podařilo se také úspěšně replikovat předchozí výsledky. V této diskuzi jsou jednotlivé výsledky diskutovány na základě chronologického pořadí v experimentu.

**Lokomoční aktivita** quinpirolem senzitivizovaných i kontrolních potkanů byla měřena během explorační obohaceného otevřeného pole, do kterého byla zvířata vkládána 50 minut od injekce QNP či SAL. Tento přístup byl zvolen na základě bifázického účinku quinpirolu na lokomoční aktivitu potkanů. Lokomoční aktivita potkanů je po akutní subkutánní injekci QNP v dávce 0,5 mg/kg prvních 5 minut snížena v důsledku aktivace presynapticky uložených autoreceptorů typu D2 (Skirboll et al., 1979) a přibližně 30 minut od podání quinpirolu zvýšena aktivací postsynapticky uložených D2-receptorů (Eilam & Szechtman, 1989; Wu et al., 1993). Vzhledem k tomu, že biologický poločas QNP je přibližně 9,5 hodiny a maximálním účinek QNP na lokomoční aktivitu nastává po přibližně 60 minutách, byl pro explorační arény zvolen interval mezi 50 a 100 minutami od podání QNP či SAL (Eilam & Szechtman, 1989; Gallick Whitaker & Lindstrom, 1987). U potkanů senzitivizovaných QNP se i v tomto případě vyvinula dříve popsaná lokomoční senzitivizace (Szumlinski et al., 1997). **Délka ušlé vzdálenosti** během prvního a desátého dne byla 4,9krát zvýšena, což koresponduje s dříve publikovanými výsledky popisujícími 4 až 8 násobný nárůst lokomoční aktivity (Dvorkin et al., 2006). Lokomoční aktivita

potkanů, jimž byl podáván fyziologický roztok, se v průběhu experimentálních dnů signifikantně nelišila, což dokládá, že u nich k lokomoční senzitivaci nedošlo.

**Celková frekvence návštěv zón QNP** senzitivovaných potkanů byla ve srovnání s kontrolními zvířaty signifikantně vyšší, což koresponduje s předchozími výsledky popisujícími senzitivaci kompulzivního kontrolování (Dvorkin et al., 2006). Celková frekvence návštěv zón QNP senzitivovanými potkany byla 10. experimentální den 7krát vyšší než 1. experimentální den. Přestože zvýšení frekvence návštěv zón QNP senzitivovanými potkany korelovalo s nárůstem lokomoce potkanů (viz Graf 4), dle dřívějších výsledků není nárůst lokomoce *per se* zodpovědný za behaviorální projevy kompulzivního kontrolování. Potkani, u nichž byla hyperlokomoce navozena cílenou lézí *nucleus accumbens*, vykazovali srovnatelnou lokomoční aktivitu jako QNP senzitivovaní potkani, nesplňovali však formální etologická kritéria kompulzivního kontrolování (Dvorkin et al., 2010).

Signifikantně vyšší **frekvence návštěv preferované zóny** (v textu dále jako „home-base“) je prvním z formálních etologických kritérií kompulzivního kontrolování objektů u potkanů a pacientů s OCD (v textu dále jako „kritérium č. 1,“ pro přehled kritérií viz strana 7) (Szechtman et al., 1998). Běžným přístupem v analýze chování quinpirolem senzitivovaných potkanů je např. měření frekvence návštěv home-base, frekvence návštěv ostatních zón mezi návštěvami home-base či průměrné doby návratu do home-base (Albelda & Joel, 2012; De Haas et al., 2011; Dvorkin et al., 2006) Tento přístup však nevypovídá o stabilitě preferencí zón v čase a omezuje možnost vzájemného srovnání jedinců různých skupin. V této studii jsme proto zvolili odlišný analytický přístup, kdy jsme zóny arény pro každé zvíře individuálně překódovali dle celkového pořadí frekvence návštěv zón na A - F. Naše výsledky jsou v souladu s předešlými výsledky, které uvádí, že model quinpirolem indukovaného kompulzivního kontrolování kritérium č. 1 splňuje (Eilam et al., 2012). Celkově nejnavštěvovanější zóna (A) byla quinpirolem senzitivovanými potkany navštěvována se signifikantně vyšší frekvencí než všechny ostatní zóny (B, C, D, E, F). Vzhledem k tomu, že se ani celková frekvence návštěv nejvíce navštěvované zóny (A) u kontrolních zvířat v žádném případě signifikantně nelišila od frekvence návštěv ostatních zón, kritérium č. 1 nesplnila.

Pro účely srovnání neuronální aktivity QNP senzitivovaných a kontrolních zvířat byly vybrány struktury **ACC, OFC, MPC**. Oblasti ACC a OFC byly vybrány na základě předchozí korelace s OCD (Menzies et al., 2010) a asociace s dimenzí kontrolování OCD

(Cottraux et al., 1996; Mataix-Cols et al., 2004). MPC byl vybrán jako kontrolní struktura, jelikož změny v aktivitě dorzolaterální ani ventromediální prefrontální kůry, funkčně odpovídajících MPC potkana, nebyly asociovány s OCD ani s dimenzí kontrolování. Očekávali jsme proto, že ke změnám v aktivitě MPC nedochází ani u senzitivace quinpirolem. Aktivita ACC, OFC a MPC u potkanů kontrolujících objekty arény byla určována na základě 5minutové explorační arény. Přestože byl tento časový interval v porovnání s předchozími senzitivizačními sezeními výrazně kratší (5 minut oproti (50 minutám), preference jednotlivých objektů arény během 5minutového sezení se u QNP senzitivovaných potkanů výrazně podobala preferenci zón z předchozího senzitivizačního sezení, jak je patrné z Grafu 8. Výhodou 5minutové explorační arény bylo především snížení rozdílu v lokomoci QNP a SAL skupin zvířat, které by mohly zmást výsledky naší studie.

