Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů

Bc. Markéta Jirásková

Využití tryptofanové deplece ve studiu mechanismu účinku psychofarmak

The use of tryptophan depletion in the study of the mechanism of action of psychopharmaceuticals

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Karel Valeš, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

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

V Praze, dne 3. 1. 2022

……

Bc. Markéta Jirásková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především svému školiteli, RNDr. Karlu Valešovi, Ph.D. a konzultantce PhDr. et. RNDr. Tereze Nekovářové, Ph.D. za jejich čas, vstřícný a trpělivý přístup, odborné rady i připomínky při sepisování diplomové práce. Velké díky patří Mgr. Kateřině Englerové, Karle Třeškové a Ing. Vendule Lipšové, jejichž pomoci a společnosti při prováděných experimentech si velmi vážím. Dále děkuji všem členům laboratoře za přátelské pracovní prostředí, zejména Mgr. Čestmíru Vejmolovi. Děkuji také Davidu Kačerovi a jeho kolegům, že promptně zpracovali biochemickou analýzu tkání. Za podporu vděčím svým blízkým, jmenovitě kamarádu Bc. Danielu Schillovi. V neposlední řadě bych zde chtěla poděkovat i všem laboratorním zvířatům, která místo nás trpí a umírají na oltáři lidského pokroku a poznání.

Abstrakt

Tryptofanová deplece je široce využívaná nefarmakologická neinvazivní metoda, která se uplatňuje především při zkoumání úlohy serotoninu (5-hydroxytryptaminu, 5-HT) u lidí i zvířat. Metoda využívá možnosti manipulovat biologickou dostupnost esenciální aminokyseliny L-Tryptofanu (L-TRP, tryptofanu), který se, jakožto prekurzor serotoninu, účastní v regulaci mnoha fyziologických procesů organismu a, *inter alia*, i v patologii a patofyziologii různých neuropsychiatrických poruch a onemocnění. Přestože je metoda tryptofanové deplece notně využívána, přesný mechanismus stojící za výslednými behaviorálními změnami není dosud zcela objasněn. Rovněž není dostatečně prozkoumána využitelnost této metody při koaplikaci farmak.

Tato práce se zabývá nejčastěji diskutovanými mechanismy tryptofanové deplece. Dále zkoumá biochemický a behaviorální dopad koadministrace nízkých dávek (0,1 mg/kg a 0,15 mg/kg) dizocilpinu (MK-801) při tryptofanové depleci. V neposlední řadě ověřuje účinek aplikace allopregnanolonu a takrinu na tuto koaplikaci.

Výsledky této práce ukazují, že akutní tryptofanová deplece s předchozím hladověním, na rozdíl od chronické, způsobila hypolokomoční a anxiózní chování. A to i navzdory nezměněným hladinám serotoninu v hipokampu. Také bylo reflektováno, že v závislosti na dávce MK-801 jsou behaviorální projevy tryptofanové deplece stírány. Dizocilpin působil hyperlokomočně, anxiolyticky a narušil úlekovou reakci. Tyto behaviorální parametry, signifikantně anxieta, byly normalizovány po aplikaci takrinu (0,1 mg/kg) i allopregnanolonu (0,1 mg/kg), bez signifikantního vlivu na hyperlokomoci i úlekovou reakci.

Klíčová slova: tryptofanová deplece, animální model, schizofrenie, psychofarmaka, behaviorální farmakologie

Abstract

Tryptophan depletion is a non-pharmacological and non-invasive method extensively used to investigate the role of serotonin (5-hydroxytryptamine in humans and animals. The method is based on reducing the availability of the essential amino acid tryptophan, the dietary serotonin precursor. As a precursor of serotonin, L-Tryptophan has a key role in the regulation of many physiological processes and, *inter alia*, in the pathology and pathophysiology of neuropsychiatric disorders and diseases. Despite the fact, that the method of tryptophan depletion has been applied in many experimental studies, the exact mechanism, by which tryptophan depletion inducted neurophysiological effects, remain unclear. Also, the protentional use of this method together with other drug coadministration has not been explored in detail yet.

In this thesis, the most possible mechanisms of tryptophan depletion are discussed. Biochemical and behavioural effects of low dose of dizocilpine (0.1 mg/kg and 0.15 mg/kg) in animal model of tryptophan depletion are investigated as well. And finally, effects of administration of allopregnanolone and tacrine in model of tryptophan depletion with coadministration of MK-801 are studied.

The results show that acute tryptophan depletion with prior starvation, not chronic depletion, caused hypolocomotion and anxiolytic behaviour, but any method did not cause a significant reduction of 5-TH in hippocampus. MK-801 dose-dependent reverted the behavioural manifestations of tryptophan depletion. Dizocilpine increased hyperlocomotion, decreased anxiety and disrupted PPI. These behavioural parameters, significantly anxiety, were normalized after treatment with both allopregnanolone (0.1 mg/kg) and tacrine (0.1 mg/kg). However, there was no significant effect on hyperlocomotion and PPI.

Key words: tryptophan depletion, animal model, schizophrenia, psychopharmacology, behavioural pharmacology

Obsah

2. Úvod ..... - 13 -

3. Literární přehled ..... - 14 -

3.1. Metabolismus tryptofanu ..... - 14 -

3.1.1. Tryptofan ..... - 14 -

3.1.2. Serotonin ..... - 16 -

3.2. Další mechanismy tryptofanové deplece ..... - 20 -

3.2.1. Zánětlivé procesy centrální nervové soustavy ..... - 21 -

3.2.2. Stresový faktor ..... - 21 -

3.2.2.1. Hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osa ..... - 23 -

3.2.2.2. Osa renin-angiotenzin-aldosteron ..... - 23 -

3.2.2.3. Metabolizace energetických rezerv ..... - 24 -

3.2.3. Spánková deprivace ..... - 26 -

3.2.4. Mikrobiom ..... - 26 -

3.2.5. Cerebrovaskulární změny ..... - 29 -

3.2.6. Syntáza oxidu dusnatého ..... - 29 -

3.3. Tryptofanová deplece v animálních studiích ..... - 31 -

3.3.1. Animální modely ..... - 31 -

3.3.2. Metody navození tryptofanové deplece ..... - 32 -

3.3.3. Biochemická validita animálních modelů tryptofanové deplece ..... - 34 -

3.3.4. Behaviorální validita animálních modelů tryptofanové deplece ..... - 35 -

3.4. Tryptofanová deplece v humánních studiích ..... - 36 -

3.5. Tryptofanová deplece a koaplikace farmak ..... - 37 -

3.5.1. Dizocilpin ..... - 38 -
3.6. Terapeutické využití tryptofanové deplece ..... - 39 -
3.6.1. Neurosteroidy ..... - 40 -
3.6.2. Takrin ..... - 41 -
4. Cíle a hypotézy diplomové práce ..... - 42 -
5. Materiál a metody ..... - 43 -
5.1. Použitá zvířata ..... - 43 -
5.2. Použité látky ..... - 43 -
5.3. Metodické postupy ..... - 44 -
5.3.1. Zavedení tryptofanové deplece ..... - 44 -
5.3.1.1. Akutní ..... - 44 -
5.3.1.2. Chronická ..... - 44 -
5.3.2. Behaviorální testy ..... - 45 -
5.3.2.1. Open field ..... - 45 -
5.3.2.2. Vyvýšené křížové bludiště ..... - 45 -
5.3.2.3. Novel object recognition task/location task ..... - 46 -
5.3.2.4. Prepulzní inhibice ..... - 46 -
5.3.3. Disekce a biochemická analýza tkání ..... - 48 -
5.3.4. Statistické zpracování dat ..... - 48 -
6. Výsledky ..... - 50 -
6.1. Zavedení kognitivního testu ..... - 50 -
6.2. Komparace metod tryptofanové deplece ..... - 51 -
6.2.1. Behaviorální testy ..... - 52 -
6.2.1.1. Open field ..... - 52 -

6.2.1.2. EPM ..... - 53 -
6.2.1.3. NORT ..... - 54 -
6.2.1.4. PPI ..... - 55 -
6.2.2. Biochemická analýza ..... - 56 -
6.2.2.1. Mozková tkáň ..... - 56 -
6.2.2.2. Krevní sérum ..... - 58 -
6.3. Koaplikace MK – 801 ..... - 60 -
6.3.1. Behaviorální testy ..... - 62 -
6.3.1.1. Open field ..... - 62 -
6.3.1.2. EPM ..... - 63 -
6.3.1.3. NORT ..... - 64 -
6.3.1.4. PPI ..... - 65 -
6.3.2. Biochemická analýza tkání ..... - 66 -
6.3.2.1. Mozková tkáň ..... - 66 -
6.3.2.2. Krevní sérum ..... - 69 -
6.4. Testování psychofarmak ..... - 71 -
6.4.1. Allopregnanolon ..... - 71 -
6.4.1.1. Behaviorální testy ..... - 72 -
6.4.1.1.1. Open field ..... - 72 -
6.4.1.1.2. EPM ..... - 72 -
6.4.1.1.3.PPI ..... - 73 -
6.4.1.1.4.NORT ..... - 74 -
6.4.1.2. Biochemická analýza tkání ..... - 75 -
6.4.1.2.1. Mozková tkáň ..... - 75 -

6.4.1.2.2. Krevní sérum ..... - 76 -
6.4.2. Takrin ..... - 77 -
6.4.2.1. Behaviorální testy ..... - 78 -
6.4.2.1.1. Open field ..... - 78 -
6.4.2.1.2. EPM ..... - 79 -
6.4.2.1.3. PPI ..... - 80 -
6.4.2.1.4. NORT ..... - 81 -
6.4.2.2. Biochemická analýza tkání ..... - 82 -
6.4.2.2.1. Mozková tkáň ..... - 82 -
6.4.2.2.2. Krevní sérum ..... - 83 -
7. Diskuse ..... - 84 -
7.1. Zavedení kognitivního testu ..... - 84 -
7.2. Komparace tryptofanové deplece ..... - 86 -
7.3. Koaplikace dizocilpinu ..... - 89 -
7.4. Testování farmak ..... - 91 -
7.5. Validita modelu ..... - 94 -
8. Závěr ..... - 95 -
9. Literatura ..... - 96 -

1. Seznam zkratek

3HAA	3-hydroxyanthranilová kyselina
3HK	3-hydroxykynurenin
3α5βS	pregnanolon sulfát
5-HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)
5-HTP	5-hydroxytryptofan
ACE	angiotenzin konvertující enzym
ACTH	adrenokortikotropní hormon
AD	Alzheimerova choroba
AHR	arylhydrokarbonový receptor
ANOVA	analýza rozptylu
ATII	angiotenzin II
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CDX	(2-hydroxypropyl)-β-cyklodextrinu
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CNS	centrální nervový systém
CRH	kortikotropin uvolňující hormon
EPM	vyvýšené křížové bludiště elevated plus maze
FST	test nuceného plavání forced swimming test
GABA	kyselina γ-aminomáselná
GIT	gastrointestinální trakt
GLP-1	glukagon podobný peptidu 1
GTP	guanosintrifosfát
HEB	hematoencefalická bariéra
HPAA	hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IA	kyselina indoleakrylová

IAA	kyselina indoloctová
IAld	indolealdehyd
IDO	indoleamin 2,3-dioxygenáza
IE	tryptophol, indol-3-ethanol
ILA	kyselina indol-3-mléčná
IP3	inositoltrifosfát
IPA	kyselina indolepropionová
IS	indoxyl-sulfát
KAT	kynurenin aminotransferáza
KYN	kynureniny
KYNA	kyselina kynureninová
LAT1	transportér L-aminokyselin1
LNAA	velké neutrální aminokyseliny Large neutral amino acids
L-TRP	(2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl) propanová kyselina (L-Tryptofan, tryptofan)
MAP2	s mikrotubuly asociovaného proteinu 2
MAPK	s mikrotubuly asociovaná proteinkinasová kaskáda
MK-801	(5R,10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine (dizocilpin)
MWET	Morrisovo vodní bludiště Morris water escape test
NAD+	nikotinamidadenindinukleotid
NaOH	hydroxid sodný
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NO	oxid dusnatý
NORT	test rozpoznávání nového objektu novel object recognition task
NOS	syntáza oxidu dusnatého
OF	test otevřeného pole

	open field
pCPA	p-chlorfenylalanin, fenklonin
PPI	prepulzní inhibice
QA	kyselina chinolinová
RAAS	osa renin-angiotenzin-aldosteron
SERT	serotoninový transportér
SPF	specific pathogen free
TDO	tryptofan 2,3- dioxygenáza
THA	9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin (takrin)
THP1	L-tryptofanhydroxyláza1
Tph2	hydroxyláza tryptofanu
Trk	tyrosinkinásové receptory

2. Úvod

Teoretická část práce shrnuje poznatky o tryptofanové depleci. Zejména se zabývá mechanismem tryptofanové deplece a metodami jejího navození. Zmiňuje i experimentální důsledky tryptofanové deplece, a to jak u lidských subjektů, jejichž choroba je provázena hyposerotonergním stavem, tak i u laboratorních zvířat. Cílem teoretické části je ucelení dostupné literatury ve formě literární rešerše, zhodnocení validity modelu tryptofanové deplece a použitelnosti metody k otestování nově vyvíjených léčiv.

Experimentální část práce pracuje s hypotézou formulovanou na základě literární rešerše. Cílem této experimentální části je komparace modelu tryptofanové deplece v závislosti na délce deplece. Tedy na modelu v řádu hodin pro akutní tryptofanovou depleci a na modelu v řádu týdnů pro chronickou tryptofanovou depleci. Ověřován je i vliv hladovění zvířat před akutní tryptofanovou deplecí. Za účelem studia interakce serotenergního a dopaminerního systému je zvířatům koaplikován dizocilpin, který je používán jako jeden z modelů simulující příznaky psychózy. Následně je zkoumán vliv této koaplikace. Na tomto animálním modelu jsou testována syntetická farmaka, allopregnanolon a takrin, s cílem ověřit jejich účinnost. Data jsou verifikována na základě baterie behaviorálních i biochemických testů a statistické analýzy.

3. Literární přehled

3.1. Metabolismus tryptofanu

Deplece tryptofanu je od roku 1974 široce využívaný nefarmakologický neinvazivní prostředek, který se uplatňuje především při zkoumání úlohy 5-hydroxytryptaminu v organismu (Biggio *et al*., 1974; Fadda *et al*., 2000). A tedy i při mapování vlivu tohoto neurotransmiteru na patogenezi a patofyziologii mnoha poruch i onemocnění (Sandyk, 1992; Young, 1996).

Tato metoda spočívá v biologické dostupnosti esenciální aminokyseliny L-Tryptofanu jakožto dietního prekurzoru serotoninu. Výsledné behaviorální změny, po indukci tryptofanové deplece, jsou vysvětlovány hlavně nízkou hladinou tryptofanu v mozku, důsledkem čehož je snížena také syntéza serotoninu a následná neurotransmise (Fadda *et al*., 2000).

3.1.1. Tryptofan

(2S)-2-amino-3-(1H-indol-3-yl) propanová kyselina (L-Tryptofan, L-TRP, tryptofan) je jednou z dvaceti dvou proteinogenních nepolárních aminokyselin obsažených v živých organismech (Lopez and Mohiuddin, 2020). Zároveň také jedna z devíti esenciálních aminokyselin, která musí být živočišnému organismu dodávána prostřednictvím diety (Rose, 1968; Baker, 2005). Jakožto výchozí sloučenina řady látek se podílí i na mnoha fyziologických procesech.

Důkaz existence tryptofanu byl podán na počátku 20. století pomocí Adamkiewiczovy reakce. Princip této kondenzační chemické přeměny spočíval v reakci mléčného proteinu kaseinu s kyselinou glyoxylovou v silně kyselém prostředí. Tryptofan obsažený v kaseinu, konkrétně jeho indolové jádro, interagoval s oxoskupinou z aldehydové části kyseliny glyoxylové ve výsledný produkt červeno-růžové barvy (Hopkins and Cole, 1901). O něco později, Ellinger a Flamand (1908) popsali i molekulární strukturu této aminokyseliny. Jak už systematický název molekuly napovídá, nachází se v její struktuře aromatický heterocyklus s bicyklickou strukturou – indol.

Právě ona přítomnost indolového kruhu propůjčuje tryptofanu vysoce hydrofobní vlastnosti (Palego *et al*., 2016).

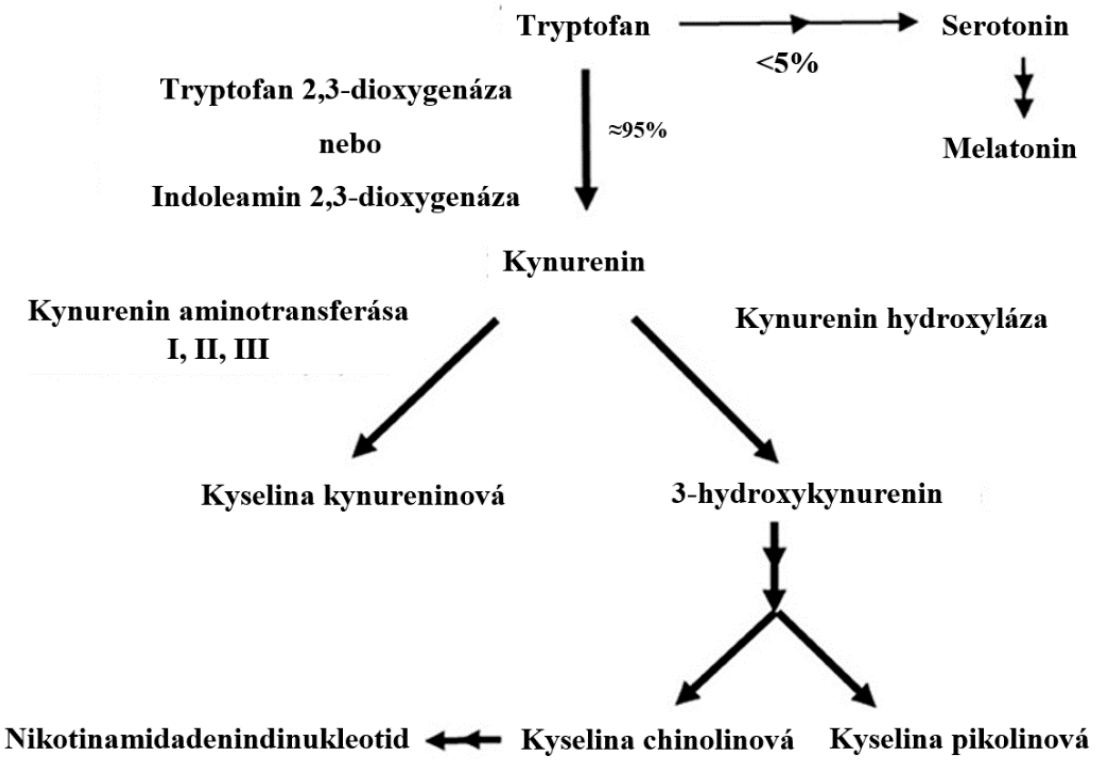
I přes skutečnost, že tryptofan patří mezi velké neutrální aminokyseliny (LNAA), je jeho koncentrace v plazmě velmi nízká (Mahan and Shields, 1998; Young and Stoll, 2003) a vyskytuje se zde převážně navázán na bílkovinu albumin (McMenamy, 1965; Pardridge, 1979). Do mozku však může přestupovat pouze volný tryptofan a jeho plazmatické hodnoty mohou být ovlivňovány také některými hormony, například inzulinem (Fernstrom and Wurtman, 1971) či glukokortikoidy (Green and Curzon, 1968). Přestup L-TRP přes hematoencefalickou bariéru (HEB) je realizován transportérem L-aminokyselin1 (LAT1), o který tryptofan kompetuje spolu s dalšími velkými neutrálními aminokyselinami, L-leucinem, L-izoleucinem, L-valinem, L-fenylalaninem a L-tyrosinem. Výrazným faktorem, který determinuje průchod tryptofanu přes HEB, je tedy i poměr koncentrací tryptofanu a LNAA (Henry *et al*., 1992; Henry *et al*., 1996; Sarwar and Botting, 1999). Většina tryptofanu v mozkové tkáni však pochází z tryptofanu navázaného na albumin. Důvodem této skutečnosti je fakt, že se v blízkosti HEB dokáže tryptofan od albuminu disociovat, a to díky své vysoké afinitě k LAT1 (Wurtman *et al*., 1981; Sainio *et al*., 1996; Pardridge, 1998; Smith, 2000).

V mozkové tkáni je tryptofan transformován na 5-hydroxytryptofan (5-HTP), kdy katalyzátorem přeměny je L-tryptofanhydroxyláza1 (THP1). Poté dekarboxyláza L-aromatických aminokyselin dekarboxyluje 5-HTP na serotonin. Serotonin se následně podílí na neurotransmisi, případně je přeměněn na melatonin (Le Floc'h *et al*., 2010).

Přibližně 3 % dieteticky přijatého tryptofanu se spotřebovávají pro syntézu serotoninu v celém těle (Sandyk, 1992). Hlavně tedy v játrech a enterochromafinních buňkách střevní sliznice. Syntéza serotoninu zde probíhá obdobným chemickým mechanismem jako v mozkové tkáni. Serotonin se následně podílí na gastrointersticiální motilitě (O'Mahony *et al*., 2015). Jen pouhé 1 % dieteticky přijatého tryptofanu je využito k syntéze serotoninu v mozku (Sandyk, 1992) (viz. obr. 3.2.).

Množství tryptofanu, které je v buňkách mozkové tkáně přeměněno na serotonin, je marginální oproti množství tryptofanu, které je metabolizováno kynureninovou cestou (Tyce, 1990). Z toho vyplývá, že tryptofan jakožto nutraceutikum je v organismu

superiorně využíván pro účely proteosyntézy (Wurtman *et al*., 1981). Deplecí tryptofanu lze tedy docílit narušení jeho metabolických cest a tím i fyziologických funkcí organismu s ním spjatých (Gostner *et al*., 2020).



Obr. 3.2.: Metabolismus tryptofanu. Převzato a přeloženo z (Höglund *et al*., 2019).

3.1.2. Serotonin

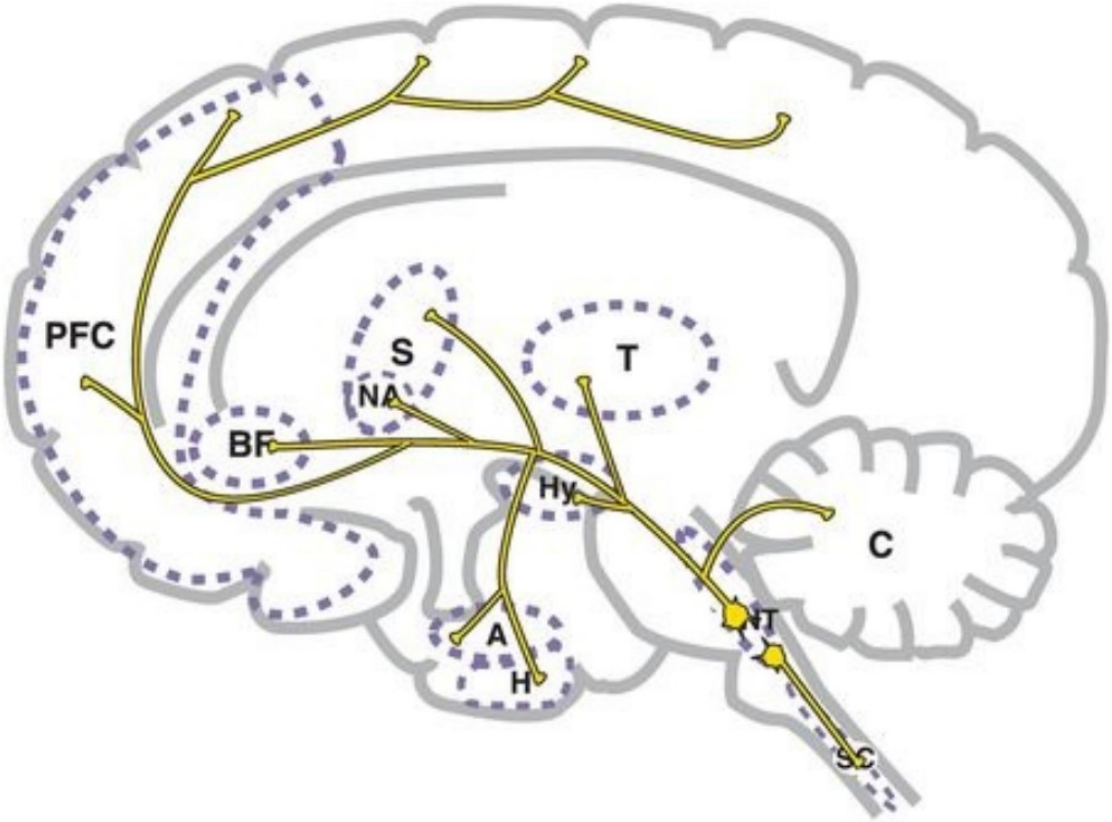
Serotonin (5-hydroxytryptamin, 5-HT), byl poprvé izolován v roce 1948 jakožto látka, která se uvolňuje do oběhu při procesu hemokoagulace (Rapport *et al*., 1948a) a podílí se tak na vazokonstrikci (Rapport *et al*., 1948b; Rapport *et al*., 1948c). Později byla objasněna funkce tohoto biogenního aminu také jako hormonálního regulátoru fyziologických funkcí i neurotransmiteru buněčné signalizace centrálního nervového systému (CNS) (Lesch and Mössner, 1998). Superiorní výskyt serotoninu je mimo CNS. Zatímco produkován je *a priory* enterochromafinními buňkami v epiteliální tkáni po celé délce gastrointestinálního traktu (GIT) (Cooke and Christofi, 2006; Christofi, 2008; Mawe and Hoffman, 2013), jeho hlavním rezervoárem jsou trombocyty (Mammadova-Bach *et al*., 2017).

V CNS je 5-hydroxytryptamin syntetizován a skladován v presynaptických neuronech, tzv. Rafeálních jádrech. Do menší míry také v pineální žláze a katecholaminergních neuronech (Dahlstrom and Fuxe, 1964; Tork, 1985; Tork, 1990; Ruddick *et al*., 2006; Lesch and Weider, 2012).

Bylo popsáno devět skupin serotonergních neuronů (B1 – B9) v jádrech mozkového kmene a přilehlé části tegmenta. Vlákna serotonergních neuronů z *nuclei raphe obcurus* (B2), *pallidus* (B1) a *magnus* (B3) sestupují do mozkového kmene (Dahlstrom and Fuxe, 1964; Felten and Sladek, 1983; Jacobs and Azmitia, 1992). Vlákna serotonergních neuronů z kaudální části *medulla oblongata* vedou do mesencefalonu a vlákna z dorsálních (B6 – B7) a mediálních (B8) *raphe nuclei* inervují hippocampus. Současně vlákna dorsálních a mediálních *raphe nuclei*, spolu s vlákny supralemniscálního (B9) *raphe nuclei*, vedou do prefrontálního kortexu (Steinbusch, 1981; Jacobs and Azmitia, 1992; Alonso *et al*., 2013). V pineální žláze je serotonin acetylován arylalkylamin-N-acetyltransferázou na N-acetylserotonin, následně je N-acetylserotonin metylován acetylserotonin-O-metyltransferázou za vzniku melatoninu.

Serotonin se váže na serotoninové receptory, kterých bylo identifikováno již několik typů a podtypů. Jejich distribuce je různorodá v různých tkáních v těle. Kromě jednoho typu serotoninového receptoru, který funguje jako ligandem aktivovaný iontový kanál, se jedná o receptory spřažené s G proteiny. Inhibiční i excitační signalizace tedy probíhá přes aktivaci G-proteinu a následnou modulací inositoltrifosfátu (IP3) či cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Konečným efektem těchto drah může být mimo jiné i uvolňování mnoha neurotransmiterů. Například dopaminu, glutamátu, kyseliny gama-aminomáselné (GABA), adrenalinu, noradrenalinu a acetylcholinu. Dále se podílí na modulaci mnoha hormonů, konkrétně prolaktinu, oxytocinu, vazopresinu, kortizolu i kortikotropinu (Hoyer *et al*., 1994; Nichols and Nichols, 2008). Serotonin tak ovlivňuje celou osu centrálního nervového systému (Tork, 1985; Tork, 1990; Berger *et al*., 2009), zejména různé oblasti mozkové kůry, limbického systému, bazálních ganglií a diencephalonu (Steinbusch, 1981; Jacobs and Azmitia, 1992) (viz. obr. 3.3.). Díky tomu ovlivňuje serotonin rozličné biologické procesy, například endokrinní, gastrointestinální, vaskulární, motorické, smyslové a kognitivní funkce a dále také náladu, chuť k jídlu,

nevolnost, termoregulaci, spánek, vnímání i citlivost na bolest (Nichols and Nichols, 2008; Berger *et al*., 2009). A proto narušená syntéza 5-hydroxytryptaminu a následná abnormální funkce serotoninového systému vede až k rozmanitým poruchám chování, které přispívají ke vzniku například úzkosti a klinické deprese (Meltzer, 1990; Kerr, 1994; Nichols and Nichols, 2008).



Obr. 3.3.: Hlavní serotonergní dráhy mozku. Vzestupné serotonergní projekce z mozkového kmene vedou do oblastí S a NA. Regulují tak náladu, úzkost, spánek a další funkce. Sestupné serotonergní projekce vedou mozkovým kmenem a míchou, regulují tak bolest. Zkratky: PFC, prefrontální kůra; BF, bazální přednů mozek; S, striatum; NA, nucleus accumbens; T, talamus; Hy, hypotalamus; A, amygdala; H, hipokampus; NT, neurotransmiterová centra mozkového kmene; SC, mícha; C, mozeček. Převzato z (Stahl, 2013).

3.1.3. Metabolismus kynureninů

Kynureninová dráha je součástí katabolismu tryptofanu a uplatňuje se mimo jiné v imunoregulačních procesech při zánětlivé odpovědi organismu. Han a kol. (2010) udávají, že téměř 99 % dieteticky přijatého tryptofanu, který není využit v proteosyntéze, je metabolizováno kynureninovou cestou. Kynureniny (KYN), jakožto metabolity kynureninové dráhy, mohou být produkovány v různých tkáních, zejména v játrech a imunitních buňkách CNS.