Ačkoliv je z Grafu 11 patrný trend ke zvýšení **podílu Arc exprimujících neuronů** v ACC u QNP senzitivovaných zvířat explorační arény, v porovnání s kontrolními zvířaty explorační arény nebyly nalezeny signifikantní rozdíly. Tento výsledek zcela nekorresponduje s výsledky dřívějších studií, které popisují snížení aktivity ACC u QNP senzitivovaných potkanů. Konkrétně Huang et al. prostřednictvím multikanálového elektrofyziologického snímání neuronů ACC popsali výrazné snížení aktivity sledovaných neuronů (73 %) (Huang et al., 2013). Pokles aktivity ACC u QNP senzitivovaných potkanů uvádí i Carpenter et al. a Richards et al. za použití metody lokálního cerebrálního využití glukózy (Carpenter et al., 2003; Richards et al., 2005) Odlišné výsledky mohou být dány rozdílnými metodologickými přístupy mezi těmito studiemi a naší studií. Huang et al. ve své studii využili anestezovaná zvířata, tedy měření aktivity neuronů nebylo provedeno v době, kdy zvířata kontrolovala objekty arény. Metoda lokálního cerebrálního využití glukózy, aplikovaná Carpenter et al., Richards et al. a Huang et al., je schopna detekovat pouze velké uniformní změny aktivity nervových buněk struktury a není specifická pro neurony (Féger & Robledo, 1991). Přestože je ACC u OCD konzistentně implikován, údaje o směru alterace aktivity ACC nejsou konzistentní a neumožňují nám tak přímé srovnání s našimi výsledky. Cheng et al. a Hou et al. popisují zvýšení aktivity ACC u pacientů během klidového měření funkční magnetickou rezonancí (Cheng et al., 2013)(Hou et al., 2012). Oproti tomu však Rauch et al. na základě pozitronové emisní tomografie nenalezli zvýšenou aktivitu ACC během klidového měření, ale při vyvolání symptomů OCD (Rauch et al., 1994). Meta-analýza zobrazovací studií Norman et al. však popisuje snížení aktivity ACC u OCD pacientů (Norman et al., 2016). Podobně Nakao et al. nenalezli rozdíly v aktivitě ACC při

vyvolání symptomů, popisují však na základě funkční magnetické rezonance zvýšení aktivity ACC při úspěšné symptomatické terapii (Nakao et al., 2005), což kontrastuje s výsledky Perani et al., kteří pomocí pozitronové emisní tomografie popisují naopak snížení aktivity ACC po úspěšné symptomatické léčbě (Perani et al., 1995).

Quinpirolem senzitivovaná zvířata měla signifikantně vyšší **podíl *Arc* exprimujících neuronů OFC** oproti kontrolním zvířatům. Z Grafu 9 je patrné, že uvedený rozdíl je dán vysokými hodnotami bazální exprese *Arc* u QNP senzitivovaných zvířat ponechaných v chovných boxech (průměrně 28 % u QNP senzitivovaných potkanů oproti 5 % u kontrolních zvířat). Tento výsledek koresponduje s předchozími výsledky popisujícími hyperaktivitu OFC u QNP senzitivovaných zvířat (Asaoka et al., 2019). Hyperaktivita OFC byla nepřímo prokázána i studii lézí, kdy inhibice aktivity neuronů OFC pomocí cílených lézí snižuje cílenost záměrného chování, které je považováno za jednu ze složek kompulzivního kontrolování u QNP senzitivovaných potkanů (Dvorkin et al., 2010). Zvýšená bazální aktivita OFC byla popsána u pacientů s OCD během klidového měření metodou funkční magnetické rezonance, přičemž zvýšení aktivity OFC pozitivně korelovalo s celkovým skóre Y-BOCS pacienta (Hou et al., 2012). Monitoring bazální aktivity OFC u QNP senzitivovaných potkanů by tak mohlo sloužit jako potenciální platforma pro testování nových i stávajících léčiv užívaných k léčbě OCD.

Vzhledem k relativně nízkému zastoupení D2/D3 receptorů v OFC i ACC je pravděpodobné, že je aktivita obou těchto struktur ovlivněna QNP nepřímo, tj. vlivem vazby QNP na receptory D2/D3 jiné oblasti mozku (Landwehrmeyer et al., 1993; Richards et al., 2005) Jednou z těchto oblastí je zřejmě *nucleus accumbens*, které vykazuje výrazné zastoupení D2/D3 receptorů (Meador-Woodruff et al., 1989). *Nucleus accumbens* projikuje do OFC prostřednictvím mediodorzálního jádra thalamu (Ray & Price, 1993) a obsahuje i neuroanatomické spoje s ACC (Parkinson et al., 2000). Vliv aktivity *nucleus accumbens* na aktivitu OFC byl prokázán pomocí vysokofrekvenční stimulace *nucleus accumbens*, která vede k inhibici aktivity neuronů OFC (McCracken & Grace, 2007).

V souladu s našimi očekáváními naše výsledky neukazují signifikantní změny v **aktivitě MPC** u QNP senzitivovaných zvířat, což pozitivně přispívá ke konstrukční validitě modelu. Z Grafu 10 je patrné, že podíly *Arc* exprimujících neuronů jsou v případě QNP senzitivovaných i kontrolních zvířat srovnatelné. Nedostatek odborné literatury zabývající aktivitou MPC u quinpirolem senzitivovaných zvířat nám však neumožňuje přímé srovnání s předchozími výsledky. Jelikož byla role MPC dříve implikována



ve zprostředkování účinku lokomoci podněcujících psychostimulantů a zřejmě se účastní lokomoční senzitivace vyvolané opakovanou expozicí kokainu (Beyer & Steketee, 2000), usuzujeme, že mechanismus indukce lokomoční senzitivace probíhá v případě senzitivace QNP odlišným způsobem a nezahrnuje změny aktivity MPC.

**Limitací této studie** je poměrně malý počet analyzovaných vzorků pro jednotlivé struktury (průměrně  $n = 5$ ), jelikož část obarvených vzorků byla vyřazena kvůli nerovnoměrnému obarvení či slabému signálu. Toto omezení by mohlo být vyřešeno zdokonalením protokolu pro FISH. Další limitací této studie je poměrně malý počet jedinců ve studii ( $n = 24$ ), což snížilo naši schopnost detekovat vlivy o malé až střední velikosti účinku. Abychom byli schopni spolehlivě detekovat vlivy o malé až střední velikosti účinku, museli bychom počet jedinců ve studii navýšit minimálně na 34. Další omezení této studie je spojeno s využitím metody *Arc* FISH. Stanovení prahových hodnot pro detekci signálu vychází ze subjektivních zkušeností experimentátora a detekovaný signál se často nachází mimo detekovanou oblast jader neuronů, což může snižovat přesnost provedené analýzy.

## 10 ZÁVĚR

Obsedantně-kompulzivní porucha je rozšířená neuropsychiatrická porucha, jejíž léčba v současnosti není příliš úspěšná. Pro účel bližšího porozumění vzniku, patofyziologického průběhu a léčby tohoto onemocnění jsou využívány různé animální modely, přičemž jedním z dobře ustanovených animálních modelů OCD je model QNP indukovaného kompulzivního kontrolování. Přestože tento model vykazuje velmi dobrou fenomenologickou validitu, přesný mechanismus účinku senzitivace QNP není znám, což snižuje konstrukční validitu modelu. Za účelem ověření konstrukční validity modelu QNP indukovaného kompulzivního kontrolování proto byly vybrány dvě korové oblasti, jež byly v patofyziologii OCD implikovány (OFC, ACC) a jedna korová oblast, jež doposud v patofyziologii OCD implikována nebyla (MPC). Aktivita ACC, OFC a MPC během explorační obohaceného otevřeného pole byla měřena pomocí *FISH Arc*.