V gliích CNS je za fyziologických podmínek přeměna tryptofanu na kynurenin katalyzována zejména tryptofan 2,3- dioxygenázou (TDO). V případě zvýšené imunitní odpovědi organismu se na přeměně superiorně podílí enzym indoleamin 2,3- dioxygenáza (IDO) (Davis and Liu, 2015; Larkin *et al*., 2016). V mikrogliích, monocytech a makrofázích je kynurenin přednostně přeměněn na 3-hydroxykynurenin (3HK) a poté na 3-hydroxyanthranilovou kyselinu (3HAA), kyselinu chinolinovou (QA) a nakonec na nikotinamidadenindinukleotid (NAD+). Zbývající část KYN je přeměněna v astrocytech na kyselinu kynureninovou (KYNA) pomocí kynurenin aminotransferázy (KAT) (Cervenka *et al*., 2017; Davis and Liu, 2015). Kynurenin je antagonistou arylhydrokarbonového receptoru (AHR). AHR působí jako transkripční faktor a reguluje řadu enzymů. Mimo to se AHR uplatňuje v imunitních, nádorových, neurodegenerativních nebo střevních procesech (Opitz *et al*., 2011; Modoux *et al*., 2020). Metabolity kynureninů, například 3-hydroxykynurenin a kyselina 3-hydroxyanthranilová, působí také neuroprotektivně. Díky tomu, že jsou redoxně aktivní, chrání tkáň před oxidativním stresem (Chobot *et al*., 2015).

Produkty metabolismu kynureninů působí i jako endogenní modulátory N-methyl-D-aspartátových (NMDA) glutamátových receptorů. Kyselina chinolinová působí jako agonista NMDA receptorů zejména v neokortexu, hipokampu a částečně i v mozečku a míše (Perkins and Stone, 1983a; Perkins and Stone, 1983b; Davis and Liu, 2015) a může modulovat zpětné vychytávání glutamátu (Tavares *et al*., 2002). Oproti tomu kyselina kynureninová (KYNA) působí jako antagonista NMDA receptorů, kde se váže na místo glycinu (Birch *et al*., 1988a; Birch *et al*., 1988b; Davis and Liu, 2015). Vzhledem k výše zmíněnému by mohla být experimentální léčiva cílící na NMDA

receptory vhodná k léčbě klinických stavů, které zahrnují právě metabolity kynureninové dráhy (Stone, 2001; Stone and Darlington, 2013).

3.2. Další mechanismy tryptofanové deplece

Narušení serotoninového metabolismu však není jediným faktorem behaviorálních změn při depleci tryptofanu. Do jisté míry účinky deplece tryptofanu korespondují s několika hlavními činiteli, jež jsou spolu vzájemně provázány a společně se podílejí na vzniku i manifestaci neuropsychiatrických onemocnění. Tyto činitele zahrnují procesy biologické, neurochemické a imunoneurokrinní (Siever *et al*., 1991).

Z biologického hlediska zde mohou hrát roli faktory genetické, stresové či chronobiologické. V případě neurochemických procesů jsou klíčové neurotransmitery, jejich receptory a další postreceptorové molekulární procesy. Imunoneurokrinní procesy zahrnují aktivitu hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osy (HPAA), systému renin-angiotenzin-aldosteron a následný vliv imunitních reakcí organismu.

Přestože jsou efekty tryptofanové deplece primárně vysvětlovány narušenou hladinou serotoninu a jeho metabolitů, uplatňují se také stresové faktory, jelikož na subjekt v době experimentu mohou působit různé stresové vlivy s deplecí související. Například ona sama akutní či dlouhodobá dietetická manipulace, následné narušené vnitřní mikrobiální prostředí organismu, faktor hladovění před experimentem či spánková deprivace. Některé další dopady mohou být vysvětleny zánětlivými procesy, cerebrovaskulárními změnami či aktivitou syntázy oxidu dusnatého (NOS) (Karu *et al*., 2006; van Donkelaar *et al*., 2011; Young, 2013; Höglund *et al*., 2019). Díky těmto mechanismům působení představuje regulace metabolismu tryptofanu atraktivní terapeutický cíl při léčbě autoimunitních, nádorových, neuropsychiatrických a střevních onemocnění či poruch spánku (Richard *et al*., 2009; Modoux *et al*., 2020).

3.2.1. Zánětlivé procesy centrální nervové soustavy

Zánětlivé procesy centrálního a periferního nervového systému jsou charakteristické abnormálními hodnotami cytokininů spolu se zvýšenou aktivitou astrocytů a mikroglií (Radtke *et al*., 2017). V případě tryptofanové deplece by zánětlivou reakci organismu mohla vyvolat odpověď na výše zmíněné stresové faktory s deplecí související (dietetická manipulace, hladovění, narušený mikrobiom).

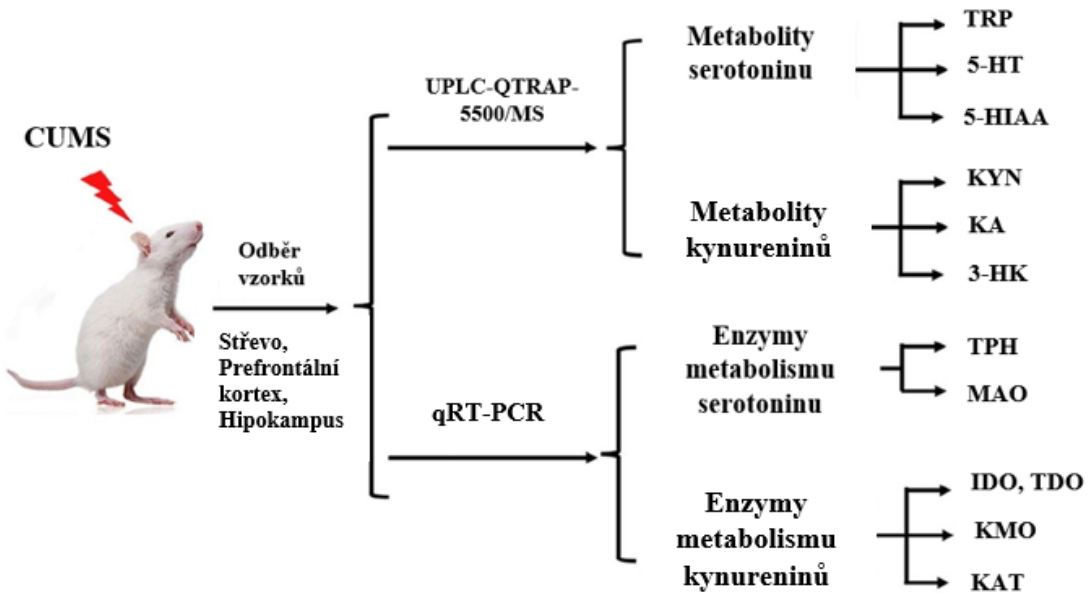
Prozánětlivé molekuly, cytokininy, aktivují hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osu k produkci glukokortikoidních hormonů, které mají imunosupresivní vliv a při dlouhodobém působení oslabují imunitní systém organismu (Schneiderman *et al*., 2005; Kaidanovich-Beilin *et al*., 2012) a rovněž zvyšují aktivitu TDO (Maes *et al*., 2011; Stone and Darlington, 2013). Mimo to prozánětlivé cytokyniny aktivují enzym IDO (Taylor and Feng, 1991). Vysoká aktivita IDO a TDO spolu s přítomností prozánětlivých cytokinů mění v mikrogliích a astrocytech metabolismus tryptofanu a vychyluje ho ve prospěch kynureninové dráhy. To vede jednak ke zvýšené neuroaktivitě metabolitů kynureninové kaskády, a jednak ke snížené produkci serotoninu (Christmas *et al*., 2011; Dantzer, 2017).

3.2.2. Stresový faktor

Chronický mírný stres může vyvolat narušení metabolismu tryptofanu a vychýlit tak jeho regulační dráhy (Li *et al*., 2020). I v případě účinků tryptofanové deplece se adaptační procesy snaží vyrovnat akutnímu či chronickému vystavení stresoru. Jako stresor může figurovat krátkodobé hladovění organismu, spánková deprivace, separace od skupiny a také samotná chuť, konzumace, způsob podání a metabolizace prostředku, který má tryptofanovou depleci navodit. Například opakované podávání diety gastrickou sondou může v experimentu vyvolat nejen stresovou reakci, ale také reakci zánětlivou v důsledku poranění a zanícení dutiny ústní či jícnu (Eichenbaum *et al*., 2011). Mimo to i přímá deplece tryptofanu prostřednictvím serotonergní signalizace dokáže působit na systémy, které se účastní stresové odpovědi (Franklin *et al*., 2012).

V regulaci stresové reakce se uplatňují především dva systémy. A to hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osa (Yates *et al*., 1980) a systém renin-angiotenzin-aldosteron (Murck *et al*., 2012). V důsledku aktivace těchto regulátorů dochází také k uvolňování

energetických zásob z rezerv organismu (van der Kooij, 2020). Stresem vyvolané změny v odbourávání glykogenu a tuků uložených v tukových buňkách spolu s účinky glukokortikoidů mohou vychýlit metabolismus TRP v mozku i následnou syntézu 5-HT, melatoninu i produktů kynureninové kaskády (viz. obr. 3.5.).



Obr. 3.5.: Vliv chronického mírného stresu na metabolismus tryptofanu. Po indukci chronicky mírného stresu byla provedena analýza vzorků střeva, hipokampu a prefrontálního kortexu pomocí ultrarychlé kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Exprese metabolických enzymů tryptofanu byla zkoumána kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí. Chronický mírný stres indukoval abnormality hladin metabolitů i exprese enzymů v daných oblastech. Zkratky: CUMS, chronický mírný stres; UPLC-QTRAP-5500/MS, ultrarychlá kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem; qRT-PCR, kvantitativní polymerázová řetězová reakce; TRP, tryptofan; 5-HT, serotonin 1; 5-HIAA, kyselina 5-hydroxyindoloctová; KYN, kynurenin; KA, kyselina kynureninová; 3-HK kyselina 3-hydroxykaninurová; TPH, tryptofanhydroxyláza; MAO, Monoaminooxidáza; IDO, indoleamin-2,3-dioxygenásy; TDO, Tryptofan 2,3-dioxygenáza; KMO, kynurenin 3-monooxygenáza; KAT, kynureninová aminotransferáza. Převzato a přeloženo z (Li et al., 2020).

3.2.2.1. Hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osa

Hypotalamo-hypofyzárně-adrenální osa (HPAA) představuje propojení CNS a endokrinního systému. HPAA je aktivována při stresové reakci organismu. Ve chvíli, kdy se organismus setká se stresorem, nastává nadměrná aktivace HPAA. Následně je z hypotalamu uvolňován kortikotropin uvolňující hormon (CRH), který působí na receptory adenohypofýzy a stimuluje tak uvolnění adrenokortikotropního hormonu (ACTH) do krevního řečiště. ACTH se váže na receptory kůry nadledvin a potencuje uvolňování glukokortikoidních hormonů z kůry nadledvin. Tato reakce je regulována především negativní zpětnou vazbou kortizolu na uvolňování CRH a ACTH (Yates *et al*., 1980). Dále se vyplavování glukokortikoidních hormonů organismus snaží kompenzovat zvýšením serotoninu. Při chronickém působení stresoru dochází ke snížení citlivosti hypotalamu a hypofýzy na negativní zpětnou vazbu kortizolu či kortikosteronu. To vede až k vyčerpání rezerv serotoninu a s tím souvisejícím patologickým projevům (Semont *et al*., 1999; Davis and Liu, 2015). Dysregulace HPAA může také vyústit až k systémové zánětlivé odpovědi. Zde je patrná souvislost hyposerotonergních poruch se zánětlivými (van Dyken and Lacoste, 2018), imunitními a metabolickými procesy (Kaidanovich-Beilin *et al*., 2012).

Glukokortikoidy také upregulují expresi ceramid syntetázy a přispívají tak k inzulinové rezistenci (Nishino *et al*., 2008), která hraje roli v rozvoji metabolického syndromu (Wittmann, 2007). Metabolický syndrom zahrnuje stavy jako je dyslipidémie, hyperglykémie, hypertenze a obezita. Z dosavadních studií vyplývá zvýšené riziko rozvoje neuropsychiatrických onemocnění u pacientů s prozánětlivými stavy, které zahrnují právě také metabolický syndrom (van Dyken and Lacoste, 2018).

3.2.2.2. Osa renin-angiotenzin-aldosteron

Osa renin-angiotenzin-aldosteron (RAAS) je dalším regulačním mechanismem, který je aktivován, když je organismus vystaven stresovému podnětu. Amygdala, která se uplatňuje při emoční reakci na stresor, působí na hypothalamus. Následně je aktivován sympato-adreno-medulární systém. Sympatickými nervovými vlákny je stimulována dřeň nadledvin k produkci a uvolňování adrenalinu do krevního řečiště. Adrenalin se

váže na β1 adrenergní receptory juxtaglomerulárních buněk ledvin, které secernují renin. Renin aktivuje angiotenzin konvertující enzym (ACE), který přeměňuje angiotenzinogen na angiotenzin II (ATII). Angiotenzin II stimuluje produkci mineralokortikoidního hormonu, aldosteronu, v *zona glomerulosa* kůry nadledvin, zatímco jeho syntéza je podporována HPAA (Kinlein *et al*., 2015; Naughton *et al*., 2014). Aldosteron se váže na mineralokortikoidní receptory, jejichž aktivace je esenciální v regulaci krevního tlaku a elektrolytů. Aktivace RAAS se tak obecně účastní procesů, které souvisejí s vasokonstrikcí, oxidativním stresem a dysfunkcí endotelu (Funder, 2017). V důsledku dysfunkce endotelu mohou endoteliální buňky produkovat zvýšené množství endoteliální syntázy oxidu dusnatého a tím i oxidu dusnatého, což ve výsledku vede až k zánětlivým reakcím organismu (Huang, 2003). Dále se aldosteron může uplatňovat i jako modulátor NMDA receptorů a účastnit se tak regulace kognitivních funkcí v CNS (Mondadori *et al*., 1996).

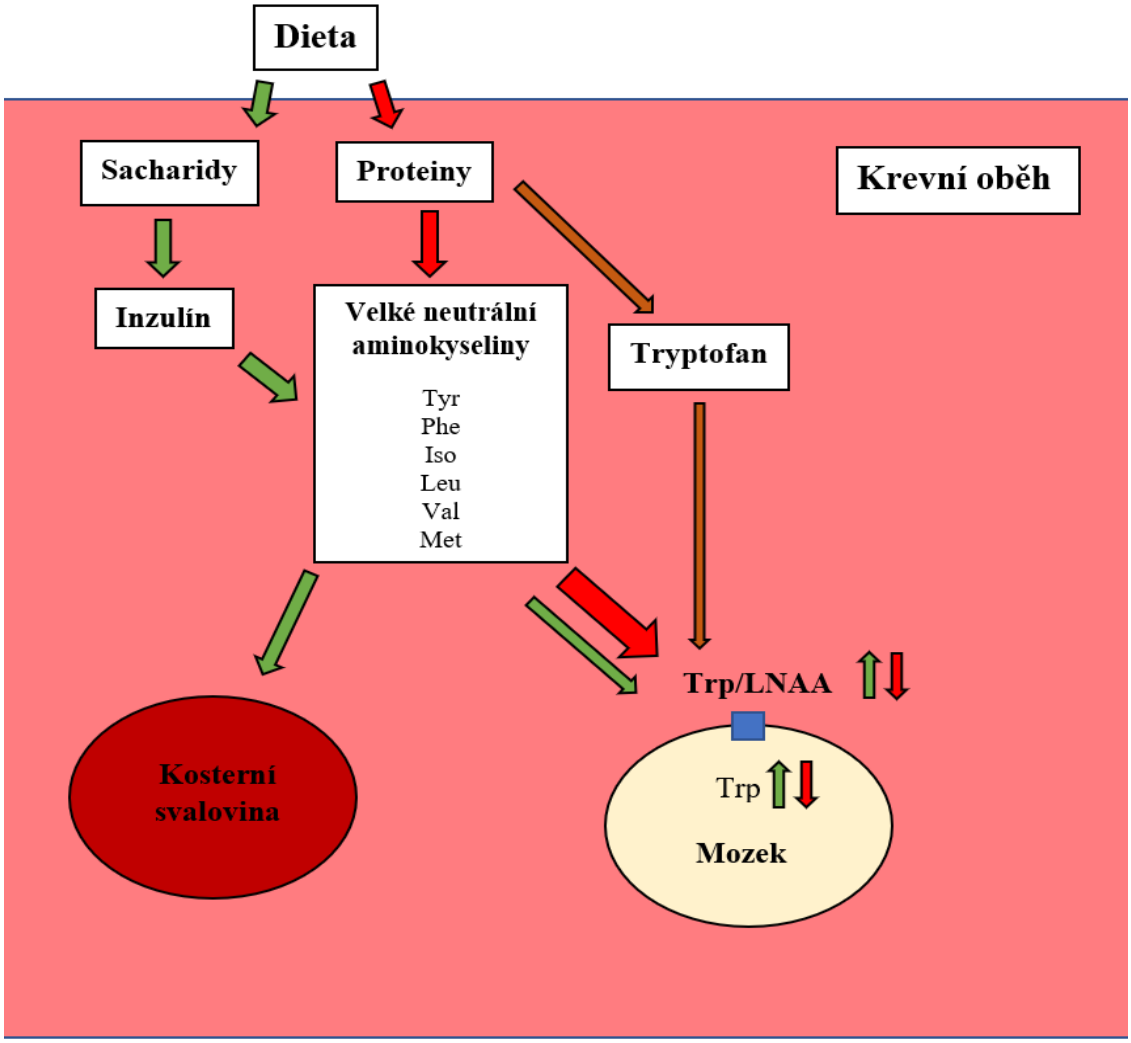
3.2.2.3. Metabolizace energetických rezerv

Při stresové reakci dochází také k přeměně energetických rezerv organismu v podobě odbourávání glykogenu a tukových zásob. Děje se tak působením sympatického nervstva a stresových hormonů (van der Kooij, 2020).

Glykogenolýza, jakožto štěpení glykogenu, vede ke zvýšení plazmatické glukózy a potencuje tak sekreci inzulinu z beta buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Zvýšené hladiny inzulínu podporují vychytávání LNAA do kosterních svalů, jelikož se na rozdíl od tryptofanu neváží na albumin. Díky tomu se zvyšuje poměr tryptofanu k ostatním velkým aminokyselinám v plazmě a tryptofan může snadněji procházet přes hematoencefalickou bariéru (HEB) (Daniel *et al*., 1981; Markus, 2008; Höglund *et al*., 2019). (viz. obr. 3.6.).

V důsledku lipolýzy dochází k uvolňování neesterifikovaných mastných kyselin z tukové tkáně do krevního oběhu. Jedním z faktorů, který determinuje poměr volného a na albumin navázaného tryptofanu, je právě ona plazmatická koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin, jelikož se rovněž váží na albumin. Při zvýšení koncentrace těchto mastných kyselin, díky jejich vyšší afinitě k albuminu, dochází k

nárůstu koncentrace volného tryptofanu v plazmě, a tedy i ke zvýšenému přestupu přes HEB tkáň (Badawy and Morgan, 1982; Fernstrom, 1983; Wurtman *et al*., 2003; Höglund *et al*., 2019).



Obr. 3.6.: Vliv proteinů a sacharidů na metabolismus tryptofanu. Zelené šipky označují aktivaci dráhy indukované sacharidy. Červené šipky ukazují, jak běžný zdroj bílkovin ve stravě ovlivňuje poměr Trp/LNAA v plazmě a hladinu a mozku. Zkratky: Trp, tryptofan; LNAA, velké neutrální aminokyseliny; Tyr, tyrosin; Phe, fenylalanin; Iso, isoleucin; Leu, leucin; Val, valin a Met, methionin. Převzato a přeloženo z (Höglund *et al*., 2019).

3.2.3. Spánková deprivace

Narušení spánkového vzoru v důsledku tryptofanové deplece, může souviset se sníženou hladinou spánkového hormonu 5-methoxy-N-acetyltryptaminu (melatoninu) (Zimmermann *et al*., 1993). Zatímco mimo CNS je melatonin syntetizován buňkami gastrointestinálního traktu, kde je jeho syntéza regulována výhradně příjmem tryptofanu v potravě (Chen *et al*., 2011), v CNS se regulace účastní také suprachiasmatická jádra hypothalamu a cirkadiánní rytmy. Syntéza a sekrece melatoninu je tedy cirkadiánní, potencovaná tmou a inhibovaná světlem (Pandi-Perumal *et al*., 2006). Ve dne suprachiasmatická jádra, především noradrenalní signalizací, působí na pineální žlázu a blokují tvorbu melatoninu. V průběhu noci dochází k potencování endogenní aktivity presynaptických neuronů pineální žlázy. Ty vychytávají tryptofan, který je následně enzymaticky přeměněn na serotonin. Serotonin je acetylován arylalkylamin-N-acetyltransferázou na N-acetylserotonin, který je poté metylován acetylserotonin-O-metyltransferázou za vzniku melatoninu. Snížená hladina melatoninu je jedním z faktorů narušení spánkového schématu či nespavosti. Melatonin má také silný antioxidační účinek. Vychytává toxické radikály, zvyšuje aktivitu některých antioxidačních činitelů a také inhibuje NOS (Tan *et al*., 2015). V neposlednů řadě má tento spánkový hormon vliv na aktivitu HPAA (Konakchieva *et al*., 1997). Spánková deprivace má vliv i na regulaci RAAS, která je také řízena cirkadiánními rytmy, a proto může za určitých okolností figurovat jako primární regulátor aldosteronu i kortisolu (Armbruster *et al*, 1975).

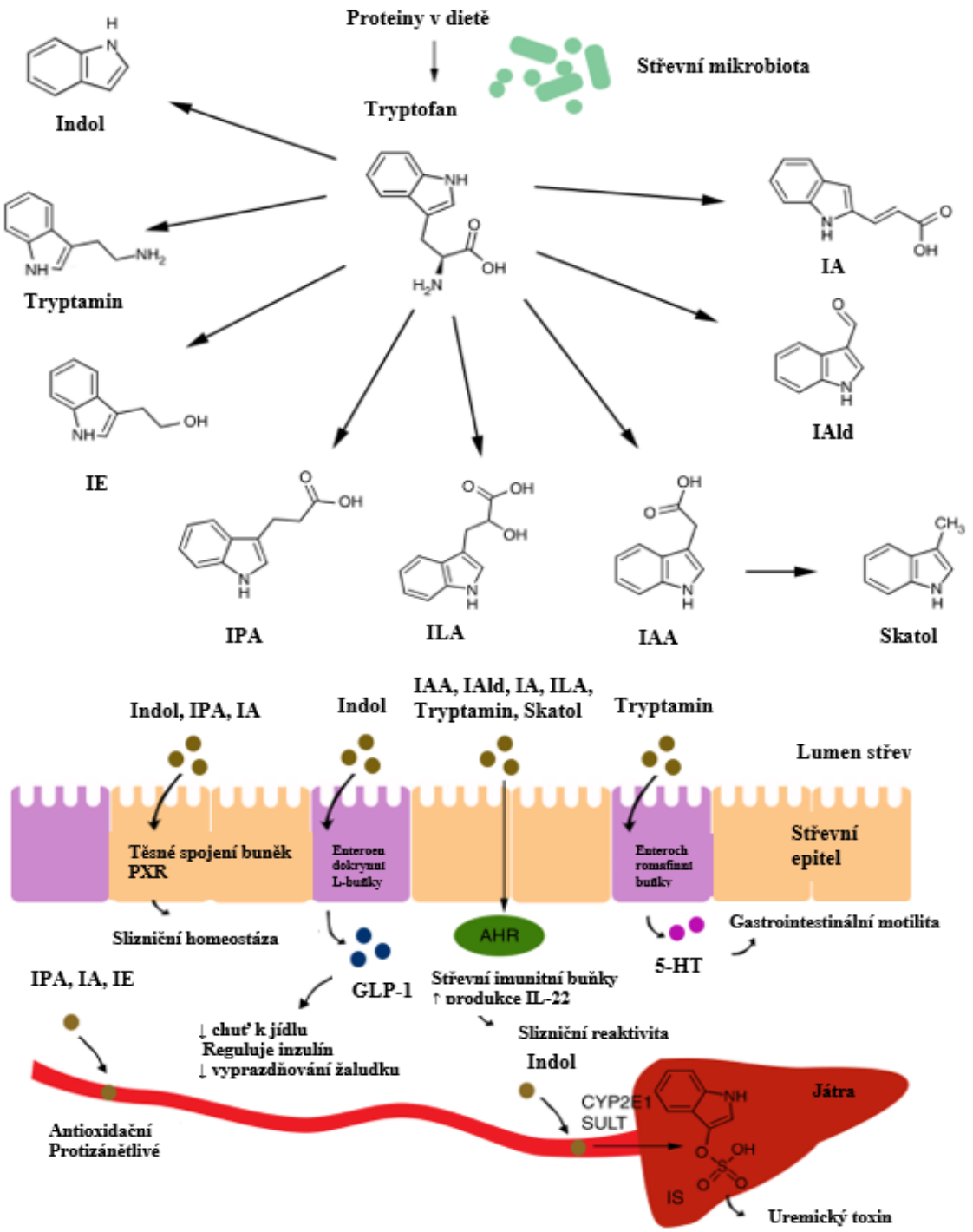
3.2.4. Mikrobiom

V GIS panuje složitý mutualistický vztah mezi rozmanitým a dynamickým mikrobiálním společenstvem a jeho hostitelem. Tento vztah je postaven na složitých molekulárních vztazích, které mají zásadní význam pro střevní homeostázu a některé fyziologické pochody organismu (Shreiner *et al*., 2015). Nedávné studie naznačují, že produkty metabolismu tryptofanu vytvářené střevní mikroflórou se na těchto procesech podílí také (Lukić *et al*., 2019).

Hlavními produkty katabolismu tryptofanu, které produkuje mikrobiom v důsledku rozkladných procesů, jsou indol, tryptamin, indoleethanol (IE), kyselina

indolepropionová (IPA), kyselina indol-3-mléčná (ILA), kyselina indol-3-octová (IAA), skatol, indolealdehyd (IAld) a kyselina indoleakrylová (IA). Indol indukuje uvolňování glukagonu podobného peptidu 1 (GLP-1) v enteroendokrinních L-buňkách a tím potlačuje chuť k jídlu, sekreci inzulínu a zpomaluje vyprazdňování žaludku. Tryptamin se přeměňuje v enterochromafinních buňkách GIT na 5-HT, který stimuluje gastrointestinální motilitu působením na neurony enterického nervového systému. IPA, IE a IA se vstřebávají *via* střevní epitel a dostávají se do krevního oběhu a všeobecně mají antioxidační a protizánětlivé účinky, zatímco indoxyl-sulfát (IS), který vzniká v játrech z indolu, má ve vysokých koncentracích účinky cytotoxické. IAld se váže na receptory ve střevních imunitních buňkách. Indukuje tak zvýšenou produkci interleukinu-22, čímž se účastní imunitní odpovědi organismu (Roager and Licht, 2018) (viz. obr. 3.8.).

Nedostatek tryptofanu tak může podněcovat uvolňování tryptofanu z rezerv v GIT. To může představovat stresor pro bakteriální mikrobiom organismu a potencovat rozkladné činnosti tryptofanu i následnou imunitní odpověď. A v konečném důsledku také ovlivňovat aktivaci HPAA (Turnbull and Rivier, 1999). Je známo, že enterocyty střeva exprimují celou řadu receptorů vrozené imunity, cytokinů a chemokinů (Lavelle *et al*., 2010), které následně ovlivňují steroidogenezi nadledvin i aktivitu HPAA (Turnbull and Rivier, 1999). Nicméně, přesné mechanismy, kterými by mikrobiom přímo ovlivňoval CNS a aktivitu HPAA, doposud známé nejsou. Předpokládá se, že může vysílat přímý signál do mozku pomocí aferentních vláken bloudivého nervu, či stimulovat periferní tkáně k vylučování glukokortikoidů. I přes tuto skutečnost řada studií potvrdila, že nervové, imunitní a endokrinní dráhy spolu interagují mnoha způsoby a mnoho bakteriálních ligandů je schopno modulovat sekreci glukokortikoidů nezávisle na adenohypofýze. Lze tedy předpokládat, že mikrobiom může ovlivňovat biologickou syntézu glukokortikoidů (Fülling *et al*., 2019).



Obr. 3.8.: Mechanismy působení mikrobiálních katabolitů tryptofanu na organismus. Zkratky: IE, tryptophol; IPA, kyselina indolepropionová; ILA, kyselina indol-3-mléčná; IAA, kyselina indol-3-octová; IAld, indolealdehyd; IA; kyselina indoleakrylová; PXR; receptor pregnanu X; GLP, 1glukagonu podobného peptidu 1; AHR, aryl uhlovodíkový receptor; IL-22, interleukinu-22; 5-HT, serotonin; IS, indoxyl-sulfát; CYP2E1, Cytochrom P450 2E1; SULT, sulfotransferázy. Převzato a přeloženo z (Roager *et al*., 2018).

3.2.5. Cerebrovaskulární změny

Regulace krevního zásobení mozku je esenciální pro udržení adekvátní mozkové perfuze. Dostatečné zásobení nervové tkáně kyslíkem a dalšími energetickými metabolity je nezbytné pro fyziologickou funkci nervové soustavy (Fantini *et al*., 2016). Některé studie reflektovaly cerebrovaskulární změny po indukci tryptofanové deplece. Pomocí kvantitativního autoradiografického zobrazování byl zjištěn pokles průtoku krve v některých regionech mozku v důsledku snížení hodnot tryptofanu v periferních tkáních (van Donkelaar *et al*., 2009). Přesný důvod tohoto fenoménu není doposud znám. Je možné, že serotonin působí jako vazokonstriktor a předpokládá se i role snížených hladin NOS na lokální cerebrovaskulární dynamiku v oblastech hipokampu, které jsou zapojené do zpracování paměti. Cerebrovaskulární změny mají rovněž vliv na hladinu neurotrofického faktoru BDNF, který v případě oligemie působí jako neuroprotektor (van Donkelaar *et al*., 2011).