Na základě našich výsledků docházíme k následujícím závěrům:

- Chronická denní administrace quinpirolu v dávce 0,5 mg/kg vyvolává u potkanů behaviorální a lokomoční senzitivaci.
- **Preference jednotlivých zón obohaceného otevřeného pole QNP senzitivovanými potkany je stabilní v čase, přičemž frekvence návštěv home-base je několikanásobně vyšší než frekvence návštěv ostatních zón.**
- Aktivita ACC, MPC ani OFC u QNP senzitivovaných potkanů exploračních obohacené otevřené pole se signifikantně neliší od aktivity kontrolních zvířat.
- **Bazální aktivita OFC u QNP senzitivovaných potkanů je zvýšena oproti bazální aktivitě OFC kontrolních zvířat.**

Z našich výsledků usuzujeme, že animální model senzitivace quinpirolem je dobře definovaný a replikovatelný model kompulzivního kontrolování se silnou fenomenologickou validitou a z části potvrzenou konstrukční validitou, jelikož mechanismus účinku quinpirolu neprovází změny aktivity implikovaných mozkových struktur.

## 11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Albelda, N., & Joel, D. (2012). Animal models of obsessive-compulsive disorder: Exploring pharmacology and neural substrates. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Vol. 36, pp. 47–63. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.04.006>
- Arnold, P. D., Askland, K. D., Barlassina, C., Bellodi, L., Bienvenu, O. J., Black, D., ... Zai, G. (2018). Revealing the complex genetic architecture of obsessive-compulsive disorder using meta-analysis. *Molecular Psychiatry*, 23(5), 1181–1188. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.154>
- Asaoka, N., Nishitani, N., Kinoshita, H., Nagai, Y., Hatakama, H., Nagayasu, K., ... Kaneko, S. (2019). An Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Antagonist Improves Multiple Symptoms of Repeated Quinpirole-Induced Psychosis. *Eneuro*, 6(1). <https://doi.org/10.1523/eneuro.0366-18.2019>
- Atmaca, M., Yildirim, H., Ozdemir, H., Koc, M., Ozler, S., & Tezcan, E. (2009). Neurochemistry of the hippocampus in patients with obsessive-compulsive disorder: Regular article. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 63(4), 486–490. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2009.01993.x>
- Barot, S. K., Chung, A., Kim, J. J., & Bernstein, I. L. (2009). Functional imaging of stimulus convergence in amygdalar neurons during pavlovian fear conditioning. *PLoS ONE*, 4(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006156>
- Ben-Pazi, A., Szechtman, H., & Eilam, D. (2001). The morphogenesis of motor rituals in rats treated chronically with the dopamine agonist quinpirole. *Behavioral Neuroscience*, 115(6), 1301–1317. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.115.6.1301>
- Beninger, R. J., & Miller, R. (1998). Dopamine D1-like Receptors and Reward-related Incentive Learning. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22(2), 335–345. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(97\)00019-5](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(97)00019-5)
- Berthier, M. L., Kulisevsky, J., Gironell, A., & Heras, J. A. (1996). Obsessive-compulsive disorder associated with brain lesions: Clinical phenomenology, cognitive function, and anatomic correlates. *Neurology*, 47(2), 353–361. <https://doi.org/10.1212/WNL.47.2.353>
- Beyer, C. E., & Steketee, J. D. (2000). Intra-medial prefrontal cortex injection of quinpirole, but not SKF 38393, blocks the acute motor-stimulant response to cocaine in the rat. *Psychopharmacology*, 151(2–3), 211–218. <https://doi.org/10.1007/s002139900345>
- Bilder, R. M., Volavka, J., Lachman, H. M., & Grace, A. A. (2004). The catechol-O-methyltransferase polymorphism: Relations to the tonic-phasic dopamine hypothesis and neuropsychiatric phenotypes. *Neuropsychopharmacology*, 29(11), 1943–1961. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300542>
- Bloch, M. H., Landeros-Weisenberger, A., Rosario, M. C., Pittenger, C., & Leckman, J. F. (2008). Meta-analysis of the symptom structure of obsessive-compulsive disorder. *American Journal*

- of Psychiatry*, 165(12), 1532–1542. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.08020320>
- Bloomer, W. A. C., VanDongen, H. M. A., & VanDongen, A. M. J. (2008). Arc/Arg3.1 translation is controlled by convergent N-methyl-D-aspartate and Gs-coupled receptor signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 582–592. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702451200>
- Bokor, G., & Anderson, P. D. (2014). Obsessive-compulsive disorder. *Journal of Pharmacy Practice*, 27(2), 116–130. <https://doi.org/10.1177/0897190014521996>
- Bonelli, R. M., & Cummings, J. L. (2007). Frontal-Subcortical Circuitry and Behavior. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 141–151. <https://doi.org/10.1001/archneur.1993.00540080076020>
- Borcherding, B. G., Keysor, C. S., Rapoport, J. L., Elia, J., & Amass, J. (1990). Motor/vocal tics and compulsive behaviors on stimulant drugs: Is there a common vulnerability? *Psychiatry Research*, 33(1), 83–94. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(90\)90151-T](https://doi.org/10.1016/0165-1781(90)90151-T)
- Burguière, E., Monteiro, P., Feng, G., & Gr. (2013). Optogenetic Stimulation of Lateral Orbitofronto-Striatal Pathway Suppresses Compulsive Behaviors. *Science*, 340(6137), 1243–1246. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x>. Endothelial
- Carmin, C. N., Wiegartz, P. S., Yunus, U., & Gillock, K. L. (2002). Treatment of late-onset OCD following basal ganglia infarct. *Depression and Anxiety*, 15(2), 87–90. <https://doi.org/10.1002/da.10024>
- Carpenter, T. L., Pazdernik, T. L., & Levant, B. (2003). Differences in quinpirole-induced local cerebral glucose utilization between naive and sensitized rats. *Brain Research*, 964(2), 295–301. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04115-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04115-X)
- Cartwright, C., & Hollander, E. (1998). SSRIs in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *Depression and Anxiety*, 8 Suppl 1, 105–113. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1520-6394\(1998\)8:1+<105::aid-da16>3.3.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1520-6394(1998)8:1+<105::aid-da16>3.3.co;2-k)
- Casterano, L., Oliveri del Castillo, A., & Quagliariello, M. (1976). Selective activation of the mesocortical DA system by stress. *Nature*, 264, 161–164. <https://doi.org/10.1038/260170a0>
- Chamberlain, S. R., Menzies, L., Hampshire, A., Suckling, J., Fineberg, N. a, Campo, N., ... Sahakian, B. J. (2008). Orbitofrontal Dysfunction in Patients with Obsessive-Compulsive Disorder and Their Unaffected Relatives. *Science*, 228(July), 2006–2007.
- Chen, H.-T., Ruan, N.-Y., Chen, J.-C., & Lin, T.-Y. (2012). Dopamine D2 Receptor-Mediated AKT/PKB Signalling: Initiation by the D2S Receptor and Role in Quinpirole-Induced Behavioural Activation. *ASN Neuro*, 4(6), AN20120013. <https://doi.org/10.1042/AN20120013>
- Cheng, Y., Xu, J., Nie, B., Luo, C., Yang, T., Li, H., ... Xu, X. (2013). Abnormal Resting-State Activities and Functional Connectivities of the Anterior and the Posterior Cortexes in Medication-Naïve Patients with Obsessive-Compulsive Disorder. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067478>
- Chowdhury, S., Shepherd, J. D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R. S., Plath, N., ... Worley, P. F.