BDNF je poměrně malý neurotrofin vyznačující se signalizací přes neurotrofické tyrosinkinásové receptory (Trk) s největší afinitou k TrkB. BDNF se na receptory váže jako dimer, což vede k dimerizaci Trk receptorů, jejich autofosforylaci a následně aktivaci mnoha intracelulárních kaskád. Například s mikrotubuly asociovanou proteinkinasovou kaskádu (MAPK) prostřednictvím G-proteinu Ras. Tímto způsobem se BDNF podílí na regulaci neuronálního vývoje, plasticity a dlouhodobé potenciace, čímž také figuruje v procesech paměti a učení (Miranda *et al*., 2019).

3.2.6. Syntáza oxidu dusnatého

Předpokládá se, že deplece tryptofanu může mít vliv na aktivitu syntázy oxidu dusnatého, která působí i na hladiny oxidu dusnatého a také citrulinu, což ve výsledku ovlivňuje kognitivní procesy CNS (van Donkelaar *et al*., 2009).

Syntáza oxidu dusnatého je enzym, který se vyskytuje ve třech známých formách jako neuronální, indukovatelná a endotelová (Förstermann and Sessa, 2012). NOS se uplatňuje jako katalyzátor přeměny L-argininu na oxid dusnatý a citrulin (Crane *et al*., 1998; Alderton *et al*., 2001; Wiesinger, 2001).

Neuronální NOS je exprimována v centrálních a periferních neuronech a některých dalších buňkách a figuruje v synaptické plasticitě CNS, centrální regulaci krevního tlaku a hladkého svalstva. Indukovatelná NOS exprimuje v mnoho typů buněk při reakci na zánětlivé procesy organismu (Förstermann and Sessa, 2012). Endotelová NOS je exprimována zejména v endotelových buňkách. Byla však nalezena i v neuronech CNS a podílí se na uvolňování některých neurotransmiterů (Huang 2003; Förstermann and Sessa, 2012).

Citrulin je neesenciální aminokyselina, která je především produktem ureosyntetického cyklu. Mimo to se uplatňuje při syntéze argininu *de novo*. Předpokládalo se, že původ citrulinu v CNS je výhradně produktem jaterního metabolismu. Ukázalo se však, že citrulin může být syntetizován i na úrovni CNS, a to právě z argininu. Nalezen byl například v mikrogliích či oligodendrocytech. Aby mohlo dojít k jeho syntéze je zapotřebí aktivovat N-metyl-D-aspartátové receptory pomocí excitačního působení glutamátu, které vyvolá vtok vápníkových iontů do buňky. Po navázání vápníku na kalmodulin je aktivována NOS, která spolu za účasti dalších kofaktorů přeměňuje L-arginin na NO a citrulin. Citrulin je tedy jedním z limitujících faktorů pro modulaci NOS (Pérez-Neri and Diéguez-Campa, 2018; Papadia *et al*., 2018).

Samotný oxid dusnatý je nestabilní volný radikál, který v organismu působí jako mediátor imunitního systému, vasomotoriky i neurotransmise. V CNS se uplatňuje konkrétně jako mezibuněčný přenašeč při přenosu signálu. Dále jako aktivátor rozpustné guanylátcyklázy, čímž se podílí na tvorbě cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) z guanosintrifosfátu (GTP). cGMP následně působí na uvolňování glutamátu v presynaptických neuronech. Tyto molekuly tedy hrají důležitou roli v intracelulární signalizaci a jsou vysoce zapojeny do procesů učení a paměti (Förstermann and Sessa, 2012).

Na základě vzájemné závislosti syntázy oxidu dusnatého, oxidu dusnatého, citrulinu a argininu souvisejí snížené koncentrace citrulinu v hipokampu i s poklesem NO. Výstupem této disrupce mohou být zhoršené paměťové procesy v důsledku narušení glutamátergní signalizace v některých oblastech CNS (van Donkelaar *et al*., 2011; Höglund *et al*., 2019).

3.3. Tryptofanová deplece v animálních studiích

3.3.1. Animální modely

Animální modely jsou klíčové pro modelování různých chorob a onemocnění. Jejich prostřednictvím je možné podrobnější zkoumaní příčin projevů dané choroby a možnost testování potenciálních léčiv. Je možné vytvářet modely genetické, vývojové, farmakologické a behaviorální (Lipska and Weinberger, 2000; Marcotte *et al*., 2001; Nestler and Hyman, 2010; Fernando and Robbins, 2011) v závislosti na tom, jakou úroveň chce experimentátor sledovat. Animální modely nejsou přesnou kopií patofyziologie daného onemocnění, nicméně vykazují určité schody se symptomatologií pacientů (Geyer and Moghaddam, 2002).

Hlavním kritériem při hodnocení animálního modelu je validita. Ona validita se odráží ve schopnosti reprodukovat vznik a projevy onemocnění a také ve schopnosti odpovídat na léčbu příznaků podobně jako pacienti trpící danou nemocí (Lipska and Weinberger, 2000; Marcotte *et al*., 2001). Validitu animálního modelu je však možné posuzovat z vícero hledisek. V základním měřítku můžeme hodnotit validitu dle schopnosti modelu reprodukovat etiopatogenezi onemocnění (konstrukční validita), dále dle shody mezi behaviorálním projevy modelu a symptomy daného onemocnění (fenomenologická validita) a konečně také dle míry analogie efektu farmak mezi animálním modelem a pacienty při reálné klinické léčbě (predikční validita) (Willner, 1986). Lipska a Weinberger (2000) navrhují, že obecný rámec pro hodnocení validity animálního modelu pro úzkostné a depresivní chování by měl zahrnovat konkrétně kritéria homologické validity, patologické validity, mechanistické validity, fenomenologické „face“ validity a prediktivní validity. Homologická validita bere v potaz druh a kmen zvířete vzhledem ke schopnosti organismu replikovat cílené onemocnění. Patologická validita souvisí s manipulaci organismu tak, aby odpovídal patologickým charakteristikám vzniku onemocnění. Mechanistická validita odpovídá skutečnosti, že kognitivní a biologické mechanismy, které jsou základem poruchy, jsou shodné u lidí i zvířat. Fenomenologická „face“ validita zahrnuje behaviorální a biochemické změny. Parametry prediktivní validity se zabývají analogií mezi účinky léčby, ale i vztahem mezi vyvolávajícím faktorem a výsledkem.

Vliv deplece tryptofanu byl široce zkoumán napříč experimentálními laboratorními zvířaty, zahrnujíc psy, kočky, prasata (Moehn *et al*., 2012), primáty (Felten and Sladek, 1983), ryby (Airhart, 2012), králíky (Daniel *et al*., 1981) a v neposlední řadě také myši (Pelosi *et al*., 2015) a potkany (Ellison and Bresler, 1974; Petrasek and Stuchlik, 2009).

I přes to, že u všech těchto experimentálních obratlovců došlo k ovlivnění metabolismu tryptofanu, je zajímavé, že se naměřené hodnoty tryptofanu i následné behaviorální projevy mnohdy liší. A to nejen napříč živočišnými druhy (Moehn *et al*., 2012), ale i mezi jednotlivými kmeny laboratorních potkanů (Jans *et al*., 2010), a to dokonce mírně i v rámci pohlaví (Jans *et al*., 2009).

3.3.2. Metody navození tryptofanové deplece

V současnosti existuje několik způsobů, jak navodit tryptofanovou depleci. A to zásahem dietetickým (Bubenikova *et al*., 2004; Jans *et al*., 2010; Cahir *et al*., 2007), farmakologickým (Nance and Kilbey, 1973; Ellison and Bresler, 1974; Izquierdo *et al*., 2012) i genetickým (Weng *et al*., 2015).

Dietetická indukce tryptofanové deplece zahrnuje kompletní slisované beztryptofanové krmivo v podobě pelet (Cahir *et al*., 2007), beztryptofanové aminokyselinové nápoje (Bubenikova *et al*., 2004), želatinové mixy (Lieben *et al*., 2004; Jans *et al*., 2009). van Donkelaar a kol. (2011) udávají hydrolyzát želatiny s obsahem široké škály aminokyselin a s přídavkem sacharidů jako pravděpodobně nejvalidnější metodu k navození akutní tryptofanové deplece, jelikož se tato směs nejvíce nutričně blíží standartní dietě. Po expozici standartní diety s obsahem tryptofanu je efekt deplece zvrácen a stav i chování normalizováno (Bortolato *et al*., 2008).

Farmakologické navození deplece spočívá například v aplikaci p-chlorfenylalaninu (pCPA, fenklonin). Fenklonin působí jako inhibitor enzymu tryptofanhydroxylázy a omezuje rychlost syntézy serotoninu. Aplikace pCPA u potkanů trénovaných na kokain snížila motivaci potkanů k dalšímu jeho vyhledávání (Tran-Nguyen *et al*., 1999). U embryí *Dania reria* způsobil pCPA depleci serotoninu v mozku i míše, snížil lokomoční aktivitu a až téměř znemožnil plavání (Airhart, 2012). Snížená lokomoční aktivita

v důsledku subkutánního podání pCPA byla reflektována dále také u potkanů, kteří se ocitli v neznámém prostředí (Ellison and Bresler, 1974). I když nebyl prokázán vliv na kognitivní koordinaci (Petrasek and Stuchlik, 2009), ukázalo se snížení markeru buněčné diferenciace i synaptické plasticity (Kim *et al*., 2020) s mikrotubuly asociovaného proteinu 2 (MAP2) v oblasti hipokampu (Whitaker-Azmitia *et al*., 1995). Po intracerebroventrikularní aplikaci pCPA se snížila motivace potkanů k vyhledávání kokainu, a naopak se zvýšil zájem o sacharózu (Jefferson *et al*., 2001).

Genetické modely tryptofanové deplece představují knockoutovaná zvířata. Myši s inaktivovaným genem pro vytvoření neuronálně specifické izoformy hydroxylázy tryptofanu (Tph2), která se účastní syntézy serotoninu, téměř nevykázaly přítomnost serotoninu v mozku. Též byly pozorované růstové defekty a perinatální letalita embryí (Pelosi *et al*., 2015). Oproti tomu knockoutovaná zvířata s defektním genem pro serotoninový transportér (SERT) vykazovala zvýšenou expresi BDNF ve ventrálním hipokampu spolu s projevy anhedonního a anxiózního chování (Diniz *et al*., 2021).

Deplece tryptofanu může být také aplikována v závislosti na délce podávání jako akutní (Lieben *et al*., 2004; Cahir *et al*., 2007; Jans *et al*., 2009 Jans *et al*., 2010) nebo chronická (Fadda *et al*., 2000; Cahir *et al*., 2007; Franklin *et al*., 2012). Akutní tryptofanová deplece vyvolává téměř okamžité postupné snižování extracelulární koncentrace 5-hydroxytryptaminu v kortexu, která se stabilizuje do 2 hodin od aplikace směsi bez tryptofanu a vydrží asi po dobu 6 hodin (Fadda *et al*., 2000). Také snižuje vazbu serotoninu na serotonergní 5-HT_{1A} v dorsálním *raphe nucleus* (Cahir *et al*., 2007). Oproti tomu chronická tryptofanová deplece, realizovaná v řádu dnů a týdnů dlouhodobějším příjmem potravy bez tryptofanu, způsobuje postupné a hluboké snížení 5-hydroxytryptaminu (Fadda *et al*., 2000). Co se týče vazby na receptory, tak týdenní deplece nevykazuje žádné významné změny, avšak po třech týdnech deplece se zvyšuje vazba serotoninu na 5-HT_{2A} receptory v prefrontální kůře (Cahir *et al*., 2007).

3.3.3. Biochemická validita animálních modelů tryptofanové deplece

Většina animálních studií reflektuje dobrou validitu modelu v biochemické oblasti, kdy po podání beztryptofanové směsi signifikantně poklesl obsah tryptofanu v krevním séru i v mozkových tkáních. Zaznamenán byl i jasný pokles serotoninu a jeho metabolitů. Avšak naměřené hodnoty nejsou mezi studiemi konzistentní (Fadda *et al*., 2000; Blokland *et al*., 2002; Bubenikova *et al*., 2004; Lieben *et al*., 2004; Cahir *et al*., 2007; Jans *et al*., 2009; Petrasek and Stuchlik, 2009; Jans *et al*., 2010; Franklin *et al*., 2012).

Například z dob, kdy byla metoda použita poprvé, bylo u potkanů kmene Wistar zjištěno snížení volného tryptofanu v séru o 90 %, v mozku o 85 %, serotoninu v mozku o 58 % a kyseliny 5-hydroxyindoloctové v mozku o 76 %. Maximální změny nastoupily do 2 hodin od podání potravy a přetrvávaly déle než 24 hodin (Biggio *et al*., 1974).

S ohledem na výše zmíněné mechanismy se měření jednotlivých hodnot tryptofanu a serotoninu jeví jako nedostatečné, jelikož nezohledňují fyziologické procesy a chronický mírný stres, který působí na disociaci L-TRP od albuminu. A proto se jako validnější jeví sledovat poměr volného tryptofanu k součtu jednotlivých velkých aminokyselin (TRP/ΣLNAA) v plazmě a poměr kyseliny 5-hydroxyindoloctové k 5-hydroxytriptaminu (5-HIAA/5-HT) v jednotlivých oblastech mozku (van Donkelaar *et al*., 2011). I přes to, že deplece tryptofanu způsobila velmi podobné snížení periferních hodnot TRP/ΣLNAA v plazmě potkanů, konkrétně kmene Brown Norway (pokles o 58 %) a Sprague Dawley (pokles o 48 %), hladiny serotoninu se stále značně lišily v různých částech mozku (Jans *et al*., 2010).

V důsledku chronické tryptofanové deplece byly zároveň zjištěny i zvýšené hladiny kynureninu v krevním séru a úbytek na váze, který negativně koreloval s plazmatickými hodnotami kortikosteronu a aldosteronu (Franklin *et al*., 2012).

3.3.4. Behaviorální validita animálních modelů tryptofanové deplece

V případě tryptofanové deplece jsou zvířata nejčastěji testována na chování mimikující anxietu, depresivní chování, kognitivní deficit (Blokland *et al*., 2002; Lieben *et al*., 2004), anhedonii (Blokland *et al*., 2002), ale také lokomoci (Bubenikova *et al*., 2004) nebo sociální interakce (Jans *et al*., 2010).

V případě anxiety se hojně využívá prepulzní inhibice (PPI) (Bortolato *et al*., 2008), home cage emergence testu (Blokland *et al*., 2002; Lieben *et al*., 2004) a dále testu otevřeného pole (open field; OF) (Blokland *et al*., 2002; Lieben *et al*., 2004; Jans *et al*., 2010) i vyvýšeného křížové bludiště (elevated plus maze; EPM) (Farhan *et al*., 2015). OF (Jans *et al*., 2010; Bubenikova *et al*., 2004) a EPM (Bubenikova *et al*., 2004) slouží také pro zkoumání lokomoční aktivity zvířete.

Depresivní chování se projevuje v testu nuceného plavání (forced swimming test, FST) (Blokland *et al*., 2002; Lieben *et al*., 2004; Jans *et al*., 2010; Franklin *et al*., 2012) a spolu s anhedonií i v testu dvou lahví sacharózy (Blokland *et al*., 2002).

V případě ověření kognitivního deficitu se nejčastěji uplatňuje test rozpoznávání nového objektu (novel object recognition task; NORT) (Jenkins *et al*., 2010; Lieben *et al*., 2004; Olivier *et al*., 2009), Morrisovo vodní bludiště (Morris water escape test MWET) (Lieben *et al*., 2004) či aktivní vyhýbání se místu (Petrasek and Stuchlik, 2009).

I přes široké spektrum těchto experimentů nejsou výsledky mnohdy konzistentní (Blokland *et al*., 2002; Petrasek and Stuchlik, 2009; Jans *et al*., 2010). Některé studie sice reportují zhoršení v případě NORT (Rutten *et al*., 2007; Olivier *et al*., 2008; Olivier *et al*., 2009; van Donkelaar *et al*., 2008), avšak potkani kmene Brown Norway nevykazovali zhoršené kognitivní schopnosti ani zvýšené depresivní či úzkostné chování oproti potkanům kmene Sprague Dawley (Jans *et al*., 2010). Žádný kognitivní deficit nevykazovali ani potkani kmene Wistar, nicméně depresivní i úzkostné chování přítomno bylo (Blokland *et al*., 2002).

3.4. Tryptofanová deplece v humánních studiích

Metoda tryptofanové deplece, jakožto neinvazivní manipulace, je značně využívána i v řadě lidských studií, a to konkrétně od roku 1977 (Concu *et al*., 1977). Výhodou je její nenáročná aplikace, která spočívá nejčastěji v konzumaci nápoje bez tryptofanu s obsahem širokého spektra aminokyselin. Jako dobrovolníci slouží jednak zdraví muži i ženy, ale především neuropsychiatričtí pacienti v jejichž onemocnění hraje roli serotonergní disrupce (Young, 2013). Nevýhodou metody je, že na rozdíl od zvířecích modelů, není etické zkoumat hladiny serotoninu přímo v lidských tkáních, tedy kromě definovaných případů *post mortem* (Schmitt *et al*., 2008).

Účinek deplece tryptofanu byl sledován například u jedinců trpících schizofrenií (Golightly *et al*., 2001), bipolárně afektivní poruchou (Sobczak *et al*., 2002), depresí (Neumeister *et al*., 2004; Munafo *et al*., 2006), poruchami příjmu potravy (Kaye *et al*., 2000; Kaye *et al*., 2003), Alzheimerovou chorobou (Porter *et al*., 2000, Porter *et al*., 2005), Parkinsonovou chorobou (Scholtissen *et al*., 2006), poruchou autistického spektra (Daly *et al*., 2014) a také u postmenopausálních žen (Hughes *et al*., 2003). Zdá se, že aby vykazovala deplece tryptofanu účinek na náladu, musí být v plazmě tryptofan redukován alespoň o 60 % (van der Does, 2001). Co se kognitivního deficitu týká, opět jsou pozorování různorodá. Deplece tryptofanu vykazuje horší konsolidaci epizodické paměti a lepší soustředěnou pozornost. Nemá však vliv na paměť pracovní, krátkodobou, sémantickou a nezhoršuje ani plánování, rozhodování či psychomotorické zpracování. Rovněž byl reflektován rozdíl mezi pohlavím, kdy se ženy zdají zranitelnější vůči kognitivním narušením i dopadům tryptofanové deplece na náladu (Mendelsohn *et al*., 2009). Heterogenní jsou i pozorování účinku tryptofanové deplece na úzkostné stavy jedinců a výsledky studií nejsou konzistentní. Někteří autoři prokázali vliv na anxietu, kdežto jiní nereflektovali žádné změny úzkostných projevů (Schopman *et al*., 2021).

Zajímavé je působení deplece L-TRP na pacienty trpící poruchami příjmu potravy. Zatímco u jedinců, kteří se léčí s mentální anorexií, bylo zjištěno snížené úzkostné a všeobecně dystrofické smýšlení (Kaye *et al*., 2003), u dobrovolníků s diagnózou mentální bulimie tomu bylo přesně naopak (Kaye *et al*., 2000) Tato zjištění naznačují, že při mentální anorexii nejsou přítomny normální modulační regulace

serotoninu. Je to pravděpodobně adaptací jeho receptorů, a proto je v důsledku přenos signálu serotoninu zvýšený (Kaye *et al*., 2003).

Interesantní je i fakt, že jedinci s poruchou autistického spektra mají pravděpodobně abnormální inhibiční sítě a serotonin na ně má opačný účinek než na jedince zdravé. Abnormality byly pozorovány v rozdílné odpovědi na depleci tryptofanu, kdy se zvyšovala fronto-talamická aktivace a snižovala aktivace striato-cerebelární (Daly *et al*., 2014).

3.5. Tryptofanová deplece a koaplikace farmak

Farmaka jsou v modelu tryptofanové deplece využívána jednak pro účely zvrácení projevů deplece, hlavně tedy kognitivních (Rutten *et al*., 2007; Franklin *et al*., 2012), a jednak při sledování interakce serotonergního systému s dalšími neuromodulačnímy systémy. Například systémem dopaminergním (Mann *et al*., 2008) či glutamátergním (Bubenikova *et al*., 2004).

Deplece tryptofanu byla zvrácena při použití selektivního inhibitoru fosfodiesterázy-4 – rolipramu. Po aplikaci rolipramu zvířata vykazovala kognitivní zlepšení v rozpoznávání objektů. Autoři navrhují, že rolipram může působit přes zvýšené hladiny cyklického adenosinmonofosfátu a následným zvýšením uvolňování neurotransmiterů (Rutten *et al*., 2007). Byl zkoumán i vliv cyklického analogu melatoninu – pinolinu. Jeho koaplikace zvrátila preferenci potkanů pro sacharózu v pCPA modelu deplece (Pähkla *et al*., 1998). Dále byla reflektována zvýšená úleková reakce při koaplikaci amfetaminu u chronické tryptofanové deplece, která trvala dva týdny. Tento efekt byl poté snížen haloperidolem a také dalším antipsychotikem klozapinem (Bortolato *et al*., 2008). Avšak na lokomoční aktivitu v testu otevřeného pole neměl haloperidol žádný vliv. Oproti tomu koaplikace dizocilpinu spolu s deplecí tryptofanu hyperlokomoci zvýšila. Vzhledem k tomu, že je haloperidol antagonista dopaminového D2 receptoru a dizocilpin je antagonista glutamátového NMDA receptoru, je možné, že deplece tryptofanu ovlivňuje spíše glutamátergní systém než systém dopaminový. S ohledem na toto zjištění lze předpokládat, že model tryptofanové deplece a dizocilpinu je dostatečně validní pro další experimentální využití. Například k ověření účinnosti psychofarmak,

která působí přes NMDA receptory či sledování dalších behaviorálních změn v tomto modelu (Bubenikova *et al*., 2004).

3.5.1. Dizocilpin

(5R,10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine (dizocilpin, MK-801) je nekompetitivní antagonista NMDA receptoru, který byl poprvé syntetizován v roce 1982 firmou Merck & Co. (Olney, 1989). V současné době je registrován jako droga se širokým spektrem využití. Přesto, že má dizocilpin antikonvulzivní, analgetické (Daniell, 1990), anxiolytické (Xie and Commissaris, 1992) i antidepresivní účinky (Yang *et al*., 2016), v humánní medicíně se nepoužívá, jelikož ve vyšších dávkách působí neurotoxicky. Což může vést až k degeneraci neuronů (Olney, 1989).

V současné době se MK-801 uplatňuje v experimentální oblasti jako induktor hyperlokomoce a zhoršených kognitivních funkcí. Podání dizocilpinu u zvířat vede k různorodým motorickým dysfunkcím, které zahrnují například stereotypní chování či ataxii (Koek *et al*., 1988). Tyto účinky jsou dány právě působením přes NMDA receptory. MK-801 se váže, jakožto kladně nabitý negativní alosterický modulátor těchto receptorů, na místo kationtu hořečnatého. Tím dlouhodobě blokuje NMDA receptor a brání tak kotransmisi glutamátu a glycinu. To způsobuje hypofunkci NMDA receptoru a následné narušení glutamátergní i dopaminergní signalizace (Stahl, 2013). Což ve výsledku vede ke zhoršení synaptické plasticity, paměti i učení (Kumar *et al*., 2018) a ke zvýšené lokomoci (Chartoff *et al*., 2005).

Fakt, že hypoaktivita glutamátergního systému působí díky nadměrným hladinám glutamátu neurotoxicky, vedl ke vzniku glutamátové hypotézy duševních onemocnění. Narušení v dopaminergní neurotransmisi vysvětluje hypotéza dopaminová. A v neposlední řadě existuje i hypotéza serotoninová, která předpokládá také roli serotoninu v duševních onemocněních (Stahl, 2013).

3.6. Terapeutické využití tryptofanové deplece

Možné terapeutické využití tryptofanové deplece souvisí s jejími výše popsanými mechanismy. Produkty metabolismu tryptofanu se účastní mnoha fyziologických funkcí organismu. Je-li metabolismus tryptofanu narušen, figuruje tak v neurologických, neupsychiatrických, psychiatrických, metabolických, infekčních, střevních i nádorových onemocněních (Gostner *et al*., 2020), což z něj činí ideální farmakologický cíl. Jsou zde tedy otevřené možnosti pro syntézu nových léčiv v podobě probiotik, modulátorů některých enzymů, především IDO a TDO. Dále je možné terapeuticky cílit na aktivitu serotonergních a aryl uhlovodíkových receptorů. Aryl uhlovodíkové receptory totiž vzbuzují zájem, jelikož jsou zapojené v onkogenních, autoimunních a neurodegenerativních onemocněních. S nadějí je v poslední době vzhlíženo k farmakům, která budou schopna regulovat metabolity kynureninové dráhy, a to *via* interakci s NMDA glutamátovými receptory (Modoux *et al*., 2020). Uplatnit by se tedy mohly i syntetické neuroaktivní steroidy, které na tyto receptory cílí také. Zvýšený příjem tryptofanu zvyšuje také množství acetylcholinesterázy v mozkové tkáni (Majumdar and Nakhla, 1977). Dá se tedy předpokládat, že deplece tohoto nutraceutika naopak vyvolá pokles daného enzymu, a tedy sníženou cholinergní signalizaci. Účinek tohoto efektu není přesně prozkoumán. Je ale známo, že serotonergní a cholinergní dráhy jsou provázané (Steckler and Sahgal, 1995; Seyedabadi *et al*., 2014) a serotonin inhibuje uvolňování acetylcholinu v některých částech mozku (Gillet *et al*., 1985; Virk *et al*, 2016). Nabízí se tak prostor pro syntetická farmaka, která figurují jako inhibitory acetylcholinesterázy, a tedy stupňují účinek acetylcholinu na synapsi, či pro látky cílící na cholinergní i glutamátergní systém současně.

3.6.1. Neurosteroidy

Efekt steroidů na excitabilitu CNS poprvé objevil Selye v roce 1941, který reflektoval anestetické účinky po jejich injekci (Selye, 1941). Molekulární mechanismus této indukce byl popsán až v roce 1984 (Harrison and Simmonds, 1984). V CNS vznikají neurosteroidy *de novo* z cholesterolu nebo ze steroidních prekurzorů (Baulieu 1998; Compagnone and Mellon, 2000). Na jejich biosyntéze se podílí řada mitochondriálních a mikrozomálních enzymů, které se vyskytují v neuronech a gliových buňkách. Neurosteroidy se dokážou vázat na receptory neurotransmiterů. Například na $GABA_A$, NMDA, nikotinové, acetylcholinové, glycinové, sigma, napěťově závislé vápníkové a draselné či TRP receptory (Zorumski *et al*., 2013). Ovlivněním těchto receptorů se tak účastní mnoha procesů. Například se podílí na formování synapsí během embryogeneze či regulaci myelinizace (Compagnone and Mellon, 2000). V neposlední řadě mají neuroprotektivní účinky a chrání tak neurony před případným poškozením a buněčnou smrtí.

V případě hyposerotonergních stavů byly zaznamenány změny hladin některých neurosteroidů v různých oblastech mozku (Zorumski *et al*., 2013; Weill-Engerer *et al*., 2002; Marx *et al*., 2006). Díky vazbě na NMDA receptory mají neurosteroidy také pozitivní vliv na kognitivní funkce. Nabízí se tedy možné terapeutické využití syntetických neurosteroidů nejen jako potencionálních antidepresiv (Zorumski *et al*., 2013), anxiolytik (Chojnacka-Wojcik *et al*., 2001), ale i jako neuroprotektorů a modulátorů v procesech paměti a učení (Korinek *et al*., 2011).

V současné době je věnována pozornost hned několika látkám, které vykazují účinky na tomto poli. Neuroprotektivní efekt byl prokázán u blokátoru NMDA receptorů, pregnanolon sulfátu (3α5βS) a jeho dalších syntetických analogů (Weaver *et al*., 2000). U derivátu progesteronu, allopregnanolonu, byly kromě neuroprotektivních účinků prokázány také účinky anxiolytické (Finn *et al*., 2003; Strohle *et al*., 2003) a antidepresivní (Khisti *et al*., 2000). Tyto efekty jsou dány nejspíše potenciací $GABA_A$ receptorů a inhibicí NMDA receptorů (Korinek *et al*., 2011). Allopregnanolon ovlivňuje aktivitu nervové soustavy i prostřednictvím některých kinázových kaskád, například MAPK (Bali and Jaggi, 2014). Zároveň se uplatňuje jako protekční mechanismus při

stresové reakci organismu. Může snižovat výlev CRH a regulovat HPAA (Patchev *et al*., 1994; Romeo *et al*., 1998). Zatím není zcela jasné, zda se na účinku allopregnanolonu podílejí tyto systémy společně nebo nezávisle na $GABA_A$ receptorech (Bali and Jaggi, 2014).

3.6.2. Takrin

9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin (THA; takrin) je nekompetitivní, reversibilní inhibitor acetylcholinesterázy, který byl syntetizován v roce 1945 (Albert and Gledhill, 1945) a v roce 1993 byl původně schválen pro léčbu Alzheimerovy choroby (AD) (Crismon, 1994).

Snížená cholinergní aktivita u pacientů s AD vyústila v cholinergní hypotézu tohoto onemocnění. Hypotéza předpokládá souvislost mezi neuromodulační funkcí acetylcholinu a sníženou schopností učit se a pamatovat si (Bartus *et al*., 1982). Pozitivní vliv na kognitivních funkce není modulován pouze inhibicí acetylcholinesterázy, ale i ovlivněním NMDA receptorů. Bylo zjištěno, že právě takrin cílí nejen na systém cholinergní, ale i na systém glutamátergní (Horak *et al*., 2017). Protože takrin působí také hepatotoxicky, je jeho používání značně omezeno (Watkins *et al*., 1994). Tento fakt vedl ke snaze syntetizovat nové deriváty za účelem zachovat léčebné vlastnosti THA a zároveň omezit jeho toxicitu pro organismus. Z oněch derivátů jmenujme například 9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin (7-methoxytakrin), který byl syntetizován a rozvíjen v České republice (Bielavsky, 1977).