- (2006). Arc/Arg3.1 Interacts with the Endocytic Machinery to Regulate AMPA Receptor Trafficking. *Neuron*, 52(3), 445–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.033>
- Cole, A. J., Saffen, D. W., Baraban, J. M., & Worley, P. F. (1989). Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature*, 340(6233), 474–476. <https://doi.org/10.1038/340474a0>
- Cottraux, J., Gérard, D., Cinotti, L., Froment, J. C., Deiber, M. P., Le Bars, D., ... Mauguière, F. (1996). A controlled positron emission tomography study of obsessive and neutral auditory stimulation in obsessive-compulsive disorder with checking rituals. *Psychiatry Research*, 60(2–3), 101–112. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(96\)02697-2](https://doi.org/10.1016/0165-1781(96)02697-2)
- Cromer, K. R., Schmidt, N. B., & Murphy, D. L. (2007). An investigation of traumatic life events and obsessive-compulsive disorder. *Behaviour Research and Therapy*, 45(7), 1683–1691. <https://doi.org/10.1016/j.brat.2006.08.018>
- Dailly, E., Chenu, F., Renard, C. E., & Bourin, M. (2004). Dopamine, depression and antidepressants. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 18(6), 601–607. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2004.00287.x>
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889–909. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3)
- De Boer, P., & Abercrombie, E. J. (1996). Physiological release of striatal acetylcholine in vivo: modulation by D1 and D2 dopamine receptor subtypes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277, 775–783. Retrieved from <http://jpet.aspetjournals.org/content/277/2/775.abstract>
- De Haas, R., Nijdam, A., Westra, T. A., Kas, M. J. H., & Westenberg, H. G. M. (2011). Behavioral pattern analysis and dopamine release in quinpirole-induced repetitive behavior in rats. *Journal of Psychopharmacology*, 25(12), 1712–1719. <https://doi.org/10.1177/0269881110389093>
- De Mei, C., Ramos, M., Iitaka, C., & Borrelli, E. (2009). Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(1), 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.12.002>
- Deary, a, Gingrich, J. a, Falardeau, P., Fremeau Jr., R. T., Bates, M. D., & Caron, M. G. (1990). Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature*, Vol. 347, pp. 72–76. <https://doi.org/10.1038/347072a0>
- Denys, D., de Vries, F., Cath, D., Figee, M., Vulink, N., Veltman, D. J., ... van Berckel, B. N. M. (2013). Dopaminergic activity in Tourette syndrome and obsessive-compulsive disorder. *European Neuropsychopharmacology*, 23(11), 1423–1431. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.05.012>
- Denys, D., Van Der Wee, N., Janssen, J., De Geus, F., & Westenberg, H. G. M. (2004). Low level of dopaminergic D2receptor binding in obsessive-compulsive disorder. *Biological Psychiatry*,

- 55(10), 1041–1045. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2004.01.023>
- Desgranges, B., Ramirez-Amaya, V., Ricaño-Cornejo, I., Lévy, F., & Ferreira, G. (2010). Flavor preference learning increases olfactory and gustatory convergence onto single neurons in the basolateral amygdala but not in the insular cortex in rats. *PLoS ONE*, *5*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010097>
- Di Chiara, G., & Bassareo, V. (2007). Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Current Opinion in Pharmacology*, *7*(1), 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.11.003>
- Dillon, C., & Goda, Y. (2005). THE ACTIN CYTOSKELETON: Integrating Form and Function at the Synapse. *Annual Review of Neuroscience*, *28*(1), 25–55. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135757>
- Durieux, P. F., Bearzatto, B., Guiducci, S., Buch, T., Waisman, A., Zoli, M., ... De Kerchove D'Exaerde, A. (2009). D<sup>2</sup>R striatopallidal neurons inhibit both locomotor and drug reward processes. *Nature Neuroscience*, *12*(4), 393–395. <https://doi.org/10.1038/nn.2286>
- Dvorkin, A., Perreault, M. L., & Szechtman, H. (2006). Development and temporal organization of compulsive checking induced by repeated injections of the dopamine agonist quinpirole in an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Behavioural Brain Research*, *169*(2), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.024>
- Dvorkin, A., Silva, C., McMurrin, T., Bisnaire, L., Foster, J., & Szechtman, H. (2010). Features of compulsive checking behavior mediated by nucleus accumbens and orbital frontal cortex. *European Journal of Neuroscience*, *32*(9), 1552–1563. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07398.x>
- Eddy, K. T., Dutra, L., Bradley, R., & Westen, D. (2004). A multidimensional meta-analysis of psychotherapy and pharmacotherapy for obsessive-compulsive disorder. *Clinical Psychology Review*, *24*(8), 1011–1030. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2004.08.004>
- Eilam, D., & Szechtman, H. (1989). Biphasic effect of D-2 agonist quinpirole on locomotion and movements. *European Journal of Pharmacology*, *161*(2–3), 151–157. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(89\)90837-6](https://doi.org/10.1016/0014-2999(89)90837-6)
- Eilam, D., Zor, R., Fineberg, N., & Hermesh, H. (2012). Animal behavior as a conceptual framework for the study of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Behavioural Brain Research*, *231*(2), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.06.033>
- Eisen, J. L., Sibrava, N. J., Boisseau, C. L., Mancebo, M. C., Stout, R. L., Pinto, A., & Rasmussen, S. A. (2013). Five-year course of obsessive-compulsive disorder: Predictors of remission and relapse. *Journal of Clinical Psychiatry*, *74*(3), 233–239. <https://doi.org/10.4088/JCP.12m07657>
- Féger, J., & Robledo, P. (1991). The Effects of Activation or Inhibition of the Subthalamic Nucleus on the Metabolic and Electrophysiological Activities Within the Pallidal Complex and