4. Cíle a hypotézy diplomové práce

Cíle této práce vychází z myšlenky, že serotonergní a glutamátergní systémy jsou propojené a bylo ověřeno, že se v případě deplece tryptofanu a koaplikace MK-801 potencují (Bubenikova *et al*., 2004). S ohledem na výše prezentovaná zjištění bylo předpokládáno, že prezentovaný model v této práci bude dostatečně validní pro další experimentální využití. Konkrétně například k testování psychofarmak či k ověření dalších behaviorálních změn v tomto modelu.

Cíle:

1) zavést rychlý behaviorální test pro testování kognitivního poškození,
2) porovnat metody tryptofanové deplece,
3) ověřit vliv koaplikace MK-801 na superiorní metodu z bodu 2),
4) otestovat syntetická psychofarmaka (allopregnanolon a takrin) na daném modelu.

Hypotézy:

1) deplece tryptofanu sníží lokomoční i explorační chování a zvýší anxietu,
2) deplece tryptofanu bude mít potenciační vliv na hyperlokomoční efekt dizocilpinu, sníží úzkostné chování, naruší se zpracovávání informací i rozpoznávání objektů,
3) allopregnanolon normalizuje anxietu bez vlivu na hyperlokomoci, exploraci i zpracovávání informací
4) takrin normalizuje lokomoční aktivitu, explorační chování, úzkostné chování, zpracovávání informací i rozpoznávání objektů.

5. Materiál a metody

5.1. Použitá zvířata

V experimentu byli použiti dospělí (200 – 300 g) samci laboratorního potkana kmene Wistar (SPF; Velaz s.r.o., Konárovice, Česká republika). Zvířata byla ustájena v páru ve standardnch průhledných plastových chovných boxech v klimatizovaném zvěřinci s regulovanou teplotou (±22 °C) i vlhkostí (±40 %) a s pravidelným dvanáctihodinovým světelným cyklem (světla se ráno zapínala vždy v 7:00 hodin). Potkani byli na podmínky zvěřince řádně adaptováni po dobu sedmi dnů a měli volný přístup k potravě i vodě. Zvířata byla též experimentálně naivní a testována pouze jednou.

Všechny 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, a dle projektu pokusu schváleného odbornou komisí.

5.2. Použité látky

Neuroaktivní steroid allopregnanolon (5alpha-pregnan-3alpha-ol-20-one, ALCHIMICA s.r.o) byl rozpuštěn v roztoku 3 g (2-hydroxypropyl)-β-cyklodextrinu (CDX, SigmaAldrich) a 157 mg kyseliny citronové (3-hydroxy-penta-1, 3, 5-trikarboxylová kyselina, Sigma-Aldrich) v 30 ml destilované vody. pH bylo adjustováno na hodnotu 7,4 pomocí hydroxidu sodného (NaOH, Sigma-Aldrich) a následně aplikován v dávce 1 mg/kg dle předchozí studie (Rambousek *et al*., 2011).

Další testovanou látkou byl takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin hydrochlorid hydrát, Sigma-Aldrich) v dávce 1 mg/kg dle předchozí studie (Horak *et al*., 2017), a MK-801 (Sigma-Aldrich) v dávce 0,1 a 0,15 mg/kg. Tyto látky byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku (B Braun). Testované látky byly zvířatům aplikovány intraperitoneálně a vždy byl aplikován 1 ml roztoku na 1 kg tělesné hmotnosti. Zvířata byla testována a dekapitována nejméně po 20 minutách od aplikace příslušné látky.

5.3. Metodické postupy

5.3.1. Zavedení tryptofanové deplece

5.3.1.1. Akutní

V případě akutní tryptofanové deplece byla zvířata nejprve handlována a adaptována na boxy i dietu po dobu 7 dnů. Před začátkem experimentu hladověla nejméně 12 hodin. Následně byla separátně rozdělena do boxů a vystavena expozici směsi bez obsahu tryptofanu v průhledných plastových miskách. Směs byla namíchána dle Lieben a kol. (2004a) a skládala se z 50 g Solugelu® (Solugel PP, SSNIFF Spezialdiaten GmbH), 90 ml vody, 25 g glukózového sirupu (Monaco Inst. s.r.o.). Kontrolní dietou byla stejná směs jen s obsahem 0,14 g L-TRP (Green Medical s.r.o.). Obě diety byly podávány v množství 10 ml směsi na 1 kg živé hmotnosti. Zvířata byla testována a dekapitována minimálně 1 hodinu po expozici směsi, ne déle než 6 hodin. V průběhu experimentu neměla zvířata přístup k enrichmentu. K testování byla vybrána pouze zvířata v dobrém zdravotním stavu a do každé experimentální skupiny byla náhodně rozdělena po osmi jedincích.

5.3.1.2. Chronická

Na místo standartní diety byla potkanům podávána krmná dávka ve formě pelet (SSNIFF Spezialdiaten GmbH) bez obsahu tryptofanu a s obsahem tryptofanu pro kontrolní skupinu. Zvířata byla krmena *ad libitum*. Dieta byla takto podávána nejméně 7 dnů před experimenty a dekapitace proběhla 14 dnů od začátku diety. V průběhu experimentu neměla zvířata přístup k enrichmentu.

5.3.2. Behaviorální testy

5.3.2.1. Open field

Při tomto behaviorálním testu bylo zvíře umístěno do otevřené plastové černé čtvercové arény (průměr 90 cm). Trajektorie zvířete byla snímána kamerou a současně zaznamenána počítačovým programem Ethovision XT (Noldus Information Technologies). Zvíře bylo nahráváno po dobu 5 minut a analýza se zaměřovala na celkovou uraženou dráhu. Potkan byl do arény pokládán vždy ze stejné strany čelem ke stěně. Aparatura byla umístěna v samostatné místnosti s definovaným osvětlením (75 lx) a před každým jednotlivým testováním byla očištěna ethanolem a vodou. Hodnocena byla celková dráha uražená zvířetem jakožto ukazatel lokomoční aktivity.

5.3.2.2. Vyvýšené křížové bludiště

Zvíře bylo vloženo do vyvýšené aparatury z černého plastu tvaru stejnoramenného kříže. Dvě ramena byla otevřená (bez okrajů) a dvě uzavřená (ohraničena okraji, výška 15 cm). Délka každého ramene byla 30 cm, šířka 5 cm. Celé bludiště bylo vyvýšeno 45 cm nad zemí a bylo osvětleno definovaným umělým světlem (75 lx). Aparatura se nacházela v separátní místnosti a před každým jednotlivým testováním byla očištěna ethanolem a vodou. Zvíře bylo vkládáno do středu aparatury tak, aby hlavou přímo nesměřovalo do žádných z ramen. Následně byla zaznamenávána spontánní aktivita, hodnoceny zejména počty vstupů a čas strávený v otevřených ramenech jako parametr anxtiety. Aktivita byla nahrávána kamerou a současně zaznamenána počítačovým programem Ethovision XT (Noldus Information Technologies). Za vstup byla považována situace, kdy byl potkan celým trupem v rameni bludiště.

5.3.2.3. Novel object recognition task/location task

Při zavádění metody NORT a testu rozpoznávání nové pozice objektu (novel object location task; NOLT) bylo nejprve použito dvanáct intaktních zvířat kmene Wistar. Při experimentech bylo použito vždy osm zvířat ve skupině. Oba testy byly modifikovány dle Ennaceur a Delacour (1988).

První den se zvíře nechalo volně explorovat čtvercovou arénu po dobu 5 minut. Druhý den byly do arény přidány dva stejné objekty umístěné diagonálně do rohů (20 cm od stěny arény) a opět se potkan nechal volně zkoumat arénu po dobu 5 minut. V případě NORT byl hodinu na to jeden z objektů vyměněn za nový a potkan znovu na 5 minut vpuštěn do arény. NOLT byla změněna pozice jednoho z objektů. Aby se zabránilo okamžité exploraci, bylo zvíře vypouštěno vždy čelem ke zdi odvrácené od objektů.

Jako objekty sloužily nejdříve barevně odlišené dřevěné tvary trojúhelníku a válce. Ovšem ukázalo se, že jeden z objektů byl pro zvířata signifikantně zajímavější než ten druhý, a to bez ohledu na novost. Následně byly zvoleny jiné objekty. Konkrétně průhledná plastová dóza naplněná vodou a skleněná nádoba s barevnými gumičkami.
Pro tento test byla použita stejná otevřená plastová černá čtvercová aréna jako v případě open fieldu. Aparatura byla umístěna v samostatné místnosti s definovaným osvětlením (75 lx). Aréna i objekty byly před každým jednotlivým testováním očištěny ethanolem a vodou. Sledována byla doba strávená explorací objektů. Za exploraci bylo považováno očichávání a zkoumání objektu do 2 cm od objektu. Panáčkování na objektu nebylo hodnoceno jako explorace. Aktivita byla nahrávána kamerou a současně zaznamenána počítačovým programem Ethovision XT (Noldus Information Technologies). Hodnocena byla míra explorace starého a nového objektu či pozice, dále pak míra explorace celkové (součet explorace starého a nového objektu) a diskriminační index (rozdíl doby explorace nového a starého objektu k součtu doby explorace nového a starého objektu).

5.3.2.4. Prepulzní inhibice

Zvíře bylo umístěno dvou větraných boxů (SR-LAB, San Diego Instruments, Kalifornie, USA), z nichž každá obsahovala zvukově izolovanou rovnoměrně osvětlenou komoru se stabilizátorem v podobě tunelu z plexiskla (vnitřní průměr 8,7 cm) a desku citlivou na

otřesy. Aparatura byla umístěna v samostatné místnosti a před každým experimentem očištěna ethanolem a vodou. Ve výšce 24 cm nad tunelem z plexiskla se nacházel vysokofrekvenční reproduktor, který vytvářel zvukové prestimuly a stimuly. Hladiny zvuku byly měřeny pomocí hlukoměru RadioShack. Kalibračním systémem byla zajištěna stejná citlivost stabilizátoru a pomocí piezoelektrického akcelometru v detekční podlážce byla zjištěna průměrná amplituda úleková odpovědi zvířete, která byla následně digitalizována a použita pro analýzu.

Experiment se skládal ze dvou sezení, kdy před samotným testem bylo zvíře dva dny předem habituováno na aparaturu pomocí pětiminutového tréninku bez dietetické manipulace i bez použití farmak. Trénink se skládal z pěti samostatných pulzních podnětů (115 dB/20 ms) na pozadí bílého šumu (75 dB).

V den testu trvalo celé sezení pro jedno zvíře 37 minut (bylo provedeno celkem 72 běhů s intervalem 4 – 20 s mezi běhy). Potkani byli nejprve po dobu 5 minut na pozadí bílého šumu (75 dB) ponecháni v komoře. Poté bylo provedeno šest běhů se samostatnými stimuly o hlasitosti 125 dB po dobu 40 ms, dle toho byla stanovena základní úroveň akusticky vyvolané úlekové reakce (acoustic startle reflex; ASR). Zbylých 60 běhů bylo provedeno pseudonáhodně a skládaly se z:

1. samostatného pulzu o hlasitosti 125 dB po dobu 40 ms,
2. kombinace prepulz-pulz, s prepulzem o hlasitosti 83 dB nebo 91 dB po dobu 20 ms, s intervaly mezi pulzy 30, 60 či 120 ms a pulzem o hlasitosti 125 dB po dobu 40 ms,
3. žádného stimulu po dobu 60 ms.

Sezení bylo zakončeno šesti samostatnými pulzy. Výsledné procento PPI, jakožto ukazatel zpracování informací, bylo vypočteno jako rozdíl průměrných hodnot pulzů a prepulzů-pulzů, takto: [100 - (průměrná odpověď na prepulz-pulz/průměrná odpověď na samostatný pulz) $*$ 100]. Průměrná ASR byla odvozena ze samostatných pulzů.

5.3.3. Disekce a biochemická analýza tkání

Zvířata byla dekapitována bez použití chemické anestezie. Následně byl vyjmut mozek a odebrána krev. Disekce tkání probíhala na ledem chlazené desce. Izolována byla tkáň prefrontálního kortexu, hipokampu a striata z pravé i levé hemisféry. Vzorky (2 – 80 mg) byly hluboce zmraženy (-80 °C) a následně připraveny pro účely biochemické analýzy pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (ultra high performance liquid chromatography, UHPLC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem. Vzhledem k tomu, že nebyl předpokládán rozdíl mezi metabolity levé a pravé hemisféry, byly pro účely práce použity pouze tkáně hemisféry levé a analyzovány byly pouze vzorky levého hipokampu. Krev byla po odebrání centrifugována (1000 RCF, 10 minut). Získané sérum (1 ml) bylo hluboce zamrazeno (-80 °C) a následně připraveno pro účely biochemické analýzy pomocí UHPLC.

Analýzy v této práci byly provedeny pomocí přístroje Dionex Ultimate 3000 UHPLC RS (ultra high performance liquid chromatography rapid separation) sestávající z pumpy, kolony, autosampleru a detektoru s diodovým polem řízeného softwarem Chromeleon (verze 7.2.9. build 11323) (Thermo Fisher Scientific, Germering, Německo) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Q Exactive Plus Orbitrap se softwarem Thermo Xcalibur (verze 3.1.66.10.) (Thermo Fisher Scientific, Brémy, Německo). Detekce byla provedena hmotnostní spektrometrií v pozitivním režimu.

Výsledky byly přepočítány dle hmotnosti vzorku. I přes to, že byly vzorky odebrány ve skupinách, z nichž každá čítala 8 zvířat, byly některé metabolity ve vzorcích, zejména kortikosteron, pod limitem detekce. Takové hodnoty tedy nebyly zařazeny do statistické analýzy.

5.3.4. Statistické zpracování dat

Získaná data byla upravena v programu Microsoft Excel verze 2102. Následně byla podrobena statistické analýze v programu GraphPad verze 8.4.3. (686) a vynesena do boxových grafů. Pro porovnání dvou skupin a data, která odpovídala standartnímu rozložení, byl použit nepárový t-testu. Pro porovnání tří a více skupin a data, která odpovídala standartnímu rozložení, byla použita parametrická analýza rozptylu

(ANOVA) v podobě mnohonásobného porovnávání za využití *post hoc* Tukeyho testu. V případě NORT byla data nestandartního rozložení analyzována pomocí Wilcoxonova párové testu, v případě standartního rozložení dat byl použit t-test, ANOVA a Tukeyho test. Z analýzy byla vyřazena data zvířat, která odmítala explorovat. V případě biochemických markerů byla vyřazena data pod limitem detekce či data, které byla nestandartně odchýlená. Rozdíl byl považován za signifikantní pro $p < 0,05$, za nesignifikantní pak pro $p > 0,05$.

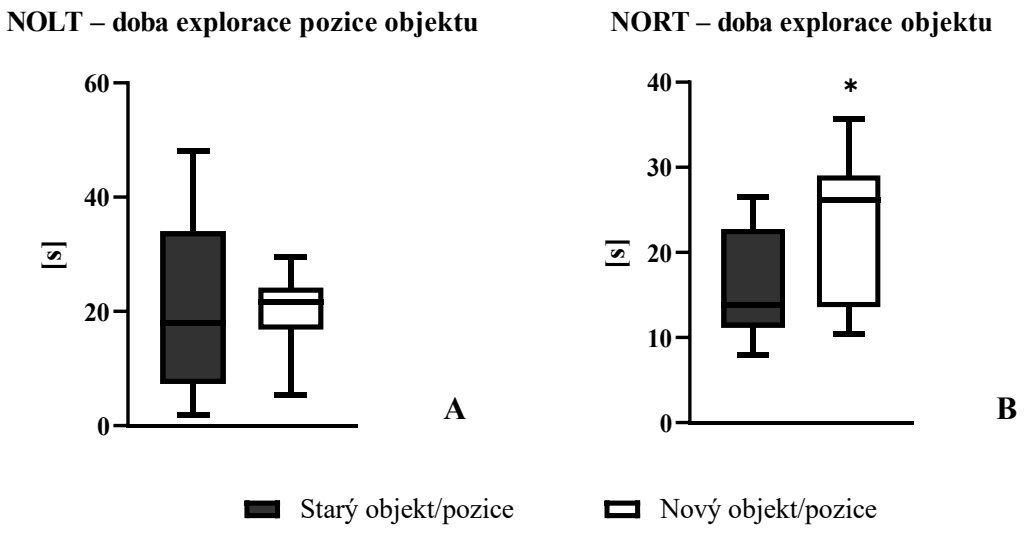
6. Výsledky

6.1. Zavedení kognitivního testu

Cílem této fáze bylo vybrat vhodný test, který bude následně použit pro testování kognitivního deficitu v animálním modelu tryptofanové deplece. Kognitivní testy byly vybrány na základě literární rešerše, kde většina autorů pracovala s testy rozpoznávání objektů (Rutten *et al*., 2007; Olivier *et al*., 2008; Olivier *et al*., 2009; van Donkelaar *et al*., 2008).

Zaváděn byl test rozpoznávání nového objektu a test rozpoznávání nové pozice objektu. Tyto dva testy se používají k testování paměťových procesů. Zatímco NORT je zaměřen na neprostorové učení a rozpoznávání objektů, u NOLT je zapojeno také učení prostorové a ve vetší míře závisí na aktivitě hipokampu (Denninger *et al*., 2018). Oba testy vychází z tendence potkanů projevovat v těchto experimentech větší zájem o podněty nové než o ty staré (Cohen and Stackman, 2015).

V testu NOLT nebyla prokázána žádná signifikantní reakce na změnu pozice objektu. V případě NORT zvířata signifikantně (p = 0,0498) dávala přednost novému objektu před starým (viz. graf. B).



Grafy 6.1.: A: doba explorace staré a nové pozice intaktními zvířaty v závislosti na čase; B: doba explorace starého a nového objektu intaktními zvířaty v závislosti na čase. * p <0,05, n = 12. Byl použit Wilcoxonův párový test.

6.2. Komparace metod tryptofanové deplece

V této fázi experimentu byly porovnávány jednotlivé metody tryptofanové deplece a vliv hladovění před konzumací diety.

Cílem bylo vybrat superiorní metodu, která vykazovala nejlepší výsledky v behaviorálním testování i v biochemické analýze a dále jí rozvíjet s koaplikací MK-801.

Zvířata byla rozdělena do šesti skupin po osmi jedincích:

1) skupina intaktních jedinců se standartní dietou *ad libitum* (intaktní zvířata),
2) skupina akutně krmena kontrolní směsí s L-TRP bez předchozího hladovění (Trp^+ bez hladovění),
3) skupina akutně krmena kontrolní směsí s L-TRP s předchozím hladověním (Trp^+ s hladověním),
4) skupina akutně krmena směsí bez L-TRP a bez předchozího hladovění (Trp^- bez hladovění),
5) skupina akutně krmena směsí bez L-TRP s předchozím hladověním (Trp^- s hladověním),
6) skupina krmena směsí bez L-TRP v podobě slisovaných pelet nejméně po dobu sedmi dnů (Chronická Trp^-).

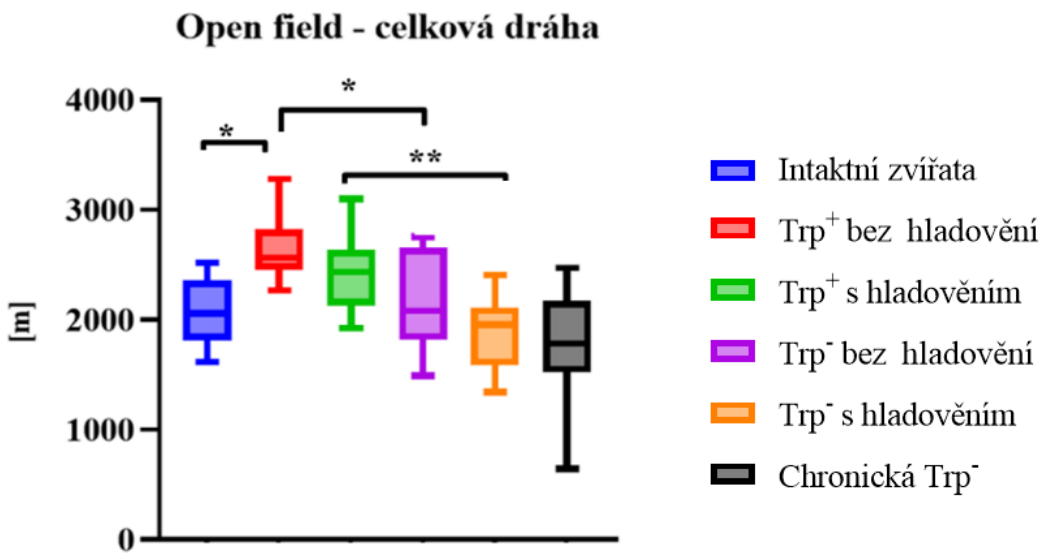
Všechny metody tryptofanové deplece způsobily snížení hodnot tryptofanu ve tkáni levého hipokampu, avšak bez vlivu na hodnoty serotoninu. Poměr KYN/KYNA byl vychýlen pouze v případě chronické deplece tryptofanu. Koncentrace tryptofanu v krevním séru byla signifikantně snížena vlivem dietetické manipulace pouze v případě chronické deplece. V případě akutní deplece se koncentrace tryptofanu zvýšila předchozím hladověním před indukcí deplece stejně jako poměr celkového a volného tryptofanu. Hladiny kortikosteronu v krevní séru zůstaly ve všech případech nezměněné.

V behaviorálních testech se po indukci akutní tryptofanové deplece s předchozím hladověním projevovalo snížené explorační chování, hypolokomoce a zvýšené anxiózní chování bez vlivu na úlekovou reakci.

Nejvíce superiorně se, jak biochemicky tak i behaviorálně, jevila metoda akutní tryptofanové deplece s hladověním. A proto se při koaplikaci MK-801 pracovalo pouze s touto metodou.

6.2.1. Behaviorální testy

6.2.1.1. Open field



Graf 6.2.1.1: Po indukci akutní tryptofanové deplece s hladověním se signifikantně ($p = 0{,}009$) snížila celková uražená vzdálenost zvířat v OF. Je patrný rozdíl mezi celkovou uraženou vzdáleností intaktních zvířat a zvířat po konzumaci kontrolní směsi s tryptofanem. Kdy skupina Trp^+ bez hladovění urazila delší vzdálenost než intaktní jedinci. V případě chronické tryptofanové deplece nebyla celková uražená vzdálenost signifikantně rozdílná v porovnání s intaktními jedinci.

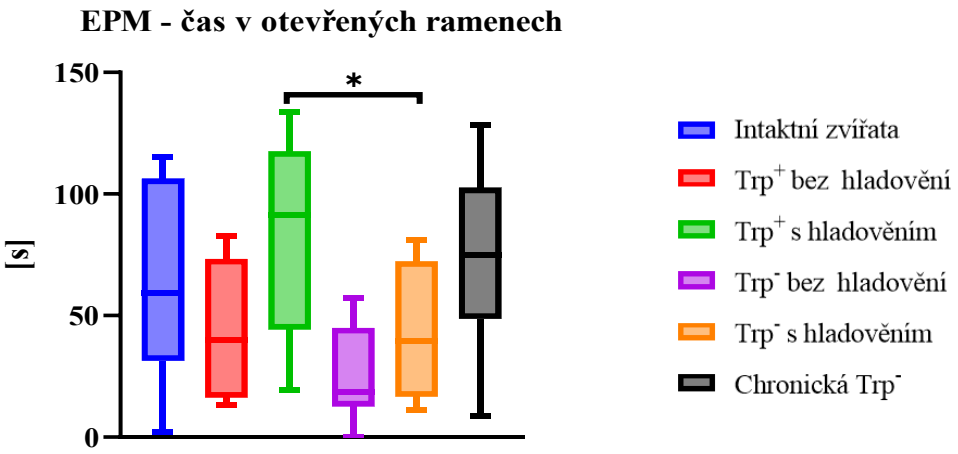
* $p < 0{,}05$ pro skupinu Trp^+ bez hladovění oproti skupině intaktních zvířat,

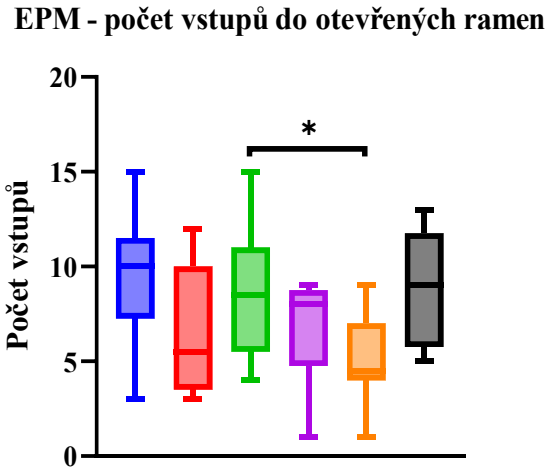
* $p < 0{,}05$ pro skupinu Trp^- bez hladovění oproti skupině Trp^+ bez hladovění,

** $p < 0{,}01$ pro skupinu Trp^- s hladověním ve srovnání se skupinou Trp^+ s hladověním,

$n = 8$. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

6.2.1.2. EPM



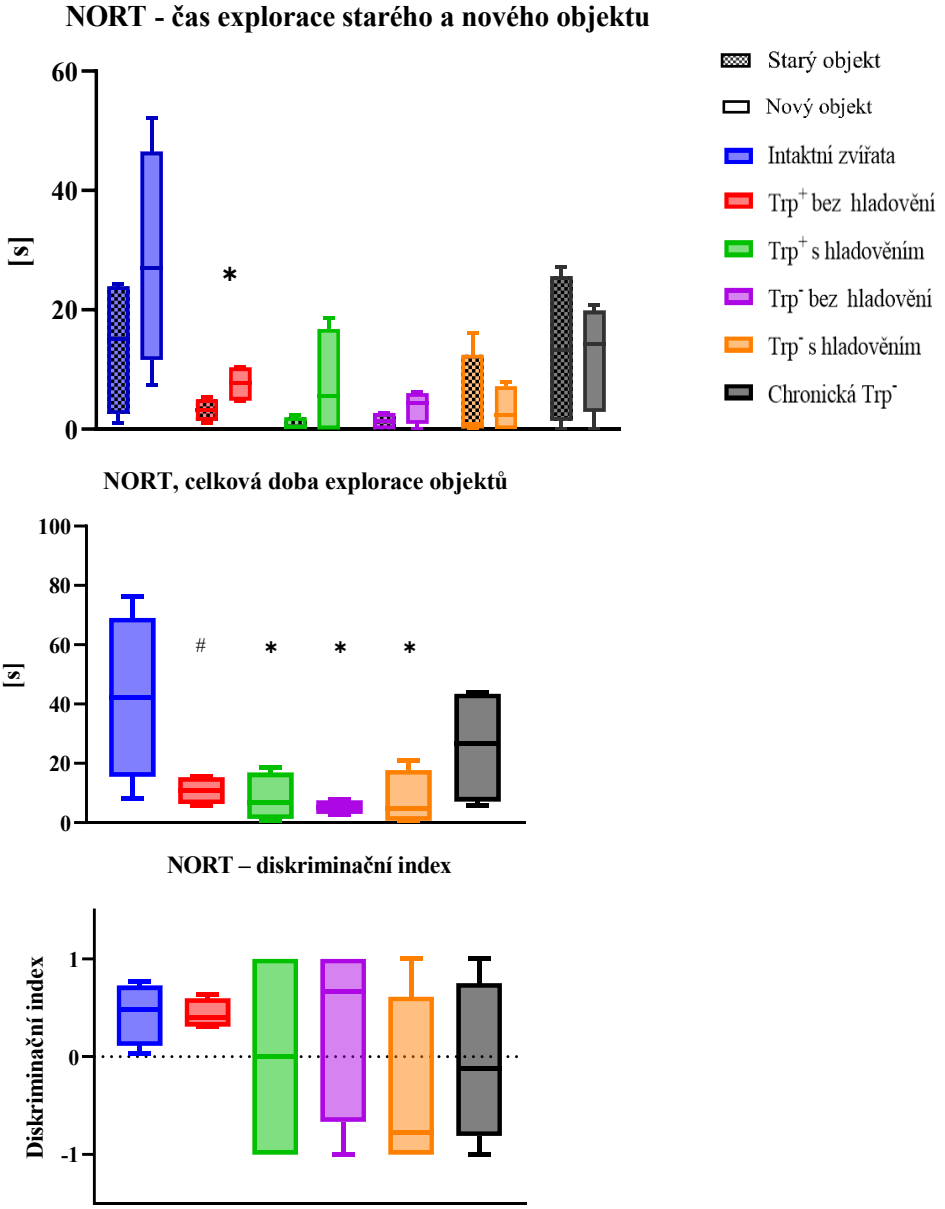


Grafy 6.2.1.2.: Po indukci akutní tryptofanové deplece s předchozím hladověním se signifikantně ($p = 0{,}0281$) snížil čas pobytu zvířat v otevřených ramenech a snížil se také počet vstupů do otevřených ramen ($p = 0{,}0358$) oproti zvířatům, která byla krmena kontrolní dietou s tryptofanem. V případě chronické tryptofanové deplece nebyl význačný rozdíl v porovnání s intaktními jedinci.

* $p < 0{,}05$ pro skupinu Trp^- s hladověním ve srovnání se skupinou Trp^+ s hladověním,

$n = 8$. Byl použit t-test.