- Substantia Nigra in the Rat. *European Journal of Neuroscience*, 3(10), 947–952.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1991.tb00030.x>
- Gallick Whitaker, N. G., & Lindstrom, T. D. (1987). Disposition and Biotransformation of Quinpirole, a New Dog, and Monkeys in Mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 15(1).
- Geyer, M. A., & Markou, A. (2000). Animal Models of Psychiatric Disorders. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, (January).
- Goodman, W. K., McDougle, C. J., Price, L. H., Riddle, M. A., Pauls, D. L., & Leckman, J. F. (1990). Beyond the serotonin hypothesis: A role for dopamine in some forms of obsessive compulsive disorder? *The Journal of Clinical Psychiatry*, 51, 36–43.
- Goodman, Wayne K., Price, L. H., Rasmussen, S. A., Mazure, C., Fleischmann, R. L., & Hill, C. L. (1989). The Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale. *Arch Gen Psychiatry*, 46, 1006–1011.
- Graybiel, A. M. (1990). *Neurotransmitters and modulators of the basal ganglia*. 13(7).
- Gudelsky, G. A. (1981). Tuberoinfundibular dopamine neurons and the regulation of prolactin secretion. *Psychoneuroendocrinology*, 6(1), 3–16. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(81\)90044-5](https://doi.org/10.1016/0306-4530(81)90044-5)
- Guzowski, J. F., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., & Worley, P. F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/16046>
- Guzowski, J. F., Timlin, J. A., Roysam, B., McNaughton, B. L., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2005). Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(5), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.08.018>
- Guzowski, J. F., & Worley, P. F. (2001). Cellular Compartment Analysis of Temporal Activity by Fluorescence In Situ Hybridization (catFISH). In *Current Protocols in Neuroscience*. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0108s15>
- Hagan, R. M., Kilpatrick, G. J., & Tyers, M. B. (1993). Interactions between 5-HT<sub>3</sub> receptors and cerebral dopamine function: implications for the treatment of schizophrenia and psychoactive substance abuse. *Psychopharmacology*, 112(1 Supplement), 68–75. <https://doi.org/10.1007/BF02245009>
- Hollander, E., Bienstock, C. A., Koran, L. M., Pallanti, S., Marazziti, D., Rasmussen, S. A., ... Zohar, J. (2002). Refractory obsessive-compulsive disorder: state-of-the-art treatment. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 63 Suppl 6, 20–29. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/12027116>
- Hollander, E., Stein, D. J., Kwon, J. H., Rowland, C., Wong, C. M., Broatch, J., & Himelein, C. (1998). Psychosocial Function and Economic Costs of Obsessive-Compulsive Disorder. *CNS Spectrums*, 3(S1), 48–58. <https://doi.org/10.1017/S1092852900007239>
- Hou, J., Wu, W., Lin, Y., Wang, J., Zhou, D., Guo, J., ... Li, H. (2012). Localization of cerebral

- functional deficits in patients with obsessive-compulsive disorder: A resting-state fMRI study. *Journal of Affective Disorders*, 138(3), 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2012.01.022>
- Howes, O. D., Kambeitz, J., Kim, E., Stahl, D., Slifstein, M., Abi-Dargham, A., & Kapur, S. (2012). The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment: Meta-analysis of imaging studies. *Archives of General Psychiatry*, 69(8), 776–786. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2012.169>
- Huang, J. J., Yen, C. T., Liu, T. L., Tsao, H. W., Hsu, J. W., & Tsai, M. L. (2013). Effects of dopamine D2 agonist quinpirole on neuronal activity of anterior cingulate cortex and striatum in rats. *Psychopharmacology*, 227(3), 459–466. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-2965-4>
- Jahanshahi, M., Obeso, I., Rothwell, J. C., & Obeso, J. A. (2015). A fronto-striato-subthalamic-pallidal network for goal-directed and habitual inhibition. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(12), 719–732. <https://doi.org/10.1038/nrn4038>
- Jonckers, E., Shah, D., Hamaide, J., Verhoye, M., & Van der Linden, A. (2015). The power of using functional fMRI on small rodents to study brain pharmacology and disease. *Frontiers in Pharmacology*, 6(OCT), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00231>
- Kalra, S. K., Swedo, S. E., Kalra, S. K., & Swedo, S. E. (2009). *Children with obsessive-compulsive disorder : are they just “ little adults ”?* 119(4), 737–746. <https://doi.org/10.1172/JCI37563>
- Kebabian, J. W., & Greengard, P. (1971). Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: Possible role in synaptic transmission. *Science*, 174(4016), 1346–1349. <https://doi.org/10.1126/science.174.4016.1346>
- Kim, J., Lee, M. C., Kim, J., Kim, I. N. Y., Kim, S. U. N. I., & Han, M. H. E. E. (2001). Grey matter abnormalities in obsessive — compulsive disorder : Statistical parametric mapping of segmented magnetic resonance images. *British Journal of Psychiatry*, 179, 330–334. <https://doi.org/10.1192/bjp.179.4.330>
- Klanker, M., Feenstra, M., & Denys, D. (2013). Dopaminergic control of cognitive flexibility in humans and animals. *Frontiers in Neuroscience*, 7(7 NOV), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00201>
- Koran, L. M. (2000). Quality of life in obsessive compulsive disorder. *The Psychiatric Clinics of North America*, 23(3).
- Kubik, S., Miyashita, T., & Guzowski, J. F. (2007). Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learning and Memory*, 14(11), 758–770. <https://doi.org/10.1101/lm.698107>
- Landwehrmeyer, B., Mengod, G., & Palacios, J. M. (1993). Differential visualization of dopamine D2 and D3 receptor sites in rat brain. A comparative study using in situ hybridization histochemistry and ligand binding autoradiography. *The European Journal of Neuroscience*, 5(October 1992), 145–153.



- Loebrich, S., & Nedivi, E. (2009). The Function of Activity-Regulated Genes in the Nervous System. *Physiological Reviews*, 89(4), 1079–1103. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2009>
- Lopes, A. C., de Mathis, M. E., Canteras, M. M., Salvajoli, J. V., Del Porto, J. A., & Miguel, E. C. (2004). [Update on neurosurgical treatment for obsessive compulsive disorder]. *Revista Brasileira de Psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)*, 26(1), 62–66.
- Lundberg, S., Carlsson, A., Norfeldt, P., & Carlsson, M. L. (2004). Nicotine treatment of obsessive-compulsive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(7), 1195–1199. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.06.014>
- Mataix-Cols, D., Conceição do Rosario-Campos, M., & Leckman, J. F. (2005). A Multidimensional Model of Obsessive-Compulsive Disorder. *Am J Psychiatry*, 162(2).
- Mataix-Cols, D., Marks, I. M., Greist, J. H., Kobak, K. A., & Baer, L. (2002). Obsessive-compulsive symptom dimensions as predictors of compliance with and response to behaviour therapy: Results from a controlled trial. *Psychotherapy and Psychosomatics*, 71(5), 255–262. <https://doi.org/10.1159/000064812>
- Mataix-Cols, D., Rauch, S. L., Manzo, P. A., Jenike, M. A., & Baer, L. (1999). Use of factor-analyzed symptom dimensions to predict outcome with serotonin reuptake inhibitors and placebo in the treatment of obsessive-compulsive disorder. *American Journal of Psychiatry*, 156(9), 1409–1416. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.9.1409>
- Mataix-Cols, D., Wooderson, S., Lawrence, N., Brammer, M. J., Speckens, A., & Phillips, M. L. (2004). Distinct Neural Correlates of Washing, Checking, and Hoarding Symptom Dimensions in Obsessive-compulsive Disorder. *Archives of General Psychiatry*, 61(6), 564. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.61.6.564>
- McCracken, C. B., & Grace, A. A. (2007). High-Frequency Deep Brain Stimulation of the Nucleus Accumbens Region Suppresses Neuronal Activity and Selectively Modulates Afferent Drive in Rat Orbitofrontal Cortex In Vivo. *Journal of Neuroscience*, 27(46), 12601–12610. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3750-07.2007>
- McGuire, P. K., Bench, C. J., Frith, C. D., Marks, I. M., Frackowiak, R. S. J., & Dolan, R. J. (1994). Functional Anatomy of Obsessive-Compulsive Phenomena. *British Journal of Psychiatry*, 164, 459–468.
- McKinney, W. T. (2012). *Models of Mental Disorders: A New Comparative Psychiatry*. Springer Science & Business Media.
- Meador-Woodruff, J. H., Mansour, a, Grandy, D. K., Damask, S. P., Civelli, O., & Watson, S. J. (1992). Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neuroscience Letters*, 145(2), 209–212.
- Meador-Woodruff, J. H., Mansour, A., Bunzow, J. R., Van Tol, H. H., Watson Jr., S. J., & Civelli, O. (1989). Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S*

- A*, 86(19), 7625–7628. <https://doi.org/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10723008>
- Meador-Woodruff, J. H., Mansour, A., Healy, D. J., Kuehn, R., Zhou, Q. Y., Bunzow, J. R., ... Watson, S. J. (1991). Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 5(4), 231–242.
- Mell, L. K., Davis, R. L., & Owens, D. (2005). Association Between Streptococcal Infection and Obsessive-Compulsive Disorder, Tourette's Syndrome, and Tic Disorder. *Pediatrics*, 116(1), 56–60. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-2058>
- Menzies, L., Chamberlain, S. R., Laird, A. R., Thelen, S. M., Sahakian, B. J., & Bullmore, E. T. (2010). Integrating evidence from neuroimaging and neuropsychological studies of obsessive-compulsive disorder: The orbitofronto- striatal model revisited. *Neurosci Biobehav Rev*, 32(3), 525–549. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.09.005>.Integrating
- Milad, M. R., Furtak, S. C., Greenberg, J. L., Keshaviah, A., Im, J. J., Falkenstein, M. J., ... Wilhelm, S. (2013). Deficits in conditioned fear extinction in obsessive-compulsive disorder and neurobiological changes in the fear circuit. *JAMA Psychiatry*, 70(6), 608–618. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.914>
- Milad, M. R., Rauch, S. L., & Hospital, M. G. (2012). Obsessive Compulsive Disorder: Beyond Segregated Cortico- striatal Pathways. *Trends Cogn Sci*, 16(1), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2011.11.003>.Obsessive
- Min-Seong, K., Eun-Ju, K., Daeyoung, R., & Chan-Hyung, K. (2010). TRole of dopamine in the pathophysiology and treatment of obsessive–compulsive disorder. *Expert Reviews*, 10(2), 275–290. <https://doi.org/10.1097/00004850-199206001-00009>
- Missale, C., Nash, R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol. Rev.*, 78(1), 189–225.
- Modell, J. G., Mountz, J. M., Curtis, G. C., & Greden, J. F. (1989). Neurophysiologic dysfunction in basal ganglia/limbic striatal and thalamocortical circuits as a pathogenetic mechanism of obsessive-compulsive disorder. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 1(1), 27–36. <https://doi.org/10.1176/jnp.1.1.27>
- Montag-sallaz, M., & Montag, D. (2003). Learning-Induced arg3.1/arc mRNA expression in the mouse brain. *Learning & Memory*. <https://doi.org/10.1101/lm.53403.man>
- Moreira, P. S., Marques, P., Soriano-Mas, C., Magalhães, R., Sousa, N., Soares, J. M., & Morgado, P. (2017). The neural correlates of obsessive-compulsive disorder: a multimodal perspective. *Translational Psychiatry*, 7(8), e1224. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.189>
- Morris, L. S., Kundu, P., Dowell, N., Mechelmans, D. J., Favre, P., Irvine, M. A., ... Voon, V. (2015). Fronto-striatal organization : Defining functional and microstructural substrates of behavioural flexibility. *CORTEX*, 74, 118–133. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2015.11.004>