6.2.1.3. NORT

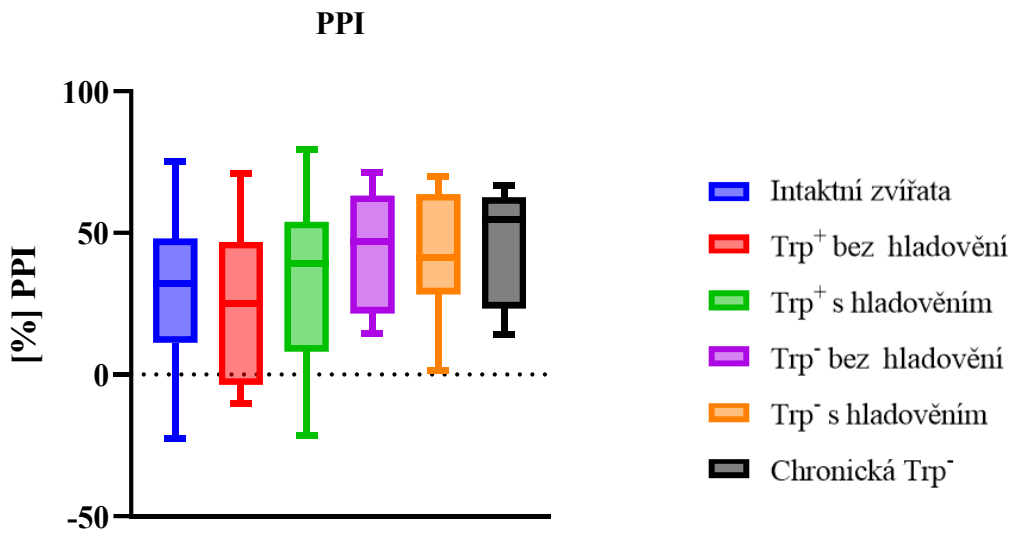


Grafy 6.2.1.3.1: Po indukci tryptofanové deplece nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl ve zkoumání objektů mezi skupinami. Po indukci akutní tryptofanové deplece s hladověním ($p = 0{,}0498$) i bez hladovění ($p = 0{,}0276$) byl zaznamenán pokles exploračního chování. Z diskriminačního indexu je patrné, ne však signifikantně, že intaktní zvířata a Trp^+ zvířata bez hladovění dávala přednost novému objektu před starým. V ostatních skupinách se trend neukázal a žádný s objektů tak nebyl signifikantně diskriminován.

* $p < 0{,}05$ pro srovnání explorace starého a nového objektu u skupiny Trp^+ bez hladovění,

* $p < 0{,}05$ ve srovnání se skupinou intaktních zvířat,
# $p = 0{,}0794$ oproti intaktním zvířatům,
$n = 4$. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

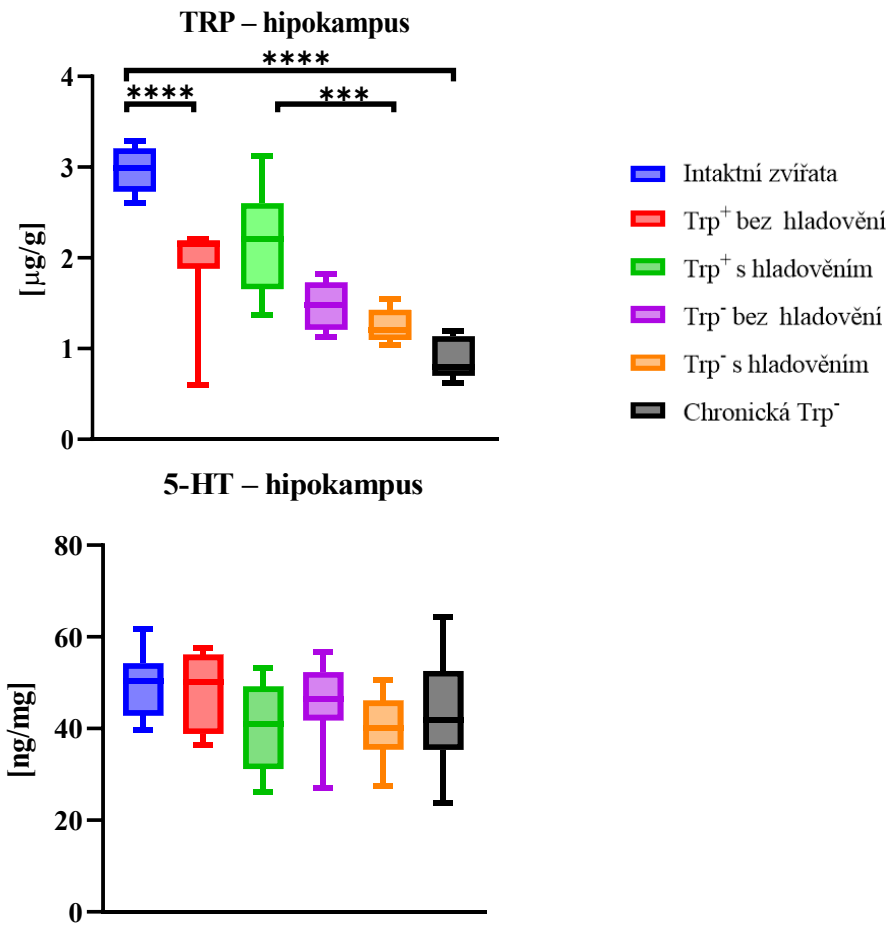
6.2.1.4. PPI



Graf 6.2.1.4.: Po indukci akutní ani chronické tryptofanové deplece nebyl zaznamenán význačný rozdíl v úlekové reakci mezi skupinami. n = 8. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

6.2.2. Biochemická analýza

6.2.2.1. Mozková tkáň

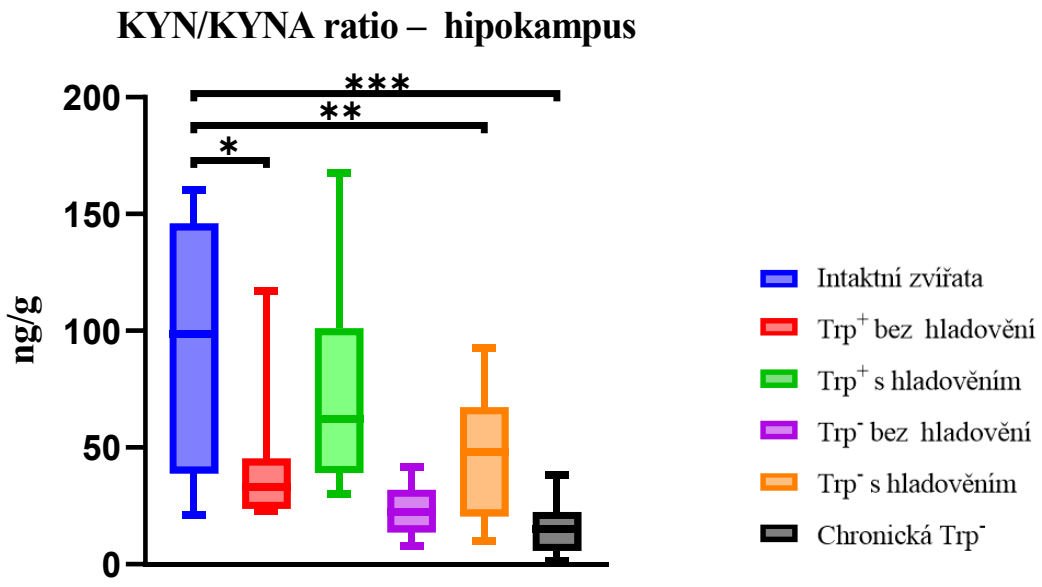


Grafy 6.2.2.1.1.: Ve vzorcích tkáně levého hipokampu nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi hodnotami serotoninu po indukci tryptofanové deplece, a to i přes jasný pokles hodnot tryptofanu v tkáni. Dále je také patrný pokles tryptofanu v tkání zvířat, které konzumovali kontrolní sacharidovou směs oproti intaktním zvířatům.

*** p <0,001 pro skupinu Trp^- s hladověním v porovnání se skupinou Trp^+ s hladověním,

**** p <0,0001 pro skupinu Chronická TRP^- v porovnání s intaktními jedinci,

n = 8. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.



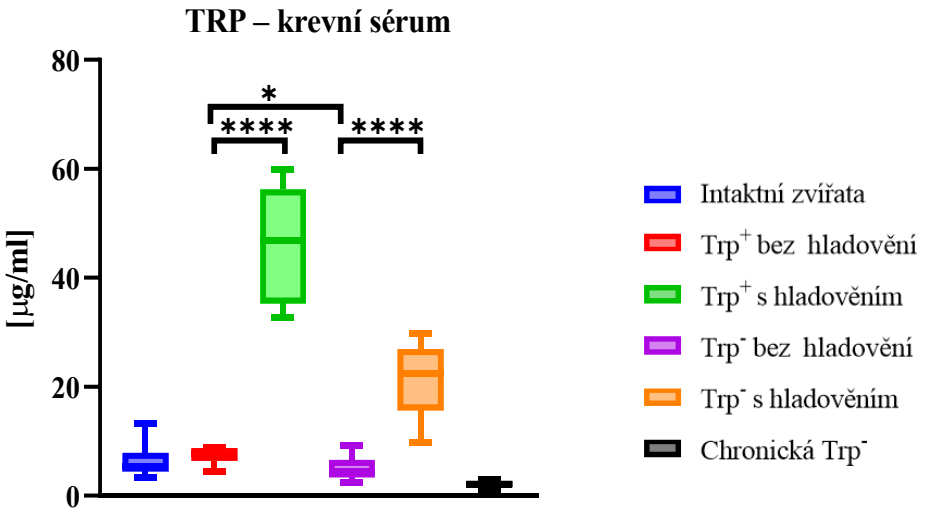
Graf 6.2.2.1.2.: Indukce chronické tryptofanové deplece signifikantně (p=0,0007) vychýlila poměr KYN/KYNA ve prospěch kyseliny kynureninové. V případě akutní deplece tryptofanu bez hladovění byl poměr KYN/KYNA také signifikantně (p=0,0028) změněn oproti intaktním zvířatům., ne však oproti kontrolní skupině. Snížený poměr KYN/KYNA je také patrný v tkáni zvířat, které konzumovali kontrolní sacharidovou směs (p=0,0205) oproti intaktním zvířatům.

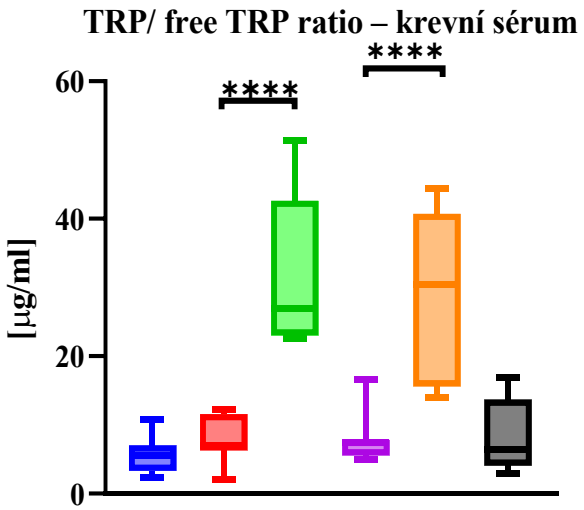
* $p < 0,05$ pro Trp^- bez hladovění oproti skupině intaktních jedinců,

** $p < 0,01$ pro Chronickou Trp^- oproti intaktním zvířatům,

n = 8. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

6.2.2.2. Krevní sérum





Grafy 6.2.2.2.1: Pouze tryptofanová deplece bez hladu snížila množství tryptofanu v krevním séru, ale na poměr celkového a vázaného tryptofanu vliv neměla. Zvířata, která byla vystavena hladovění vykázala zvýšení tryptofanu v séru a zároveň byl vychýlen poměr TRP/free TRP v neprospěch volného tryptofanu.

* p <0,05 pro skupinu TRP $^{-}$ bez hladovění oproti skupině TRP $^{+}$ bez hladovění,

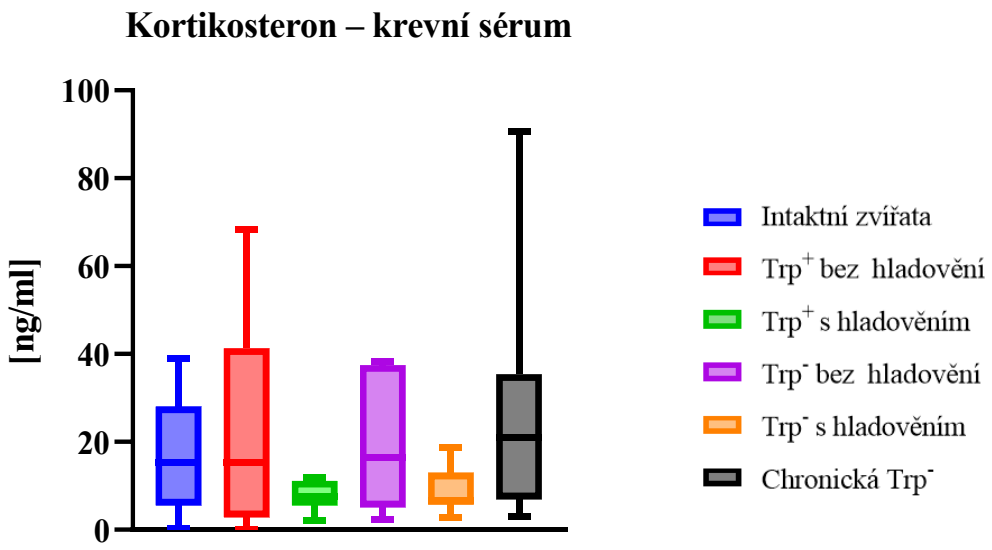
**** p <0,0001 pro skupinu Trp + s hladověním oproti Trp + s hladověním,

**** p <0,0001 pro Trp $^{-}$ s hladověním oproti skupině Trp $^{-}$ bez hladovění,

**** p <0,0001 pro Trp^{+} s hladověním oproti skupině Trp^{+} bez hladovění,

**** p <0,0001 pro Trp^{-} s hladověním oproti skupině Trp^{-} bez hladovění,

n = 7 pro skupinu Trp^{+} bez hladovění a Trp^{-} s hladověním, kdy z každé skupiny byla vyřazena jedna výrazně odlehlá hodnota. n =8 pro všechny ostatní skupiny. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.



Grafy 6.2.2.2.2: Deplece tryptofanu neměla signifikantní vliv na hodnoty kortikosteronu v krevním séru. n = 7 pro skupinu Trp^+ s hladověním, n = 6 pro skupinu Trp^- bez hladovění, n = 8 pro všechny ostatní skupiny. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

6.3. Koaplikace MK – 801

V této fázi byla nejdříve laděna optimální dávka dizocilpinu na zvířatech s normální dietou a následně na zvířatech s deplecí tryptofanu. Dále byl sledován vliv aplikace fyziologického roztoku.

Cílem této fáze bylo vybrat vhodnou koncentraci dizocilpinu a dále jí rozvíjet s koaplikací psychofarmak.

Zvířata v experimentu byla rozdělena do osmi skupin po osmi jedincích:

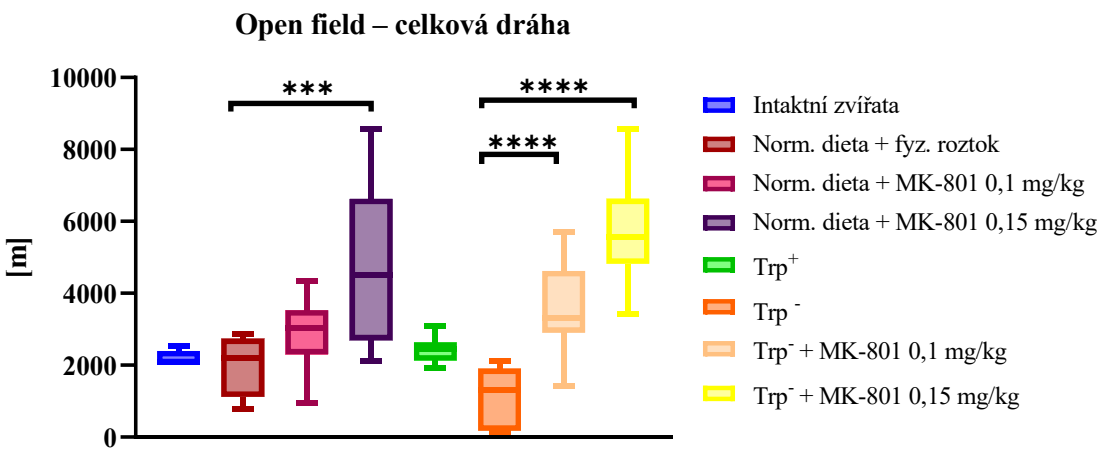
1) v rámci redukce počtu zvířat byla použita skupina intaktních jedinců z fáze komparace deplece se standartní dietou *ad libitum* (intaktní jedinci),
2) skupina jedinců se standartní dietou *ad libitum* a koaplikací fyziologického roztoku (Norm. dieta + fyz. roztok),
3) skupina jedinců se standartní dietou *ad libitum* s koaplikací MK-801 v koncentraci 0,1 mg/kg (Norm. dieta + MK-801 0,1 mg/kg),
4) skupina jedinců se standartní dietou *ad libitum* s koaplikací MK-801 v koncentraci 0,15 mg/kg *(*Norm. dieta + MK-801 0,15 mg/kg*)*,
5) v rámci redukce počtu zvířat byla použita skupina z fáze komparace deplece, akutně krmena kontrolní směsí s L-TRP s předchozím hladověním (Trp^+),
6) v rámci redukce počtu zvířat byla použita skupina z fáze komparace deplece, akutně krmena směsí bez L-TRP s předchozím hladověním (Trp^-),
7) skupina akutně krmena směsí bez L-TRP s předchozím hladověním a koaplikací MK-801 v koncentraci 0,1 mg/kg (Trp^- + MK-801 0,1 mg/kg),
8) skupina akutně krmena směsí bez L-TRP s předchozím hladověním a koaplikací MK-801 v koncentraci 0,15 mg/kg (Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg).

Získaná data naznačují, že aplikace dizocilpinu neměla signifikantní vliv na hodnoty tryptofanu v mozkové tkáni. Byl však zaznamenám pokles tryptofanu v levém hipokampu po aplikaci fyziologického roztoku. S vyšší dávkou dizocilpinu, se snížil poměr hodnot KYN/KYNA i serotoninu v mozkové tkáni, a také hladina tryptofanu i kortikosteronu v krevním séru.

V behaviorálních testech se se vzrůstající dávkou dizocilpinu zvyšovala i hyperlokomoce zvířete a snižovalo anxiózní chování i úleková reakce. I přesto, že dizocilpin setřel behaviorální projevy tryptofanové deplece, nezdá se, že by tato koaplikace měla na výsledné chování ani biochemické ukazatele vetší vliv než aplikace dizocilpinu při normální dietě. Nejsilněji se v experimentech jevila dávka 0,15 mg/kg. Následně se tedy pokračovalo pouze s touto dávkou.

6.3.1. Behaviorální testy

6.3.1.1. Open field



Graf 6.3.1.1.: Po koaplikaci dizocilpinu urazila zvířata delší vzdálenost než zvířata z kontrolních skupin. Je patrné, že s koncentrovanější dávkou dizocilpinu vzrůstá i uražená vzdálenost v open fieldu. Avšak efekt vzájemné potenciace dizocilpinu s deplecí tryptofanu zjištěn nebyl. Aplikace fyziologického roztoku ani kontrolní směs neměla žádný vliv.

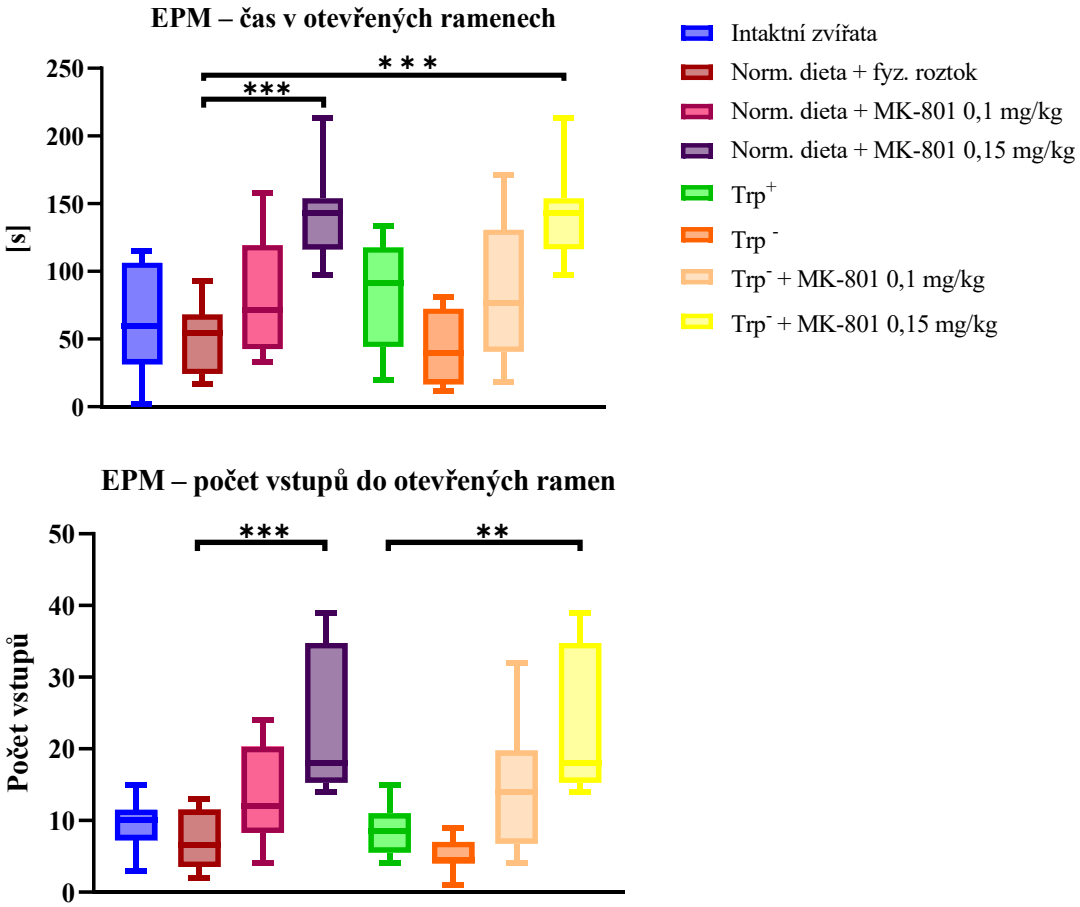
*** p <0,001 pro skupinu Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg v porovnání se skupinou Norm.dieta + fyz.roztok,

**** p <0,0001 pro skupinu pro skupinu Trp^- + MK-801 0,1 mg/kg v porovnání se skupinou Trp^-.

**** p <0,0001 ve srovnání se skupinou Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg v porovnání se skupinou Trp^-,

n = 8. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

6.3.1.2. EPM



Grafy 6.3.1.2.: V případě vyvýšeného křížového bludiště vykazovala zvířata po aplikaci dizocilpinu v dávce 0,15 mg/kg signifikantně sníženou anxietu reprezentovanou zvýšeným počtem vstupů do otevřených ramen a strávila v nich také delší čas. Tento efekt nebyl zaznamenán v případě nižší dávky dizocilpinu. Prokázán nebyl ani vliv deplece tryptofanu při koaplikaci dizocilpinu. Aplikace fyziologického roztoku ani kontrolní směs neměla žádný vliv.

**** p <0,0001 pro skupinu Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg v oproti skupině Norm. dieta + fyz. roztok,

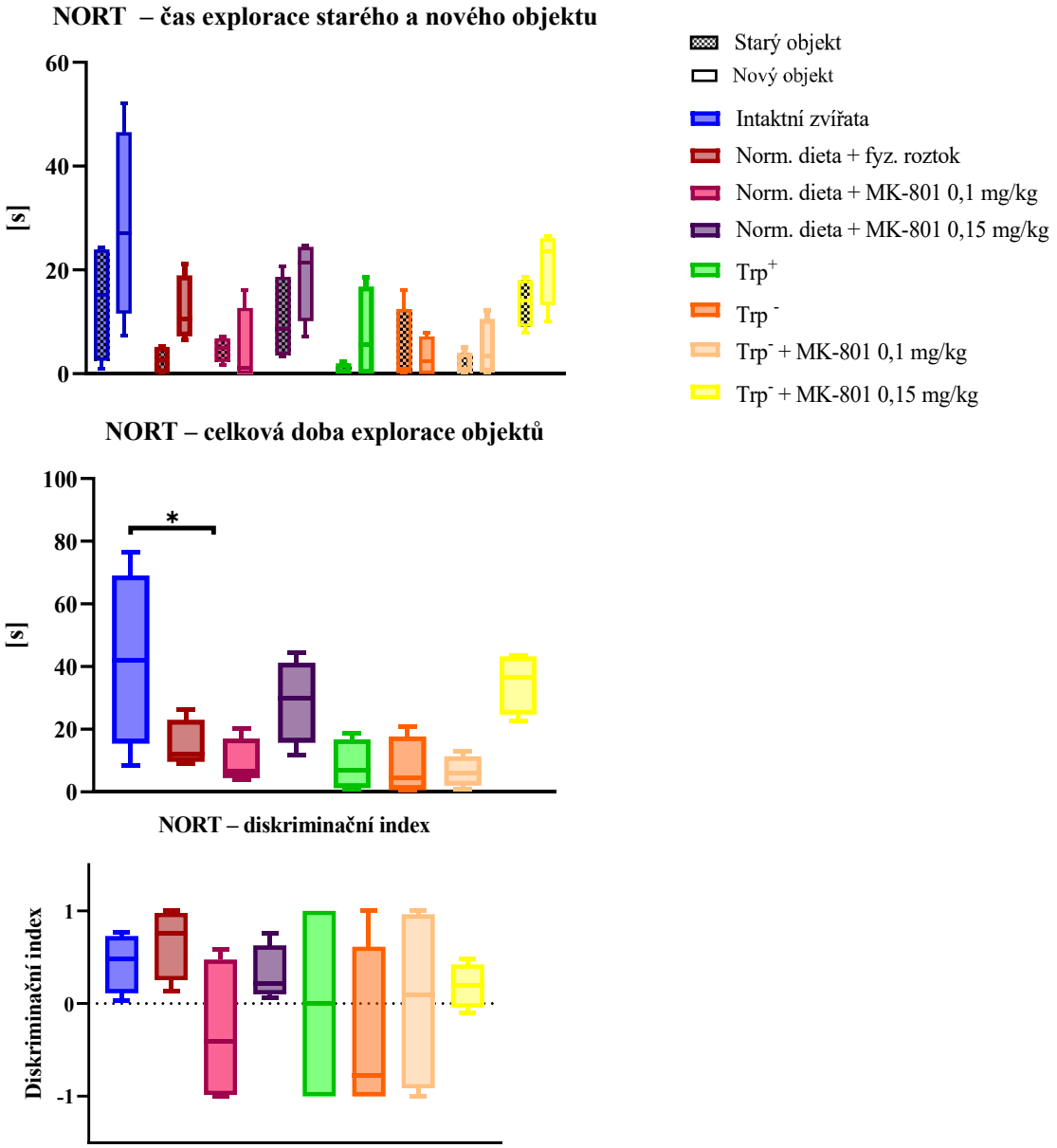
****p <0,0001 pro skupinu Norm. dieta + MK-801 0,15 mg/kg oproti skupině Norm. dieta + fyz. roztok,

*** p <0,001 pro skupinu Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg v oproti skupině Norm. dieta + fyz. roztok,

** p <0,01 pro skupinu Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg v oproti skupině Trp^+,

n = 8. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

6.3.1.3. NORT

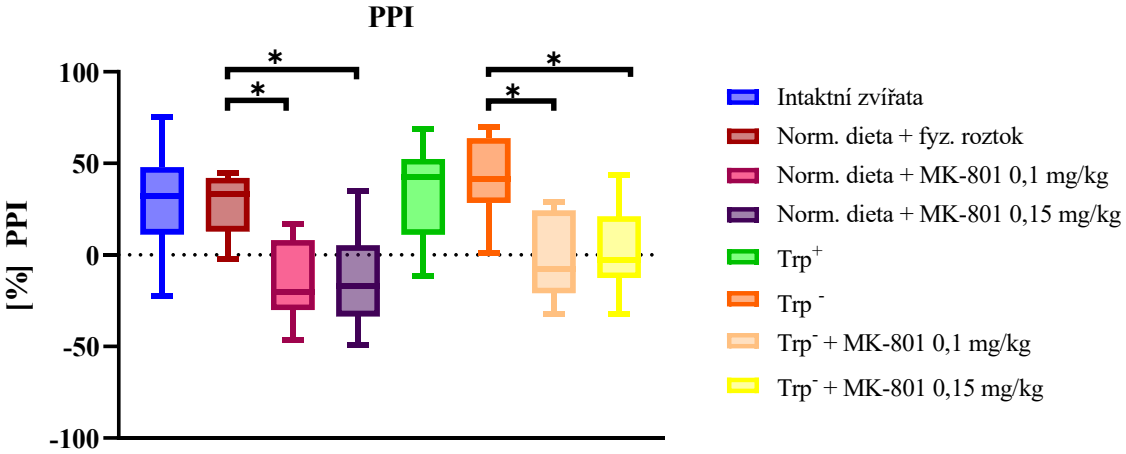


Grafy 6.3.1.3.: Po aplikaci dizocilpinu nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl ve zkoumání objektů mezi skupinami. Po aplikaci dizocilpinu v dávce 0,1 mg/kg byl zaznamenán nárůst exploračního chování. Z diskriminačního indexu je patrné, že ani jeden z objektů nebyl výrazně preferován ani diskriminován.

* p <0,05 pro skupinu Norm. dieta + MK-801 0,1 mg/kg oproti skupině Intaktních zvířat

n = 4. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

6.3.1.4. PPI



Graf 6.3.1.4.: Aplikace dizocilpinu narušila PPI v obou dávkách v podobné míře. Deplece tryptofanu spolu s koaplikací dizocilpinu neměla větší vliv než samotný dizocilpin. Zvířata aplikovaná fyziologickým roztokem nevykazovala disrupci v PPI.

* p <0,05 pro skupinu Norm. dieta + MK-801 0,1mg/kg oproti skupině Norm. dieta + fyz. roztok,

* p <0,05 pro skupinu Norm. dieta + MK-801 0,15 mg/kg oproti skupině Norm. dieta + fyz. roztok

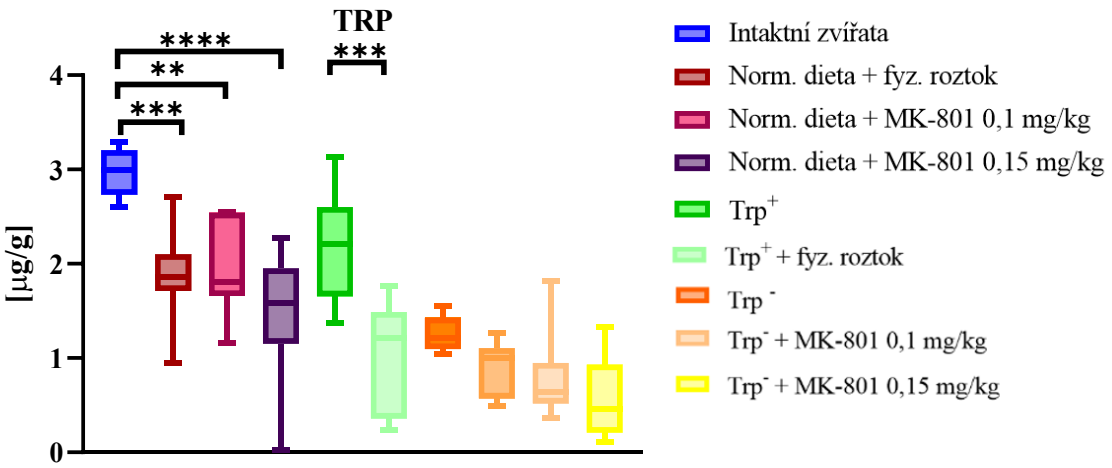
* p <0,05 pro skupinu Trp^- + MK-801 0,1 mg/kg v porovnání se skupinou Trp^+,

* p <0, 05 pro skupinu Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg v porovnání se skupinou Trp^+,

n = 8. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

6.3.2. Biochemická analýza tkání

6.3.2.1. Mozková tkáň



Graf 6.3.2.1.1.: Aplikace dizocilpinu neměla vliv na hodnoty tryptofanu v mozkové tkáni. A však ukazuje se signifikantní vliv aplikace fyziologického roztoku, který zapříčinil snížení hodnot tryptofanu v tkáni levého hipokampu.

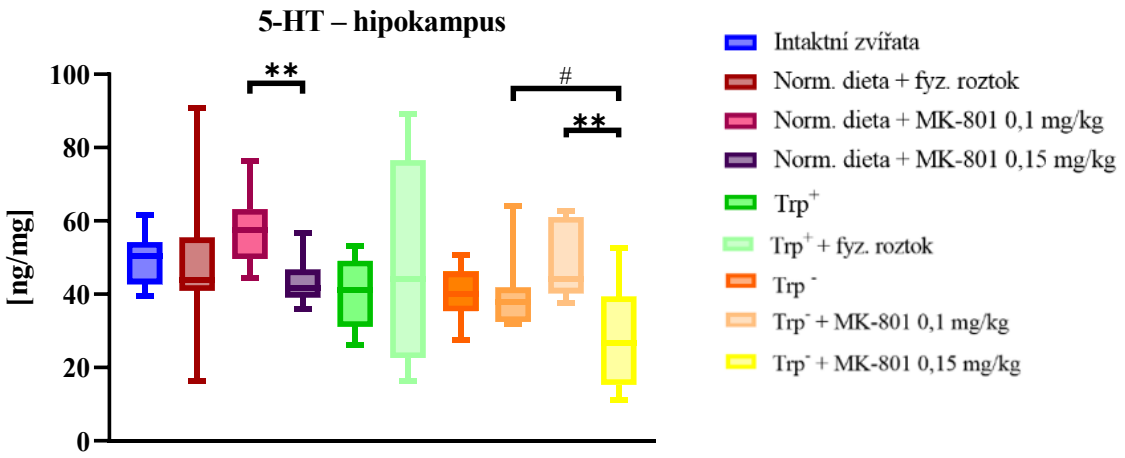
*** p <0,001 pro skupinu Norm. dieta + fyz. roztok oproti skupině intaktních zvířat,

** p <0,01 pro skupinu Trp^{+} + fyz. roztok v porovnání se skupinou Norm. dieta MK-801 0,1 mg/kg

**** p <0,0001 pro skupinu Norm. dieta MK-801 0,15 mg/kg v porovnání se skupinou intaktních zvířat^{-},

*** p <0,001 pro skupinu Tr+$^{-}$ v porovnání se skupinou Trp^{+} + fyz, roztok,

n = 7 pro skupinu Norm. dieta + MK-801 0,1 mg/kg, n = 8 pro všechny ostatní skupiny. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.



Graf 6.3.2.1.2.: Aplikace dizocilpinu v dávce 0,15mg/kg snížila hodnoty serotoninu v tkáni. Fyziologický roztok neměl na hodnoty serotoninu signifikantní vliv.

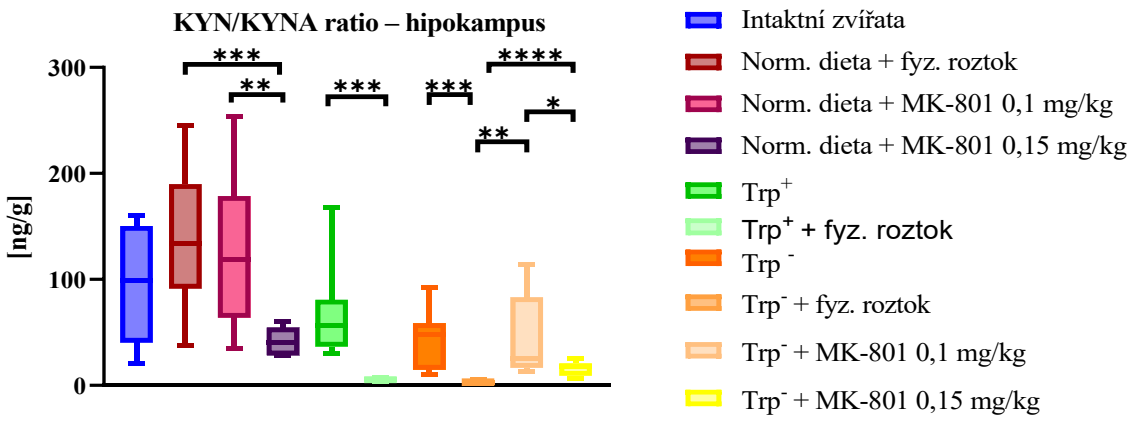
** p <0,01 pro skupinu skupinu Norm. dieta + MK-801 0,15 mg/kg v porovnání se skupinou Norm. dieta + MK-801 0,1mg/kg,

** p <0,01 pro skupinu Trp^- + MK-801 0,1 mg/kg v porovnání se skupinou Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg, + MK-801 0,15 mg/kg, oproti skupině intaktních zvířat,

p = 0,0732 pro skupinu Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg v porovnání se skupinou Trp^- + fyz, roztok,

n = 7 pro skupinu Norm. dieta + MK-801 0,1 mg/kg a skupinu Norm. dieta + MK-801 0,15 mg/kg,

n = 8 pro všechny ostatní skupiny. Byla použit t-test.



Graf 6.3.2.1.3.: Aplikace dizocilpinu, při normální dietě, v dávce 0,15mg/kg snížila hodnoty KYN/KYNA ratio v tkáni, a to jak oproti dávce 0,1 mg/kg tak i v porovnání s kontrolními skupinami, které byly aplikované fyziologickým roztokem. Naopak při tryptofanové depleci zapříčinila koaplikace dizocilpinu zvýšení poměru KYN/KYNA v obou dávkách. S rostoucí dávkou dizocilpinu hodnoty KYN/KYNA ratio oproti nižší dávce klesly, ne však na úroveň kontrolní skupiny aplikované fyziologickým roztokem. Samotný fyziologický roztok měl na hodnoty vliv pouze u skupin, které byly dieteticky manipulovány, u zvířat s normální dietou nevykazoval žádný efekt.

*** p <0,001 pro skupinu Norm. dieta + MK-801 0,15 mg/kg oproti skupině Norm. dieta + fyz. roztok,

** p <0,01 pro skupinu skupinu Norm. dieta + MK-801 0,15 mg/kg v porovnání se skupinou Norm. dieta + MK-801 0,1mg/kg,

**** p <0,0001 pro skupinu Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg v porovnání se skupinou Trp^- + fyz. roztok,

** p <0,01 pro skupinu Trp^- + MK-801 0,1 mg/kg v porovnání se skupinou Trp^- + fyz. roztok

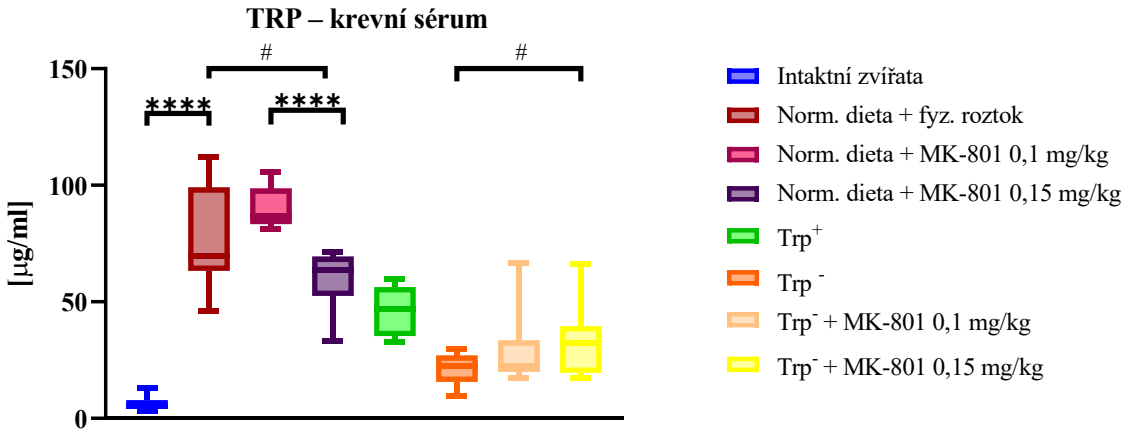
***p <0,001 pro skupinu Trp^+ + fyz. roztok v porovnání se skupinou Trp^+

*** p <0,001 pro skupinu Trp^- + fyz. roztok v porovnání se skupinou Trp^-,

* p <0,05 pro skupinu Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg v porovnání se skupinou Trp^- + MK-801 0,1 mg/kg,

n = 7 pro skupinu Norm. dieta + MK-801 0,1mg/kg, n = 8 pro všechny ostatní skupiny. Byl použit t-test

6.3.2.2. Krevní sérum

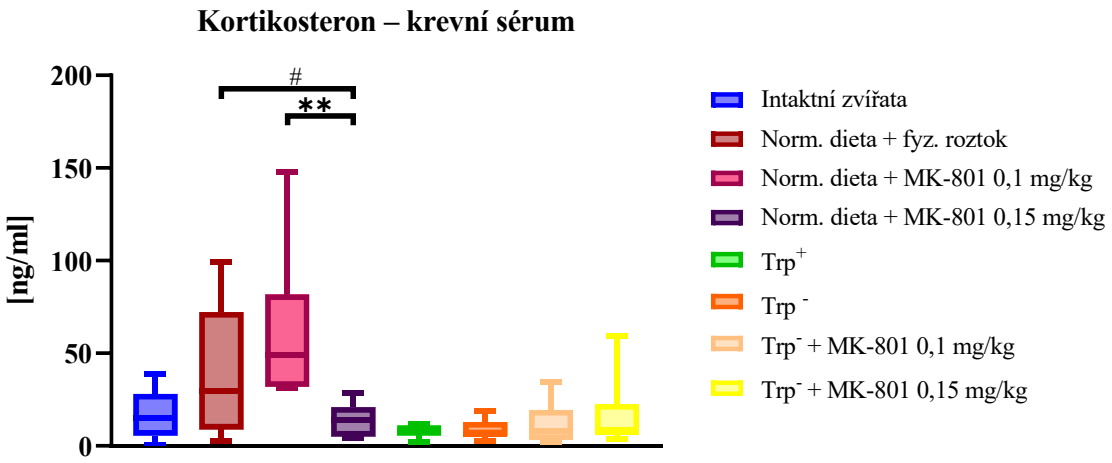


Graf 6.3.2.2.1.: Aplikace dizocilpinu, při normální dietě, v dávce 0,15mg/kg snížila hodnoty TRP v séru, a to jak oproti dávce 0,1 mg/kg. A však v porovnání s kontrolní skupinou ošetřenou fyziologickým roztokem se objevil pouze trend ve snížení hladiny TRP, stejně jako tryptofanové deplece koaplikace dizocilpinu v dávce 0,15 mg/kg indukovala pouze trend ke snížení TRP oproti skupině s deplecí tryptofanu **** p <0,0001 pro skupinu skupinu Norm. dieta + fyz. roztok v porovnání se skupinou Intaktních zvířat, **** p <0,0001 pro skupinu skupinu Norm. dieta + MK-801 0,15 mg/kg v porovnání se skupinou Norm. dieta + MK-801 0,1mg/kg,

p = 0,0772 pro skupinu Norm. dieta + MK-801 0,15 mg/kg oproti skupině Norm. dieta + fyz. roztok,

p = 0,0772 pro skupinu Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg v porovnání se skupinou Trp^-

n = 8. Byl použit t-test.



Graf 6.3.3.2.2.2.: Aplikace dizocilpinu, při normální dietě, v dávce 0,15mg/kg snížila hodnoty kortikosteronu v séru oproti dávce 0,1 mg/kg. A však v porovnání s kontrolní skupinou ošetřenou fyziologickým roztokem se objevil pouze trend ve snížení hladiny kortikosteroniu. Nebyl zasnamenán žaný významný vliv koaplikace dizocilpinu na kortikosteron při tryptofanové depleci.

** $p < 0{,}01$ pro skupinu skupinu Norm. dieta + MK-801 0,15 mg/kg v porovnání se skupinou Norm. dieta + MK-801 0,1mg/kg,

$p = 0{,}0683$ pro skupinu Norm. dieta + MK-801 0,15 mg/kg oproti skupině Norm. dieta + fyz. roztok,

n = 7 pro skupinu, Trp^+, skupinu Trp^- + MK-801 0,1 mg/kg a skupinu Trp^- + MK-801 0,15 mg/kg,

n = 8 pro všechny ostatní skupiny. Byl použit t-test.

6.4. Testování psychofarmak

6.4.1. Allopregnanolon

V této fázi experimentu byl zvířatům aplikován allopregnanolon v dávce 1 mg/kg, cílem bylo ověřit účinky allopregnanolonu na modelu tryptofanové deplece s koaplikací dizocilpinu.

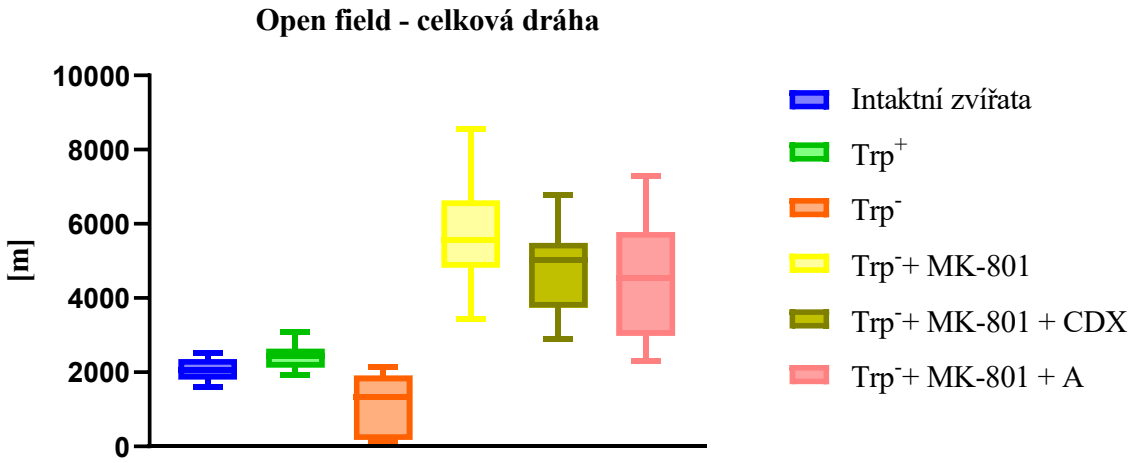
Zvířata byla rozdělena do šesti skupin po osmi jedincích:

1. v rámci redukce počtu zvířat byla použita skupina intaktních jedinců z fáze komparace deplece se standartní dietou *ad libitum* (intaktní jedinci),
2. v rámci redukce počtu zvířat byla použita skupina z fáze komparace deplece, akutně krmena kontrolní směsí s L-TRP s předchozím hladověním (Trp^+),
3. v rámci redukce počtu zvířat byla použita skupina z fáze komparace deplece, akutně krmena směsí bez L-TRP s předchozím hladověním (Trp^-),
4. v rámci redukce počtu zvířat byla použita skupina z fáze koaplikace dizocilpinu akutně krmena směsí bez L-TRP s předchozím hladověním a koaplikací MK-801 v koncentraci 0,15 mg/kg (Trp^- + MK-801).
5. skupina akutně krmena směsí bez L-TRP s předchozím hladověním, s koaplikací MK-801 v koncentraci 0,15 mg/kg a CDX (Trp^- + MK-801 + CDX),
6. skupina akutně krmena směsí bez L-TRP s předchozím hladověním, s koaplikací MK-801 v koncentraci 0,15 mg/kg a allopregnanolonem v koncentraci 1 mg/kg (Trp^- + MK-801 + A),

Aplikace allopregnanolonu v daném modelu nevykázala změnu zkoumaných biochemických parametrů v mozkové tkáni. U kontrolní skupiny se projevil vliv CDX, jehož aplikace zvyšovala hladinu tryptofanu a snižovala poměr KYN/KYNA v levém hipokampu. V krevním séru bylo po aplikaci allopregnanolonu reflektováno zvýšení tryptofanu, ale hodnoty kortikosteronu změněny nebyly. Z behaviorálních projevů se mírně, ne signifikantně, normalizovala úleková reakce a signifikantně se normalizovalo anxiózní chování, však bez vlivu na explorační a hyperlokomoční aktivitu.

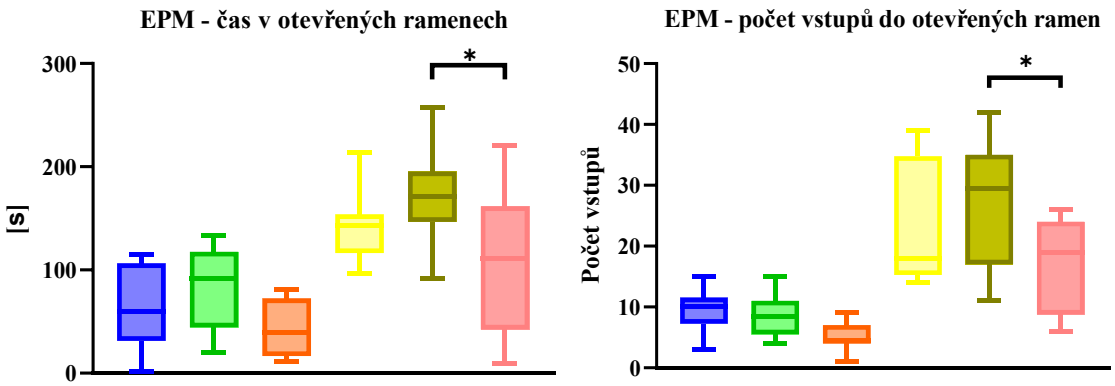
6.4.1.1. Behaviorální testy

6.4.1.1.1. Open field



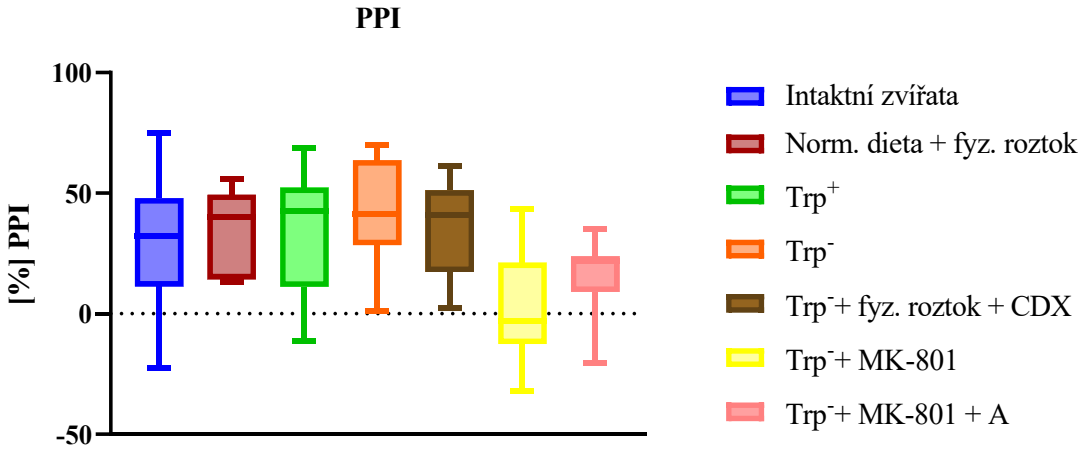
Graf 6.4.1.1.1.: Allopregnanolon neměl žádný vliv na dráhu uraženou v open fieldu.
n = 8. Byl použit t-test.

6.4.1.1.2. EPM



Grafy 6.4.1.1.2.: Po aplikaci allopregnanolonu se signifikantně snížil čas strávený v otevřených ramenech stejně jako počet vstupů.
* p <0, 05 pro skupinu Trp$^-$ + MK-801 + A v porovnání se skupinou Trp$^-$ + MK-801 + CDX,
n = 8. Byl použit t-test.

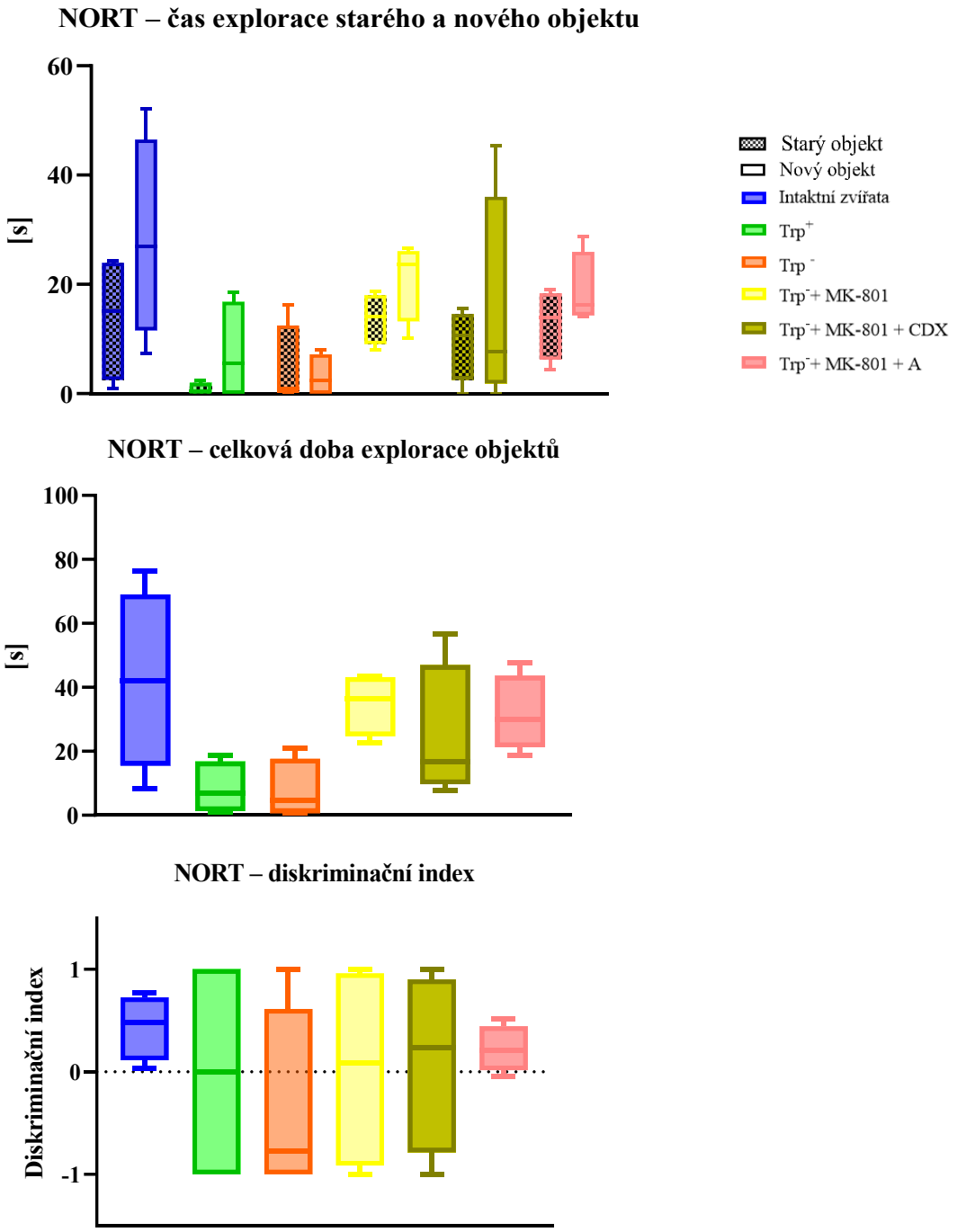
6.4.1.1.3. PPI



Grafy 6.4.1.1.3.: Aplikace allopregnanolonu normalizovala, ne však signifikantně, PPI. CDX neměl žádný vliv na PPI. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

n = 8.

6.4.1.1.4. NORT

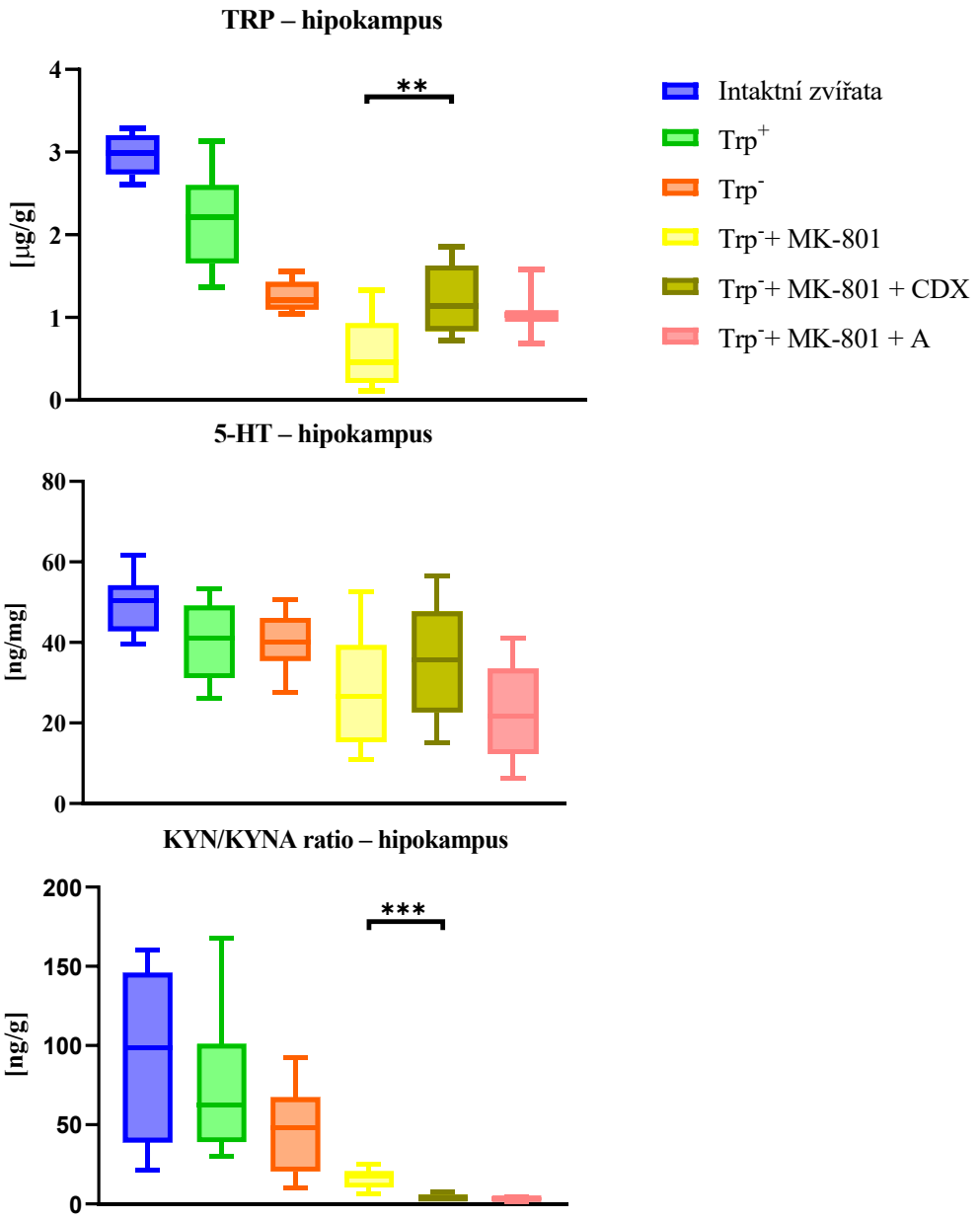


Grafy 6.4.1.1.4.: Aplikace allopregnanolonu nevykázalala signifikantní vliv na rozpoznávání, preferenci ani celkovou exploraci objektů.

n = 4. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

6.4.1.2. Biochemická analýza tkání

6.4.1.2.1. Mozková tkáň



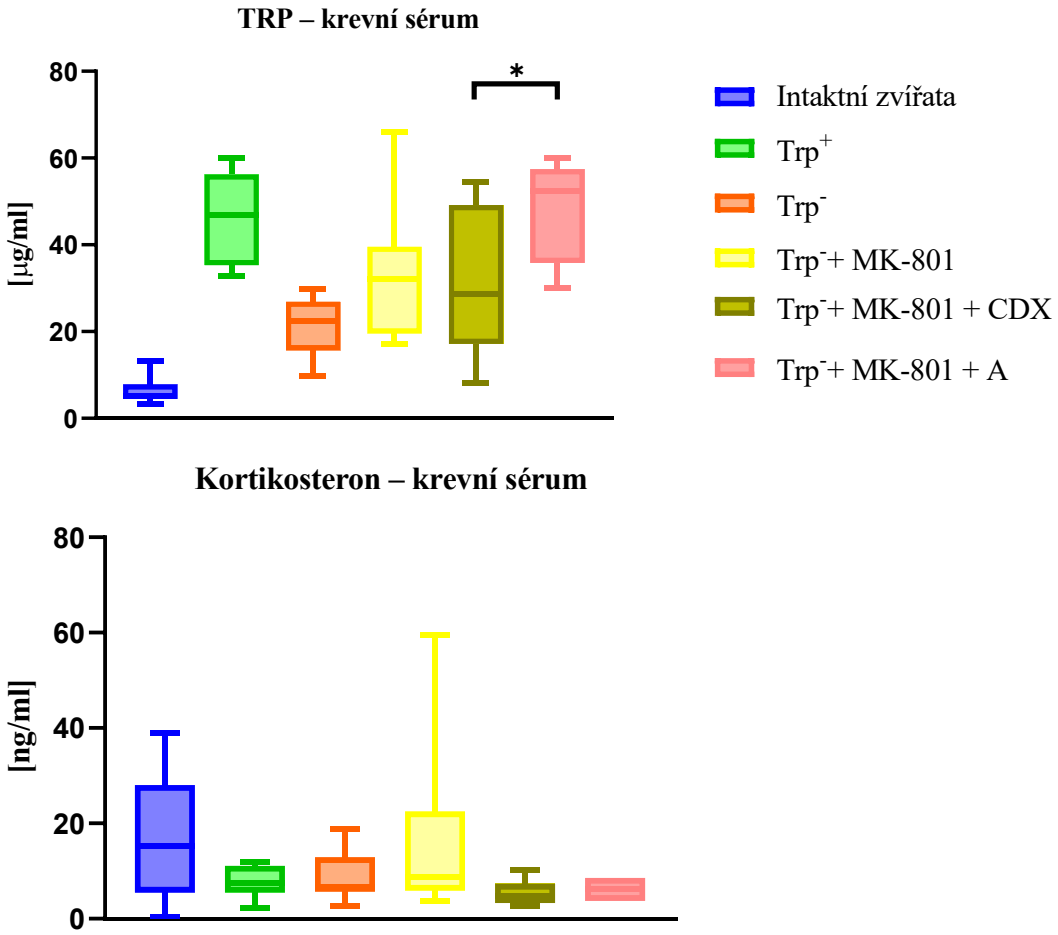
Grafy 6.4.1.2.1: Aplikace allopregnanolonu nevykázalala signifikantní vliv na hodnoty TRP, 5-HT ani na poměr KYN/KYNA v tkáni levého hipokampu. Patrný je ovšem vliv CDX, který zvýšil hladinu tryptofanuv mozku a vychýlil poměr KYN/KYNA ve prospěch kyseliny kynureninové.