- Mundt, A., Klein, J., Joel, D., Heinz, A., Djodari-Irani, A., Harnack, D., ... Winter, C. (2009). High-frequency stimulation of the nucleus accumbens core and shell reduces quinpirole-induced compulsive checking in rats. *European Journal of Neuroscience*, 29(12), 2401–2412. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06777.x>
- Nakao, T., Nakagawa, A., Yoshiura, T., Nakatani, E., Nabeyama, M., Yoshizato, C., ... Kanba, S. (2005). Brain activation of patients with obsessive-compulsive disorder during neuropsychological and symptom provocation tasks before and after symptom improvement: A functional magnetic resonance imaging study. *Biological Psychiatry*, 57(8), 901–910. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.12.039>
- Neve, K. A. (2010). The Dopamine receptors. In *Springer Science+Business Media*.
- Norman, L. J., Carlisi, C., Lukito, S., Hart, H., Mataix-Cols, D., Radua, J., & Rubia, K. (2016). Structural and functional brain abnormalities in attention-deficit/hyperactivity disorder and obsessive-compulsive disorder: A comparative meta-analysis. *JAMA Psychiatry*, 73(8), 815–825. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2016.0700>
- Ogai, M., Iyo, M., Mori, N., & Takei, N. (2005). A right orbitofrontal region and OCD symptoms: A case report. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 111(1), 74–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2004.00395.x>
- Pallanti, S., Grassi, G., Sarrecchia, E. D., Cantisani, A., & Pellegrini, M. (2011). Obsessive-compulsive disorder comorbidity: Clinical assessment and therapeutic implications. *Frontiers in Psychiatry*, 2(DEC), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2011.00070>
- Parent, A., Paré, D., Smith, Y., & Steriade, M. (1988). Basal forebrain cholinergic and noncholinergic projections to the thalamus and brainstem in cats and monkeys. *Journal of Comparative Neurology*, 277(2), 281–301. <https://doi.org/10.1002/cne.902770209>
- Parkinson, J. A., Willoughby, P. J., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2000). Disconnection of the anterior cingulate cortex and nucleus accumbens core impairs pavlovian approach behavior: Further evidence for limbic cortical-ventral striatopallidal systems. *Behavioral Neuroscience*, 114(1), 42–63. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.114.1.42>
- Pauls, D. L., Towbin, K. E., Leckman, J. F., Zahner, G. E., & Cohen, D. J. (1986). Gilles de la Tourette's Syndrome and Obsessive-Compulsive Disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 43.
- Perani, D., Colombo, C., Bressi, S., Bonfanti, A., Grassi, F., Scarone, S., ... Fazio, F. (1995). [18F]FDG PET Study in Obsessive-Compulsive Disorder. *British Journal of Psychiatry*, 166(02), 244–250. <https://doi.org/10.1192/bjp.166.2.244>
- Perani, D., Garibotto, V., Gorini, A., Moresco, R. M., Henin, M., Panzacchi, A., ... Fazio, F. (2008). In vivo PET study of 5HT2A serotonin and D2 dopamine dysfunction in drug-naive obsessive-compulsive disorder. *NeuroImage*, 42(1), 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.04.233>

- Pitman, R. K. (1989). Animal models of compulsive behavior. *Biol Psychiatry*, 26(2), 189–198.
- Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M. L., Schmitz, D., Gross, C., ... Kuhl, D. (2006). Arc/Arg3.1 Is Essential for the Consolidation of Synaptic Plasticity and Memories. *Neuron*, 52(3), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.024>
- Primus, R. J., Thurkauf, A., Xu, J., Yevich, E., McInerney, S., Shaw, K., ... Gallager, D. W. (1997). Localization and characterization of dopamine D 4 binding sites in rat and human brain by use of the novel, D 4 receptor-selective ligand [ 3 H]NGD 94-1 .2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282(2), 1020–1027.
- Ramirez-Amaya, V. (2005). Spatial Exploration-Induced Arc mRNA and Protein Expression: Evidence for Selective, Network-Specific Reactivation. *Journal of Neuroscience*, 25(7), 1761–1768. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4342-04.2005>
- Rao, V. R., Pintchovski, S. A., Chin, J., Peebles, C. L., Mitra, S., & Finkbeiner, S. (2006). AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene Arc. *Nature Neuroscience*, 9(7), 887–895. <https://doi.org/10.1038/nn1708>
- Rauch, S. L., Dougherty, D. D., & Shin, L. M. (1998). Neural correlates of factor-analyzed OCD symptom dimensions: A PET study. *CNS Spectrums*. <https://doi.org/10.1017/S1092852900006167>
- Rauch, S. L., Jenike, M. A., Alpert, N. M., Baer, L., Breiter, H. C., Savage, C. R., & Fischman, A. J. (1994). Regional Cerebral Blood Flow Measured During Symptom Provocation in Obsessive-Compulsive and Positron Emission Tomography. *Arch Gen Psychiatry*, 51, 62–70.
- Ray, J. P., & Price, J. L. (1993). The organization of projections from the mediodorsal nucleus of the thalamus to orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys - Ray - 2004 - The Journal of Comparative Neurology - Wiley Online Library. *J.Comp Neurol.*, 337(1), 1–31.
- Richards, T. L., Pazdernik, T. L., & Levant, B. (2005). Altered quinpirole-induced local cerebral glucose utilization in anterior cortical regions in rats after sensitization to quinpirole. *Brain Research*, 1042(1), 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.02.013>
- Robbins, T. W. (2000). Chemical neuromodulation of frontal-executive functions in humans and other animals. *Experimental Brain Research*, 133, 130–138.
- Rotge, J.-Y., Guehl, D., Dilharreguy, B., Cuny, E., Tignol, J., Bioulac, B., ... Aouizerate, B. (2008). Provocation of obsessive-compulsive symptoms: a quantitative voxel-based meta-analysis of functional neuroimaging studies. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 33(5), 405–412.
- Rufer, M., Grothusen, A., Maß, R., Peter, H., & Hand, I. (2005). Temporal stability of symptom dimensions in adult patients with obsessive-compulsive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 88(1), 99–102. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2005.06.003>
- Ruscio, A. M., Stein, D. J., Chiu, W. T., & Kessler, R. C. (2010). The epidemiology of obsessive-compulsive disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Molecular Psychiatry*,