** p <0, 01 pro skupinu Trp^- + MK-801 + CDX v porovnání se skupinou Trp^- + MK-801,

*** p <0, 01 pro skupinu Trp^- + MK-801 + CDX v porovnání se skupinou Trp^- + MK-801,

n = 8. Byl použit t-test.

6.4.1.2.2. Krevní sérum



Grafy 6.4.1.2.2: Aplikace allopregnanolonu zvýšila hodnoty tryptofanu v krevním séru, a však na hladiny kortikosteronu vliv neměla.

* p = 0,0307 pro skupinu Trp^- + MK-801 +A v porovnání se skupinou Trp^- + MK-801 + CDX. Byl použit t-test.

6.4.2. Takrin

V této fázi experimentu byl zvířatům aplikován takrin v dávce 0,1 mg/kg, cílem bylo ověřit účinky takrinu na modelu tryptofanové deplece s koaplikací dizocilpinu.

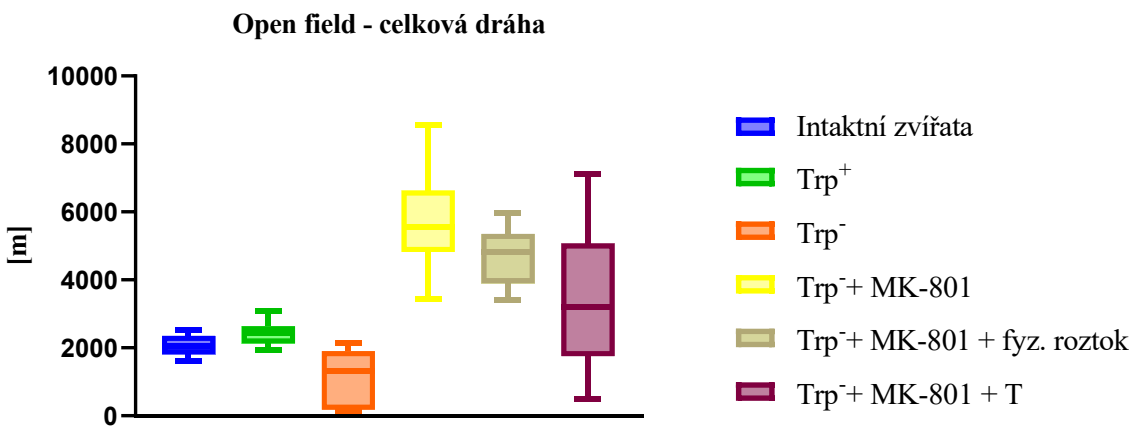
Zvířata byla rozdělena do šesti skupin po osmi jedincích:

1. v rámci redukce počtu zvířat byla použita skupina intaktních jedinců z fáze komparace deplece se standartní dietou *ad libitum* (intaktní jedinci),
2. v rámci redukce počtu zvířat byla použita skupina z fáze komparace deplece, akutně krmena kontrolní směsí s L-TRP s předchozím hladověním (Trp^+),
3. v rámci redukce počtu zvířat byla použita skupina z fáze komparace deplece, akutně krmena směsí bez L-TRP s předchozím hladověním (Trp^-),
4. v rámci redukce počtu zvířat byla použita skupina z fáze koaplikace dizocilpinu, akutně krmena směsí bez L-TRP s předchozím hladověním a koaplikací MK-801 v koncentraci 0,15 mg/kg (Trp^- + MK-801).
5. skupina akutně krmena směsí bez L-TRP s předchozím hladověním, s koaplikací MK-801 v koncentraci 0,15 mg/kg a fyziologickým roztokem (Trp^- + MK-801 + fyz. roztok),
6. skupina akutně krmena směsí bez L-TRP s předchozím hladověním, s koaplikací MK-801 v koncentraci 0,15 mg/kg a takrinem v koncentraci 1 mg/kg (Trp^- + MK-801 + T),

Aplikace takrinu v daném modelu nevykázala změnu zkoumaných biochemických parametrů v mozkové tkáni ani krevním séru. U kontrolní skupiny se projevil vliv fyziologického roztoku, jehož aplikace snižovala hladinu tryptofanu v krevním séru a hodnoty serotoninu i poměr KYN/KYNA v levém hipokampu. Z behaviorálních projevů se mírně, nesignifikantně, snížilo hyperlokomoční chování spolu s úlekovou reakcí. Signifikantně se normalizovalo anxiózní chování, avšak bez vlivu na explorační chování.

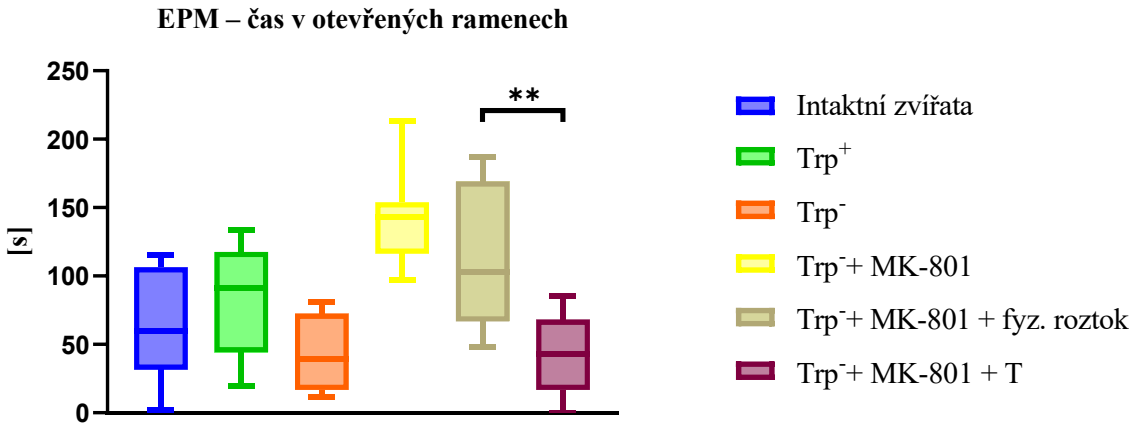
6.4.2.1. Behaviorální testy

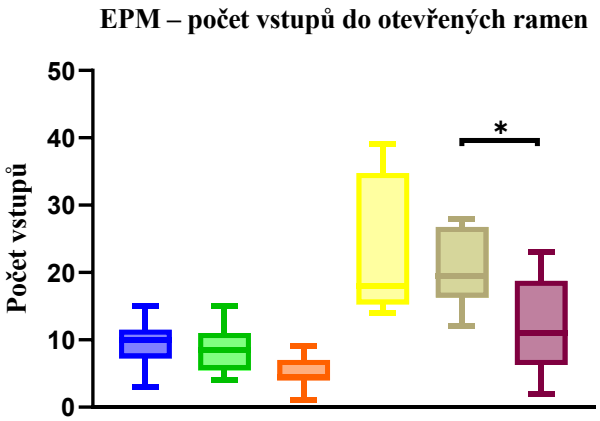
6.4.2.1.1. Open field



Graf 6.4.2.1.1: Takrin mírně, ne však signifikantně, snížil dráhu uraženou v open fieldu. n = 8. Byl použit t-test.

6.4.2.1.2. EPM





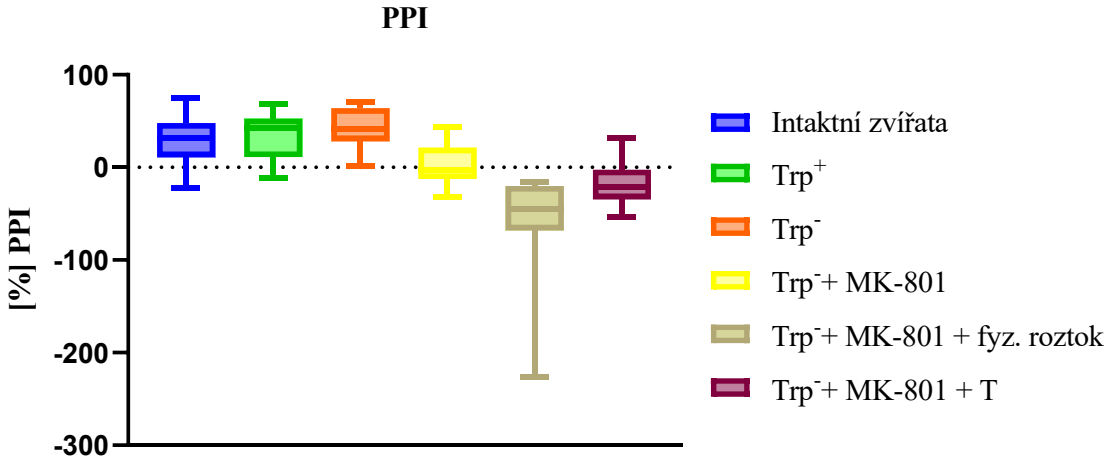
Grafy 6.4.2.1.2: Po aplikaci takrinu se snížila doba strávená v otevřených ramenech ramenech (p = 0,0067) i počet vstupů (p = 0,0191).

* p <0, 05 pro skupinu Trp^- + MK-801 + T v porovnání se skupinou Trp^- + MK-801 + fyz. roztok,

** p <0, 01 pro skupinu Trp^- + MK-801 + T v porovnání se skupinou Trp^- + MK-801 + fyz. roztok,

n = 8. Byl použit t-test.

6.4.2.1.3. PPI

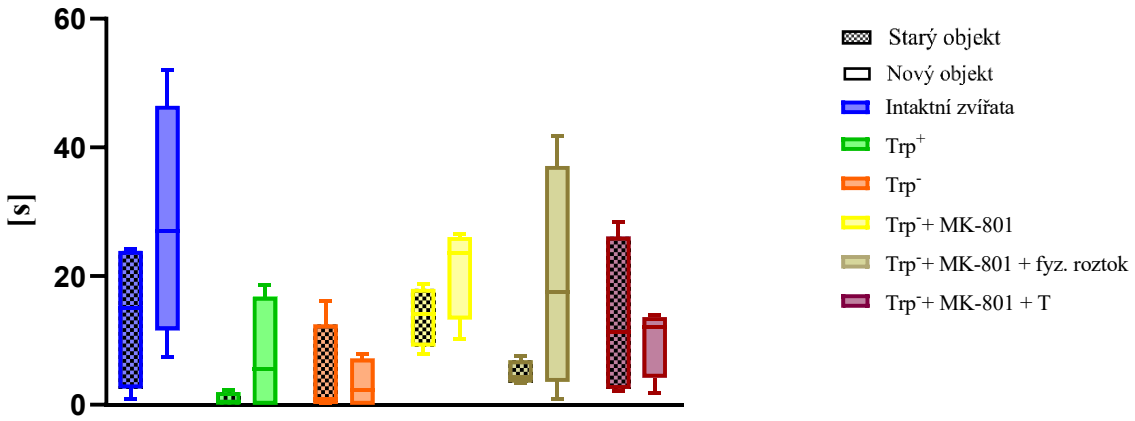


Graf 6.4.2.1.3: Aplikace takrinu mírně, ne signifikantně, normalizovala PPI.

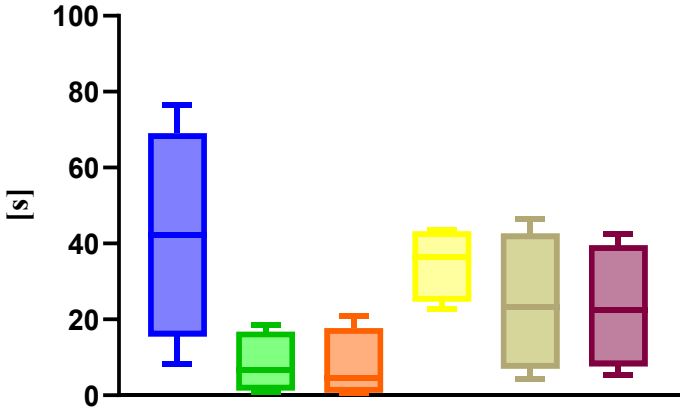
n = 8. Byl použit t-test.

6.4.2.1.4. NORT

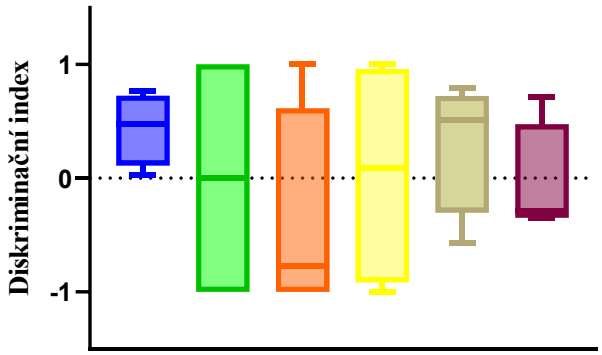
NORT – čas explorace starého a nového objektu



NORT – celková doba explorace objektů



NORT – diskriminační index

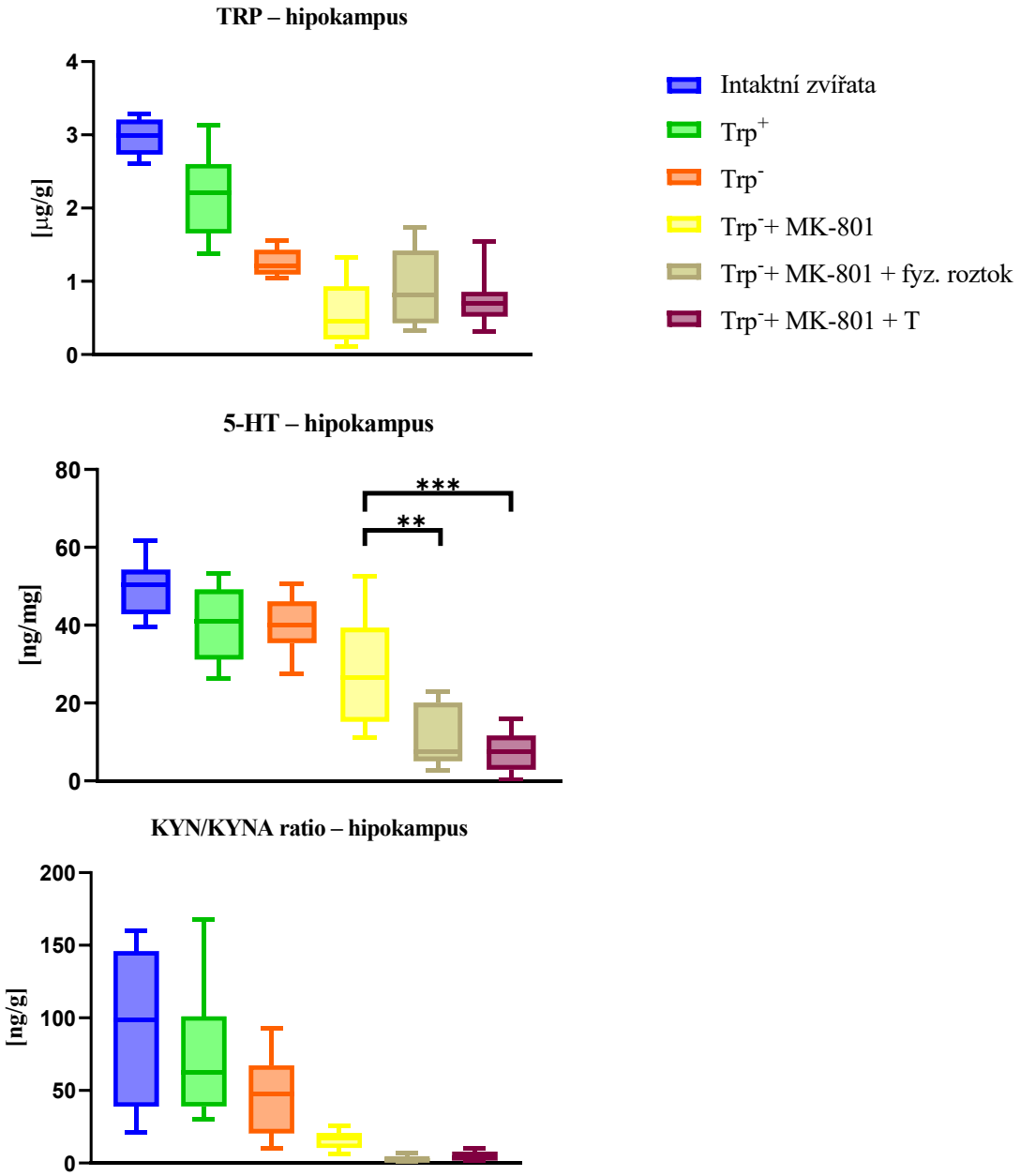


Grafy 6.4.2.1.4: Aplikace takrinu nevykázala signifikantní vliv na rozpoznávání, preferenci ani celkovou exploraci objektů v porovnání s ostatními skupinami.

n = 4. Byla použita ANOVA.

6.4.2.2. Biochemická analýza tkání

6.4.2.2.1. Mozková tkáň



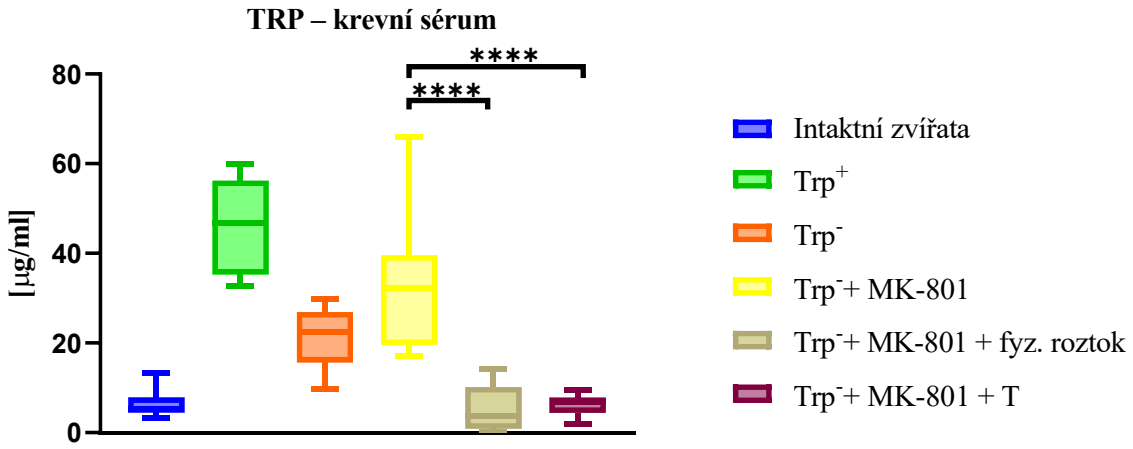
Grafy 6.4.2.2.1: Aplikace takrinu neměla signifikantní vliv na hladinu tryptofanu, serotoninu a ani na poměr KYN/KYNA v mozkové tkáni oproti kontrolní skupině. Opět se projevil vliv fyziologického roztoku, jehož aplikace signifikantně snížila poměr KYN/KYNA.

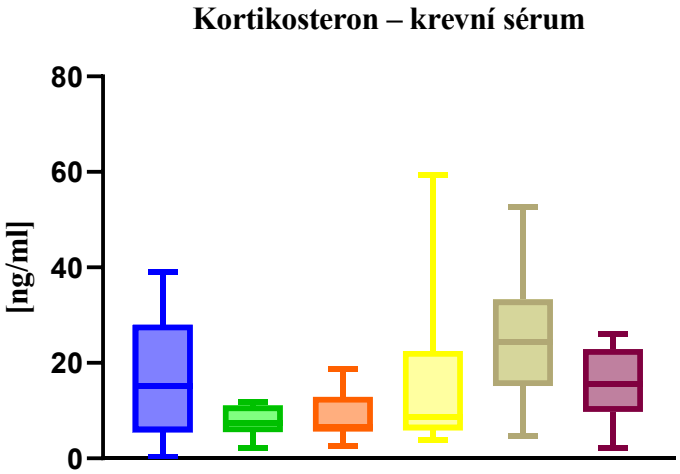
*** p <0, 001 pro skupinu Trp^- + MK-801 + T v porovnání se skupinou Trp^- + MK-801,

** p <0, 01 pro skupinu Trp^- + MK-801 + fyz. roztok v porovnání se skupinou Trp^- + MK-801,

n = 8. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

6.4.2.2.2. Krevní sérum





Grafy 6.4.2.2.2: Takrin neměl vliv na hodnoty tryptofanu ani kortikosteronu v séru. Fyziologický roztok zvýšil tryptofan v krevním séru.

**** p <0, 0001 pro skupinu Trp^- + MK-801 + T v porovnání se skupinou Trp^- + MK-801,

**** p <0, 0001 pro skupinu Trp^- + MK-801 + fyz. roztok v porovnání se skupinou Trp^- + MK-801,

n = 8. Byla použita ANOVA a Tukeyho test.

7. Diskuse

Tato práce se zabývala vlivem MK-801 v dávkách 0,1 a 0,15 mg/kg na anxiózní chování, kognici a lokomoční aktivitu v animálním modelu tryptofanové deplece. Následně se práce také věnovala účinku allopregnanolonu a takrinu na behaviorální parametry této koaplikace.

Hlavní hypotézou bylo, že tryptofanová deplece spolu s MK-801 výrazně zvýší lokomoční aktivitu, sníží úzkostné chování, zvýší deficit ve zpracování informací a naruší rozpoznávání objektů. Tato hypotéza vycházela z předchozí studie, kde akutní tryptofanová deplece s koaplikací dizocilpinu v koncentraci 0,3 mg/kg zvýšila lokomoční aktivitu zvířete v open fieldu (Bubenikova *et al.*, 2004). V této práci jsme zjistili, že dizocilpin sice stírá hypolokomoční a anxiózní efekt tryptofanové deplece, nicméně nemá na behaviorální projevy zvířete větší vliv než aplikace dizocilpinu samotného u zvířat s normální dietou. Tato hypotéza tedy ověřena nebyla.

Další hypotéza předpokládala, že testovaná farmaka normalizují narušené behaviorální parametry. Zejména upraví úzkostné projevy, lokomoční aktivitu a rozpoznávání informací. Bylo zjištěno že obě farmaka, allopregnanolon i takrin, normalizovala úzkostné chování a měla mírný, ne však signifikantní, vliv i na úlekovou reakci. Allopregnanolon spíše neovlivňoval lokomoční chování, takrin působil mírně hypolokomočně, ne však signifikantně. Tato hypotéza tedy z části ověřena byla.

7.1. Zavedení kognitivního testu

Pro účely této práce byl zaveden NORT. Zvířata při exploraci objektů dávala signifikantně přednost novému objektu před starým. V případě NOLT kognitivní test nefungoval. Je možné, že pro zvířata nebyla nová pozice natolik zajímavá, aby starou pozici signifikantně diskriminovala.

V této práci se sice podařilo NORT u intaktních zvířat zavést, avšak v průběhu následujících experimentů odmítala téměř polovina zvířat objekty explorovat. Vzhledem k tomu, že tato zvířata byla z analýzy vyřazena, byl u jednotlivých porovnávaných skupin počet zvířat (n = 4) příliš malý a rozptyl hodnot příliš velký na to, aby měl test vždy nějakou signifikantní vypovídající hodnotu.

Oba zaváděné kognitivní testy, NOLT a NORT, byly vybrány na základě literární rešerše, kde většina autorů, při indukci tryptofanové deplece, pracovala s testy rozpoznávání objektů (Rutten *et al*., 2007; Olivier *et al*., 2008; Olivier *et al*., 2009; van Donkelaar *et al*., 2008). Zatímco NORT je zaměřen na neprostorové učení a rozpoznávání objektů, u NOLT je zapojeno také učení prostorové a ve vetší míře závisí na aktivitě hipokampu (Denninger *et al*., 2018). Oba testy vycházejí z tendence laboratorních potkanů projevovat v těchto experimentech větší zájem o vjemy nové než o ty známé (Cohen and Stackman, 2015). Existuje mnoho modifikací i protokolů. Bylo také zjištěno, že exploraci objektů ovlivňuje kmen zvířat, věk, pohlaví i způsob chovu (van Goethem *et al*., 2012). I přístup autorů se různí. Někteří autoři popisují určitý materiál či tvar jako problematický. Dané objekty musí být dostatečně vizuálně zajímavé, stabilní, snadno omyvatelné a neměly by zvířeti evokovat skrýš. Některé studie také upozorňují na problematiku dezinfekce arény i objektů (Antunes and Biala, 2012). Zatímco původní studie tvrdí, že kvůli lepšímu rozprostření pachů by se objekty ani aréna neměly dezinfikovat po každém zvířeti (Ennaceur and Delacour, 1988), ozývají se protiargumenty, které zastávají názor, že by zvíře při úloze nemělo být pachy rozptylováno vůbec, či dezinfikují ethanolem s vodou v různém poměru (Antunes and Biala, 2012). Toto shrnutí naznačuje, že NORT má své limitace a úskalí, která je třeba podchytit.

Skutečnost, že se NORT podařilo zavést u skupiny intaktních zvířat a následně se v průběhu experimentu jevil méně funkční, si vysvětlujeme několika aspekty. V pilotním testu participovalo dvanáct zvířat, zatímco při studii jich bylo ve skupině vždy osm. Tedy s menším počtem zvířat ve skupině stoupá i vliv jejich interindividuálních rozdílů a s větším počtem se tento efekt stírá (Ameen-Ali *et al*., 2015). Také i v samotné prvotní studii bylo testováno celkem 220 zvířat (Ennaceur and Delacour, 1988).

Dalším aspektem mohla být zvýšená míra stresu a úzkosti, která je uváděna jako jedna z problematických stránek tohoto testu (Ameen-Ali *et al*., 2015). Intaktní zvířata v pilotním testu nepodléhala žádné další experimentální manipulaci, kdežto i intaktní zvířata v následném experimentu absolvovala před testem NORT, ne však bezprostředně, ještě další behaviorální testy.

Zároveň je také možné, že kmen potkanů Wistar, jakožto albinotický kmen, si všeobecně vede hůře v rozeznávání objektů, jelikož mají zhoršenou ostrost zraku (Prusky *et al*., 2002).

7.2. Komparace tryptofanové deplece

Jako nejvíce funkční se z trojice testovaných metod projevila metoda akutní tryptofanové deplece s předchozím hladověním. Byť prokázala podobnou účinnost v hodnocených biochemických parametrech jako metody ostatní, v behaviorálních experimentech způsobila změny jako jediná. I přes skutečnost, že všechny metody tryptofanové deplece způsobily snížení tryptofanu ve tkáni levého hipokampu, žádná však neměla vliv na hodnoty serotoninu v mozku. Poměr KYN/KYNA byl vychýlen pouze v případě chronické deplece tryptofanu. Koncentrace tryptofanu v krevním séru byla signifikantně snížena vlivem dietetické manipulace pouze v případě chronické deplece. Samotné hladovění v případě akutní deplece zvýšilo v krevním séru koncentraci tryptofanu stejně jako poměr celkového a volného tryptofanu, avšak hladiny kortikosteronu zůstaly ve všech případech nezměněné.