- 15(1), 53–63. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.94>
- Saxena, S., Bota, R. G., & Brody, A. L. (2001). Brain-behavior relationships in obsessive-compulsive disorder. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry*, 6(2), 82–101. <https://doi.org/10.1053/scnp.2001.21833>
- Scahill, L., Riddle, M. A., McSwiggin-Hardin, M., Ort, S. I., King, R. A., Goodman, W. K., ... Leckman, J. F. (1997). Children's Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale: Reliability and validity. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 36(6), 844–852. <https://doi.org/10.1097/00004583-199706000-00023>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Servaes, S., Glorie, D., Verhaeghe, J., Wyffels, L., Stroobants, S., & Staelens, S. (2016). [18F]-FDG PET neuroimaging in rats with quinpirole-induced checking behavior as a model for obsessive compulsive disorder. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 257, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2016.10.003>
- Simpson, S., & Baldwin, B. (1995). Neuropsychiatry and SPECT of an acute obsessive-compulsive syndrome patient. *British Journal of Psychiatry*, 166(MAR.), 390–392.
- Skirboll, L. R., Grace, A. A., & Bunney, B. S. (1979). Dopamine Auto- and Postsynaptic Receptors: Electrophysiological Evidence for Differential Sensitivity to Dopamine Agonists. *Science*, 206(October), 80–82.
- Steward, O., Wallace, C. S., Lyford, G. L., & Worley, P. F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the leg Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*, 21(4), 741–751. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80591-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80591-7)
- Steward, O., & Worley, P. F. (2001). Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron*, 30(1), 227–240. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00275-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00275-6)
- Subramaniam, M., Abdin, E., Vaingankar, J. A., & Chong, S. A. (2012). Obsessive-compulsive disorder: Prevalence, correlates, help-seeking and quality of life in a multiracial Asian population. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*. <https://doi.org/10.1007/s00127-012-0507-8>
- Szechtman, H., Ahmari, S. E., Beninger, R. J., Eilam, D., Brian, H., Edemann-callesen, H., ... Psychiatrie, E. (2017). Obsessive-compulsive disorder: Insights from animal models. *Neurosci Biobehav Rev*, 76, 254–279. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.04.019> Obsessive-compulsive
- Szechtman, H., Eckert, M. J., Tse, W. S., Boersma, J. T., Bonura, C. A., McClelland, J. Z., ... Eilman, D. (2001). Compulsive checking behavior of quinpirole-sensitized rats as an animal model Obsessive-Compulsive Disorder(OCD): Form and control. *BMC Neuroscience*.

- <https://doi.org/10.1186/1471-2202-2-4>
- Szechtman, H., Sulis, W., & Eilam, D. (1998). Quinpirole induces compulsive checking behavior in rats: A potential animal model of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Behavioral Neuroscience*, *112*(6), 1475–1485. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.112.6.1475>
- Szeszko, P. R., MacMillan, S., McMeniman, M., Chen, S., Baribault, K., Lim, K. O., ... Rosenberg, D. R. (2004). Brain structural abnormalities in psychotropic drug-naïve pediatric patients with obsessive-compulsive disorder. *The American Journal of Psychiatry*, *161*(6), 1049–1056. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.6.1049>
- Szumliński, K. K., Allan, M., Talangbayan, H., Tracey, A., & Szechtman, H. (1997). Locomotor sensitization to quinpirole: Environment-modulated increase in efficacy and context-dependent increase in potency. *Psychopharmacology*, *134*(2), 193–200. <https://doi.org/10.1007/s002130050442>
- Tekin, S., & Cummings, J. L. (2002). Frontal-subcortical neuronal circuits and clinical neuropsychiatry: An update. *Journal of Psychosomatic Research*, *53*(2), 647–654. [https://doi.org/10.1016/S0022-3999\(02\)00428-2](https://doi.org/10.1016/S0022-3999(02)00428-2)
- Thorsen, A. L., de Wit, S. J., de Vries, F. E., Cath, D. C., Veltman, D. J., van der Werf, Y. D., ... van den Heuvel, O. A. (2018). Emotion Regulation in Obsessive-Compulsive Disorder, Unaffected Siblings, and Unrelated Healthy Control Participants. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2018.03.007>
- Ting, J. T., & Feng, G. (2011). Neurobiology of obsessive-compulsive disorder: Insights into neural circuitry dysfunction through mouse genetics. *Current Opinion in Neurobiology*, *21*(6), 842–848. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.04.010>
- Torres, A. R., Ramos-Cerqueira, A. T. A., Ferrão, Y. A., Fontenelle, L. F., Do Rosário, M. C., & Miguel, E. C. (2011). Suicidality in obsessive-compulsive disorder: Prevalence and relation to symptom dimensions and comorbid conditions. *Journal of Clinical Psychiatry*, *72*(1), 17–26. <https://doi.org/10.4088/JCP.09m05651blu>
- Van Den Heuvel, O. A., Remijnse, P. L., Mataix-Cols, D., Vrenken, H., Groenewegen, H. J., Uylings, H. B. M., ... Veltman, D. J. (2009). The major symptom dimensions of obsessive-compulsive disorder are mediated by partially distinct neural systems. *Brain*, *132*(4), 853–868. <https://doi.org/10.1093/brain/awn267>
- Vazdarjanova, A., McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Worley, P. F., & Guzowski, J. F. (2002). Experience-dependent coincident expression of the effector immediate-early genes *arc* and *Homer 1a* in hippocampal and neocortical neuronal networks. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(23), 10067–10071. <https://doi.org/22/23/10067> [pii]
- Wall, N. R., DeLaParra, M., Callaway, E. M., & Kreitzer, A. C. (2013). Differential innervation of

- direct- and indirect-pathway striatal projection neurons. *Neuron*, 79(2), 347–360.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.014>
- Whiteside, S. P., Port, J. D., & Abramowitz, J. S. (2004). A meta-analysis of functional neuroimaging in obsessive-compulsive disorder. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 132(1), 69–79.  
<https://doi.org/10.1016/j.psychres.2004.07.001>
- Winter, C., Mundt, A., Jalali, R., Joel, D., Harnack, D., Morgenstern, R., ... Kupsch, A. (2008). High frequency stimulation and temporary inactivation of the subthalamic nucleus reduce quinpirole-induced compulsive checking behavior in rats. *Experimental Neurology*, 210(1), 217–228.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.020>
- World Health Organization. (1993). *ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders (The): Diagnostic Criteria for Research*.
- Wu, M., Brudzynski, S. M., & Mogenson, G. J. (1993). Functional interaction of dopamine and glutamate in the nucleus accumbens in regulation of locomotion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 71.
- Yilmaz-Rastoder, E., Miyamae, T., Braun, A. E., & Thiels, E. (2011). LTP- and LTD-inducing stimulations cause opposite changes in Arc/Arg3.1 mRNA level in hippocampal area CA1 in vivo. *Hippocampus*, 21(12), 1290–1301. <https://doi.org/doi:10.1002/hipo.20838>
- Ying, S. W., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M. J., Hunt, S. P., Bliss, T. V., & Bramham, C. R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CRREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci.*, 22(5), 1532–1540.
- Zhang, W., Yamada, M., Gomez, J., Basile, A. S., & Rgen Wess, J. (2002). Multiple Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtypes Modulate Striatal Dopamine Release, as Studied with M1 – M5 Muscarinic Receptor Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), 6347–6352.  
<https://doi.org/20026644>
- Zohar, A. H. (1999). The Epidemiology of Obsessive-Compulsive Disorder in Children and Adolescents. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics*, 8(3), 445–460.  
[https://doi.org/10.1016/S1056-4993\(18\)30163-9](https://doi.org/10.1016/S1056-4993(18)30163-9)