V behaviorálních testech akutní tryptofanová deplece s předchozím hladověním snížila explorační chování. Zvířata v případě NORT zkoumala objekty signifikantně kratší dobu. Hypolokomoce se signifikantně odrazila v menší uražené vzdálenosti v open fieldu. Zvýšené anxiózní chování bylo patrné ve sníženém počtu vstupů do otevřených ramen EPM a ze signifikantní neochoty zvířat trávit více času v otevřených ramenech. Žádná z metod neměla vliv na úlekovou reakci reprezentovanou jako % PPI.

Jak již bylo popsáno v teoretické části práce, metoda tryptofanové deplece má jisté limitace a mnoho aspektů, které do ní mohou vstupovat.

Aby byly odstíněny možné negativní důsledky stresových faktorů či případná nechtěně vyvolaná zánětlivá odpověď organismu, nebyla zvířatům podávána směs gastrickou sondou, nýbrž exponována v miskách. Zde lze vidět první úskalí, jelikož ochota ke konzumaci směsi se mezi zvířaty i přes předchozí habituaci různila. Dále také doba od indukce deplece, kdy probíhalo behaviorálního testování, dekapitace i odběr tkání, nebyla pro všechna zvířata konzistentní, což se také mohlo promítnout do

naměřených dat, a to i přes to, že by deplece tryptofanu měla vydržet až po dobu 6 hodin (Jans *et al*., 2009).

Neochota zkonzumovat směs celou se projevovala zejména u skupiny bez předchozího hladovění. To by tedy mohl být jeden z aspektů, proč metoda akutní tryptofanové deplece bez předchozího hladovění vykazovala slabé výsledky i biochemicky. Dále, vzhledem k tomu, že zvířata nebyla vyhladovělá, mohla mít nestrávená potrava spolu se sacharidovou složkou směsi vliv na zvýšené vyplavování inzulínu. Inzulín jednak snižuje hladiny neutrálních mastných kyselin (Daniel *et al*., 1981; Markus, 2008; Höglund *et al*., 2019), ale také indukuje vychytávání neesterifikovaných mastných kyselin z plazmy, čímž se uvolňuje na ně navázaný albumin. Albumin následně může vázat tryptofan a tím se zvyšuje i dostupnost tryptofanu pro mozkovou tkáň (Badawy and Morgan, 1982; Fernstrom, 1983; Wurtman *et al*., 2003; Höglund *et al*., 2019). To koresponduje i s našimi získanými výsledky, totiž, že oproti intaktním zvířatům nebyly hladiny tryptofanu v séru změněny a v mozkové tkáni byl reflektován pouze trend ve snížení hladin tryptofanu. Z toho důvodu nejspíše nemohl být efekt deplece natolik silný, aby ovlivnil behaviorální projevy zvířete.

Cukerná složka v kontrolní směsi mohla také zvýšit dráhu uraženou zvířaty v open fieldu. Je známo, že sacharidy ovlivňují mozkovou aktivitu a energetický balanc (Mergenthaler *et al*., 2013), a tedy jednorázová zvýšená administrace cukerné složky v potravě mohla vyústit i ve zvýšenou lokomoční aktivitu zvířete.

Stejně jako některými autory (van der Plasse *et al*., 2007; van Donkelaar *et al*., 2009; van Donkelaar *et al*., 2010) i námi byly zjištěny nezměněné hodnoty serotoninu v mozkové tkáni. Tato zjištění naznačují, že námi pozorované behaviorální změny zřejmě nebyly indukované změnou 5-TH. Musíme vzít však v potaz, že analyzovány byly hodnoty 5-TH pouze v levém hipokampu, a tedy neznamená to, že serotonin zůstal nezměněn i v dalších oblastech mozku. Kromě jiných přídatných mechanismů by ve změnách chování mohla hrát hlavní roli NOS, která je přímo závislá na dostupnosti tryptofanu (Chiarugi *et al*., 2003). Liu a kol. (2013) zaznamenali po indukci akutní tryptofanové deplece snížení neuronální NOS v hipokampu potkanů. Zároveň je známé,

že inhibice NOS ovlivňuje anxiózní chování (Pokk and Väli, 2002; Forestiero *et al*., 2006) i chování lokomoční (Sandi *et al*., 1995; Bashkatova *et al*., 2020).

To, že hladiny serotoninu nebyly ve všech případech tryptofanové deplece signifikantně sníženy, by mohlo být dáno také regulací serotoninových receptorů. Literatura dále udává, že akutní tryptofanová deplece krátkodobě snižuje počet receptorů 5-HT_{1A} (Cahir *et al*., 2006), kdežto chronická deplece tryptofanu zvyšuje počet 5- HT_{2A} receptorů (Cahir *et al*., 2006, Franklin *et al*., 2012). Tato skutečnost může vysvětlovat jednak to, proč chronická deplece neměla vliv na hladiny serotoninu a zároveň se nevyznačovala změněnými behaviorálními projevy. Při chronické tryptofanové depleci pravděpodobně došlo k přizpůsobení hladin serotoninu upregulaci receptorů, a tedy i k téměř nenarušené signalizaci. Zřejmě proto tedy nebyla tato metoda dostatečně behaviorálně průkazná. Tento proces je možné vysvětlit nejspíše vlivem zpětnovazebné smyčky, která funguje mezi glukokortikoidy, mineralokortikoidy a 5-HT_{2A} receptory. Franklin a kol. (2012) naměřili zvýšené hodnoty glokokortikoidů i zvýšený poměr KYN/KYNA v krevním séru. Tato zjištění však nekorespondují s našimi naměřenými výsledky, kdy byly hodnoty kortikosteronu ve všech případech nezměněné. Nicméně právě studie Trajkovska a kol. (2009) naznačuje, že by se na regulaci 5-HT_{2A} receptoru mohly podílet jak glukokortikoidy, tak mineralokortikoidy. Navíc Franklin a kol. (2012), reflektovali kromě zvýšené koncentrace kortikosteronu v krevním séru také snížené hladiny aldosteronu. Navrhují tak, že aldosteronem indukovaná aktivace mineralokortikoidních receptorů v CNC vede ke zvýšení počtu 5-HT_{2A} receptorů. Zjištění v této práci by mohla naznačovat, že se na regulaci deplece superiorně podílí spíše systém renin-angiotenzin-aldosteron.

Námi naměřené snížený poměr KYN/KYNA v mozkové tkáni po indukci chronické deplece tryptofanu koresponduje s myšlenkou, že kyselina kynureninová špatně prochází přes hematoencefalickou bariéru na rozdíl od kynureninu. V důsledku toho vedou vyšší hodnoty kynureninu v plazmě ke zvýšené syntéze kyseliny kynureninové v mozku (Fukui *et al*., 1991), a tedy ke sníženému poměru KYN/KYNA . Zvýšené hodnoty kyseliny kynureninové byly naměřeny v mozkomíšním moku u

pacientů s neuropsychiatrickým onemocněním, mimo jiné například i u pacientů s bipolárně afektivní poruchou (Olsson *et al*., 2010) či schizofrenií (Plitman *et al*., 2017).

7.3. Koaplikace dizocilpinu

V této práci bylo zjištěno, že aplikace dizocilpinu neměla signifikantní vliv na hodnoty tryptofanu v mozkové tkáni. Byl však zaznamenán signifikantní rozdíl mezi dávkami dizocilpinu. Aplikace MK-801 o koncentraci 0,15 mg/kg, ne však 0,1 mg/kg, snížila poměr hodnot KYN/KYNA i serotoninu v mozkové tkáni, a také hladinu tryptofanu i kortikosteronu v krevním séru. Dále byl také zjištěn signifikantní efekt intraperitoneální aplikace fyziologického roztoku na zvýšené hladiny tryptofanu v krevním séru, avšak snížené ve tkáni levého hipokampu.

V behaviorálních testech se se vzrůstající dávkou dizocilpinu zvyšovala i hyperlokomoce zvířete reprezentovaná větší vzdáleností uraženou v open fieldu, signifikantně pro dávku 0,15 mg/kg. Obě dávky snižovaly anxiózní chování, což se projevilo ve zvýšeném počtu vstupů do otevřených ramen EPM a ze signifikantně větší ochoty zvířat trávit čas v otevřených ramenech. Současně obě dávky dizocilpinu snižovaly úlekovou reakci v PPI, a tedy způsobily narušení zpracování informací. Toto zjištění koresponduje i s naměřenými výsledky v literatuře (Hoffman *et al*., 1993; Johansson *et al*., 1995; Bast *et al*., 2000).

Pouze dávka 0,15 mg/kg působila anxiolyticky, jelikož zvířata trávila více času v otevřených ramenech oproti kontrolní skupině. A také vykazovala zvýšenou exploraci objektů, což bylo nejspíše způsobeno v důsledku zvýšené lokomoční aktivity.

Dále bylo zjištěno, že koaplikace MK-801 v dávce 0,15 mg/kg zcela ruší behaviorální projevy tryptofanové deplece.

Dle námi naměřených hodnot se poměr KYN/KYNA zdá být dependentní na dávce dizocilpinu, kdy byl tento poměr signifikantně snížen v tkáni levého hipokampu, tedy vychýlen ve prospěch kyseliny kynureninové, po dávce 0,15 mg/kg více než po dávce 0,1 mg/kg. Naše zjištění korespondují s výsledky prezentované ve studii, kde autoři zjistili zvýšenou expresi kynurenin aminotransferázy II v astrocytech po aplikaci MK-801 (Obara-Michlewska *et al*., 2013). Vzhledem k tomu, že je kynurenin

aminotransferáza II katalyzátorem syntézy kyseliny kynureninové (Rossi *et al*., 2019), je pravděpodobné, že je zodpovědná za její námi naměřené zvýšené hodnoty v mozkové tkáni. Způsob, jakým dizocilpin ovlivňuje expresi kynurenin aminotransferázy II, není znám. Předpokládá se však regulace přes interakci s NMDA receptory (Obara-Michlewska *et al*., 2013).

Také hladiny serotoninu v mozkové tkáni se zdají být ovlivněné aplikačním schématem dizocilpinu. Je známo, že kromě glutamátergního a dopaminergního systému ovlivňuje dizocilpin právě i systém serotonergní. Byly prokázány zvýšené extracelulární hladiny dopaminu, noradrenalinu i serotoninu v *nucleus acumbens* po intraperitoneální aplikací dizocilpinu v dávce 0,3 mg/kg (Yan *et al*., 1997). Oproti tomu dávka v koncentraci 0,1 mg/kg neměla na tyto neurotransmitery téměř žádný vliv (Hatip-Al-Khatib *et al*., 2001). S tím korespondují i zjištění v této práci a naznačuje to, že se zapojení neuromodulačních systémů, a tedy i výsledné biochemické a behaviorální změny, liší v závislosti na dávce dizocilpinu.

Nekompetitivní antagonisté NMDA receptorů zároveň působí i jako slabé blokátory D2 dopaminergních receptorů. Předpokládá se, že mimo zvýšení extracelulárního dopaminu působí tato mírná blokáda D2 receptorů inhibičně i na 5- HT_{2A} receptory, což by mohlo být jedním z důvodů zvýšené extracelulární hladiny serotoninu po aplikaci dizocilpinu (López-Gil *et al*., 2009). Wedzony a kol. (1997) zjistili, že MK-801 v dávce 0,4 mg/kg působí i na 5- HT_{1A} receptory v mozkové tkáni, a to up-regulačně. Současně byl také prokázán efekt antagonistů 5- HT_{2A} a agonistů 5- HT_{2c} receptorů na zvýšené lokomoční chování, kdy kombinované ovlivnění těchto receptorů snížilo indukovanou hyperlokomoci (Pockros *et al*., 2012). Tyto receptory jsou zapojeny i v regulaci úzkostných, depresivních, spánkových i neuro-endokrinologických procesů (van Oekelen *et al*., 2003) a jsou ovlivněné i při depleci tryptofanu (Cahir *et al*., 2006, Franklin *et al*., 2012). Rozdílná modulace serotonergních receptorů, která se tedy zdá být také závislá na dávce dizocilpinu, může být jedním z důvodů, proč byl efekt akutní tryptofanové deplece po nízkých dávkách dizocilpinu stírán a ne potencován.

Mimo to, dostupné studie reflektují potenciační efekt na zvýšené lokomoční chování po depleci serotoninu v mozkové tkáni (Plałaźnik *et al*., 1997; Bubenikova *et al*.,

2004; Adams *et al*., 2013), nikoli pouze po depleci tryptofanu. I přesto, že se po indukci tryptofanové deplece signifikantně snížilo množství tryptofanu ve tkáni levého hipokampu, deplece serotoninu nebylo dosaženo. Je tedy pravděpodobné, že se na potenciaci lokomočního chování po aplikaci dizocilpinu superiorně podílí přímo deplece serotoninu, ne však další přídatné mechanismy, které souvisejí pouze s deplecí tryptofanu. A tedy model tryptofanové deplece spolu s koaplikací dizocilpinu se zdá být validní pouze v souvislosti s metodou akutní tryptofanové deplece s předchozím hladověním a za předpokladu, že se při depleci dosáhne signifikantní redukce serotoninu v mozkové tkáni.

7.4. Testování farmak

Aplikace allopregnanolonu v dávce 0,1 mg/kg v modelu akutní tryptofanové deplece s koaplikací dizocilpinu v dávce 0,15 mg/kg nevykázala změnu zkoumaných biochemických parametrů v mozkové tkáni. Pouze se projevil vliv CDX, jehož aplikace zvyšovala u kontrolní skupiny hladinu tryptofanu a snižovala poměr KYN/KYNA v levém hipokampu. Dále bylo v krevním séru po aplikaci allopregnanolonu reflektováno zvýšení tryptofanu, ale hodnoty kortikosteronu změněny nebyly. Z behaviorálních projevů se normalizovalo anxiózní chování, však bez signifikantního vlivu na úlekovou reakci, explorační i hyperlokomoční chování.

Vliv CDX, který byl použit jako komplexotvorné činidlo pro rozpouštění allopregnanolonu ve vodném roztoku, je možné vysvětlit tím, že CDX obsahuje ve své struktuře cyklický oligosacharid – cyklodextrin. Mechanismus efektu sacharidové složky nosného média je pravděpodobně podobný jako výše popsaný mechanismus vlivu sacharidové složky v dietě. Glukózou ovlivněné vyplavování inzulínu snižuje v krevní plazmě hladiny neutrálních mastných kyselin (Daniel *et al*., 1981; Markus, 2008; Höglund *et al*., 2019) a indukuje vychytávání neesterifikovaných mastných kyselin. Díky uvolněnému albuminu, který váže tryptofan, se zvyšuje i dostupnost tryptofanu pro CNS (Badawy and Morgan, 1982; Fernstrom, 1983; Wurtman *et al*., 2003; Höglund *et al*., 2019), což následně afektuje i metabolismus kynureninů (Davis and Liu, 2015).

Že by allopregnanolon zvyšoval hladiny tryptofanu v krevní tkáni potkanů nebylo doposud publikováno. Avšak u pacientů, kteří trpěli neurodegenerativním onemocněním, byl též zaznamenán vzestup plazmatických hladin tryptofanu po podání allopregnanolonu (Napoli *et al*., 2019). U žen s premenstruačním syndromem byla sledována opačná závislost, tedy vzestup plazmatických hladin allopregnanolonu po aplikaci tryptofanu (Rasgon *et al*., 2001). Napoli a kol. (2019) si tuto skutečnost vysvětlují působením allopregnanolonu na redukci oxidativního stresu, čímž se snižuje i kyselina indol-3-octová jakožto produkt mikrobiálního metabolismu tryptofanu (Roager and Licht, 2018). A tedy, i přesto, že není dostatek důkazů o tom, že by allopregnanolon ovlivňoval hladiny plazmatického tryptofanu u zvířat, je interakce mezi těmito látkami možná.

To, že aplikace allopregnanolonu neměla vliv na explorační a hyperlokomoční chování, do jisté míry koresponduje s literaturou (Pelegrina *et al*., 2015). Také námi zjištěné anxiózní chování je v souladu s faktem, že allopregnanolon moduluje úzkostné projevy (Finn *et al*., 2003; Strohle *et al*., 2003). Autoři však prezentují anxiolytický efekt (Pelegrina *et al*., 2015) daný nejspíše potenciací $GABA_A$ receptorů a inhibicí NMDA receptorů (Korinek *et al*., 2011). O normalizaci či zvýšení úzkostného chování studie nehovoří. I naše výsledky mírné normalizace prepulzní inhibice jsou kontroverzní ke zjištěním některých autorů. Bortolato a kol. (2008a) prokázali, že inhibitor enzymu 5α-reduktázy, která se také účastní syntézy allopregnanolonu, snížil dopaninergními receptory indukované narušení PPI, avšak na deficit PPI indukovaný MK-801 vliv neměl. Také u myší, které měly narušenou expresi enzymu 5α-reduktázy typu I, nebylo reflektováno narušení prepulzní inhibice po podání agonisty D1 receptorů a po podání allopregnanolonu byl opět patrný deficit v PPI (Mosher *et al*., 2019). To naznačuje, že efekt normalizace anxiózního chování ani mírná modulace úlekové reakce po podání allopregnanolonu zřejmě nejsou dány regulací D1, $GABA_A$ ani inhibicí NMDA receptorů. Bylo prokázáno, že je allopregnanolon i antagonistou 5-TH_3 receptoru (Wetzel *et al*., 1998). Aktivace tohoto receptoru se, mimo jiné, uplatňuje při stavech psychotických, úzkostných i kognitivních (Fozard, 1984; Greenshaw, 1993) Bylo také zjištěno, že antagonisté 5-TH_3 mají anxiolytický efekt (Kurhe *et al*., 2014). Blokáda 5-TH_3 pravděpodobně zvyšuje hladinu serotoninu na synapsi a ten se tak váže na další

receptory (Rajkumar and Mahesh, 2010). Role serotoninových receptorů je známá jak v modulaci úzkostného chování (Żmudzka *et al*., 2018), tak i v modulaci PPI (Sipes and Geyer, 1994). S ohledem na přítomnost deplece tryptofanu, která také reguluje některé serotoninové receptory (Cahir *et al*., 2006, Franklin *et al*., 2012), by allopregnanolon mohl normalizovat úzkostné chování a částečně i úlekovou reakci primárně *via* serotonergní systém.

Aplikace takrinu byla bez efektu na zkoumané biochemické parametry jak v mozkové tkáni, tak i v krevním séru. Projevil se však vliv fyziologického roztoku, jehož aplikace snižovala hladinu tryptofanu v krevním séru a hodnoty serotoninu i poměr KYN/KYNA v levém hipokampu. Vliv fyziologického roztoku není překvapivý, jelikož jeho intraperitoneální aplikace působí na zvíře jako stresor (Meijer 2005; Pereira-Figueiredo *et al*., 2015) a je známo, že stresová odpověď organismu vychyluje metabolismus kynureninů (Hüfner *et al*., 2020; Li *et al*., 2020).

Z behaviorálních projevů se mírně snížilo hyperlokomoční chování spolu s úlekovou reakcí. Normalizovalo se anxiózní chování, avšak bez vlivu na explorační chování. Tato zjištění do jisté míry korespondují s literaturou. Autoři po aplikaci takrinu či některých jeho derivátů pozorovali snížené lokomoční chování (Pan *et al*., 2007; Pan *et al*., 2009; Kaniakova *et al*., 2018), stejně tak byla pozorována i zvýšená anxieta a depresivní chování po inhibici acetylcholinesterázy (Mineur *et al*., 2013; Suarez-Lopez 2019; Giacomini *et al*., 2020). V účincích takrinu zřejmě hraje roli také zapojení serotonergního systému, konkrétně $5HT_{2A}$ a $5\text{-}HT_{2C}$ (Mehta *et al*., 2005). Literatura také udává, že takrin zvyšuje hladinu serotoninu v mozkové tkáni (Gibson *et al*., 1988; Robinson *et al*., 1989; Mehta *et al*., 2005), zatímco hodnoty dopaminu nemění ani velké dávky takrinu (Mehta *et al*., 2005). Námi zjištěné behaviorální efekty po aplikaci takrinu by tedy mohly být vysvětleny podobně jako u allopregnanolonu, tedy působením přes serotonergní systém.

7.5. Validita modelu

Animální model tryptofanové deplece je některými autory označován jako model deprese či depresivních stavů (Booij *et al*., 2005; Franklin *et al*., 2012). Pokud vezmeme v úvahu kritéria hodnocení validity modelu, která navrhují Lipska a Weinberger (2000), tedy validitu homologickou, patologickou, mechanistickou, „face“ validitu i prediktivní validitu a aplikujeme je na model tryptofanové deplece i na model tryptofanové deplece s koaplikací MK-801, musíme konstatovat, že ne všechna kritéria jsou splněna.

Z hlediska homologické validity je kmen potkanů Wistar vhodný pro replikaci depresivních, úzkostných i psychotických onemocnění. Byly ovšem zaznamenány mezikmenové rozdíly (Jans *et al*., 2010). V rámci patologické validity je narušení metabolismu serotoninu jednou z příčin depresivních, úzkostných i psychotických onemocnění (Pourhamzeh *et al*., 2021). Dietetická deplece tryptofanu se zdá být dostatečnou manipulací na to, aby organismus odpovídal některým patologickým charakteristikám, které pozorujeme u daných onemocnění. Také mechanická validita odpovídá skutečnosti, že biologické mechanismy po indukci tryptofanové deplece působí stejně u člověka (Young, 2013) i potkana (van Donkelaar *et al*., 2011) a je jedním ze základů těchto onemocnění (Sandyk, 1992; Modoux *et al*., 2020). Ovšem „face“ validita modelu je vzhledem k rozporuplným behaviorálním (Blokland *et al*., 2002; Petrasek and Stuchlik, 2009; Jans *et al*., 2010) a biochemickým (Fadda *et al*., 2000; Blokland *et al*., 2002; Bubenikova *et al*., 2004; Lieben *et al*., 2004; Cahir *et al*., 2007; Jans *et al*., 2009; Petrasek and Stuchlik, 2009; Jans *et al*., 2010; Franklin *et al*., 2012) výsledkům, které se liší dle našich naměřených dat i napříč studiemi, nedostatečná. Stejně tak je možné vnímat model i z hlediska prediktivní validity, jelikož některé účinky allopregnanolonu i takrinu byly částečně v rozporu s klinickou praxí při léčbě depresivních, úzkostných a psychotických onemocnění (Wagstaff and McTavish, 1994; Pinna, 2020).

Vzhledem k tomu, nedojde-li danou metodou k signifikantní redukci serotoninu v mozkové tkáni a signifikantním behaviorálním projevům, měl by být animální model tryptofanové deplece interpretován a prezentován s výhradami a respektem k limitacím metody.

8. Závěr

V této práci bylo zjištěno, že akutní tryptofanová deplece s předchozím hladověním snižuje lokomoční aktivitu a zvyšuje anxietu u potkanů, aniž by ovlivnila hladiny serotoninu v tkáni levého hipokampu. Za hlavními behaviorálními projevy tryptofanové deplece tedy zřejmě nestály snížené hodnoty serotoninu, ale pravděpodobně narušení aktivity NOS, která je přímo závislá na dostupnosti tryptofanu, ne však serotoninu. Koaplikace nízkých dávek MK-801 nezvyšovala, ale zvrátila behaviorální dopady deplece tryptofanu. Je tedy možné, že k potenciaci efektu dizocilpinu je nutná redukce serotoninu v mozkové tkáni. A konečně, testovaná farmaka, allopregnanolon a takrin, obě normalizovala úzkostné chování, však na úlekovou reakci ani lokomoci signifikantní vliv neměla. Účinek těchto farmak mohl být modulován v důsledku změn vyvolanými deplecí tryptofanu.

Na závěr se nabízí otázka, zda je metoda dietetické tryptofanové deplece vůbec vhodná k dalšímu vytváření animálních modelů. Podíváme-li se na tuto metodu střízlivým pohledem, je zřejmé, že je zde mnoho proměnných, které ji limitují. Faktem ovšem zůstává, že byť metoda mnohdy nepřináší konzistentní biochemické ani behaviorální výsledky, je stále poměrně neinvazivní, nenáročná vůči zvířecím i lidským subjektům a v kontrastu například s genetickými modely také poměrně ekonomická. Jsou to právě tyto aspekty, jež metodu tryptofanové deplece výrazně benefitují, a oproti ostatním metodám ji na poli vědy činí nepostradatelnou. Zjištění zde prezentovaná jsou hodnotná především pro rozvoj této metody. Důležitost předkládané práce však tkví nejen v tom, že by mohla přispět k dalšímu zdokonalení metody tryptofanové deplece, ale také by mohla zlepšit validitu animálních modelů postavených na podkladu deplece tryptofanu. Zároveň otevírá prostor pro myšlenku použít tento animální model pro testování dalších farmak, která by mohla cílit na regulaci NOS, a tím přispět k léčbě neuropsychiatrických poruch a onemocnění.

9. Literatura

Adams, W. K., Halberstadt, A. L. and van den Buuse, M. (2013) Hippocampal serotonin depletion unmasks differences in the hyperlocomotor effects of phencyclidine and MK-801: quantitative versus qualitative analyses. Frontiers in pharmacology, 4: 1 –11.

Airhart, M. J., Lee, D. H., Wilson, T. D., Miller, B. E., Miller, M. N., Skalko, R. G. and Monaco, P. J. (2012) Adverse effects of serotonin depletion in developing zebrafish. Neurotoxicology and teratology, 34: 152–160.

Albert, A. and Gledhill, W. (1945) Improved synthesis of aminoacridines V. Substituted 5-aminoacridines. Journal of the Society of Chemical Industry, 64: 169–172.

Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochemical Journal, 357: 593–615.

Alonso, A., Merchán, P., Sandoval, J. E., Sánchez-Arrones, L., Garcia-Cazorla, A. Artuch, R., Ferrán, J. L., Martínez-de-la-Torre, M. and Puelles, L. (2013) Development of the serotonergic cells in *murine raphe nuclei* and their relations with rhombomeric domains. Brain Structure Function, 218: 1229 –1277.

Ameen-Ali, K. E., Easton, A. and Eacott, M. J. (2015) Moving beyond standard procedures to assess spontaneous recognition memory. Neuroscience and biobehavioral reviews, 53: 37–51.

Antunes, M. and Biala, G. (2012) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cognitive Processing, 13: 93–110.

Armbruster, H., Vetter, W., Beckerhoff, R., Nussberger, J., Vetter, H. and Siegenthaler, W. (1975) Diurnal variations of plasma aldosterone in supine man: relationship to plasma renin activity and plasma cortisol. Acta endocrinologica, 80: 95–103.

Badawy, A. A. and Morgan, C. J. (1982) Tryptophan and tryptophan pyrrolase in haem regulation. The role of lipolysis and direct displacement of serum-protein-bound tryptophan in the opposite effects of administration of endotoxin, morphine, palmitate, salicylate and theophylline on rat liver 5-aminolaevulinate synthase activity and the haem saturation of tryptophan pyrrolase. Biochemical Journal, 206: 451–460.

Baker, D. H. (2005) Comparative nutrition and metabolism: explication of open questions with emphasis on protein and amino acids. Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 102: 17897–17902.

Bali, A. and Jaggi, A. S. (2014) Multifunctional aspects of allopregnanolone in stress and related disorders. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 48: 64–78.

Bartus, R. T., Dean, R. L., Beer, B. and Lippa, A. S. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. Science, 217: 408–414.

Bashkatova, V. G., Bogdanova, N. G., Alexeeva, E.V., Nazarova, G. A. and Sudakov, S. K. (2020) Peculiarities of influence of NO-synthase inhibitors on behavioral parameters of rats. I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald, 28: 275 –282.

Bast, T., Zhang, W., Feldon, J. and White, I. M. (2000) Effects of MK801 and neuroleptics on prepulse inhibition: re-examination in two strains of rats. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 67: 647–658.

Baulieu, E. E. (1998) Neurosteroids: a novel function of the brain. Psychoneuroendocrinology, 23: 963 –987.

Berger, M., Gray, J. A. and Roth, B. L. (2009) The expanded biology of serotonin. Annual Review of Medicine, 60: 355 –366.

Bielavsky, J. (1977) Analogues of 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 42: 2802 –2808.

Biggio, G., Fadda, F., Fanni, P., Tagliamonte, A., and Gessa, G. L. (1974) Rapid depletion of serum tryptophan, brain tryptophan, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid by a tryptophan-free diet. Life Sciences, 14: 1321–1329.

Birch, P. J., Grossman, C. J. and Hayes, A. G. (1988a) Kynurenate and FG9041 have both competitive and non-competitive antagonist actions at excitatory amino acid receptors. European Journal of Pharmacology, 151: 313–315.

Birch, P. J., Grossman, C. J. and Hayes, A. G. (1988b) Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. European Journal of Pharmacology, 154: 85–87.

Blokland, A., Lieben, C. K. J. and Deutz, N. E. P. (2002) Anxiogenic and depressive-like effects, but no cognitive deficits, after repeated moderate tryptophan depletion in the rat. Journal of Psychofarmacology, 16: 39 –49.

Booij, L., van der Does, A. J., Haffmans, P. M., Spinhoven, P. and McNally, R. J. (2005) Acute tryptophan depletion as a model of depressive relapse: behavioural specificity and ethical considerations. The British journal of psychiatry: the journal of mental science, 187: 148–154.

Bortolato, M., Frau, R., Orrù, M., Bourov, Y., Marrosu, F., Mereu, G., Devoto, P. and Gessa, G. L. (2008a) Antipsychotic-Like Properties of 5-α-Reductase Inhibitors. Neuropsychopharmacology, 33: 3146–3156.

Bortolato, M., Frau, R., Orrù, M., Collu, M., Mereu, G., Carta, M., Fadda, F. and Stancampiano, R. (2008b) Effects of tryptophan deficiency on prepulse inhibition of the acoustic startle in rats. Psychopharmacology 198: 191–200.

Bubenikova, V., Horacek, J., Kozeny, J., Platilova, V., Zavěšicka, L., Palenicek, T. and Höschl, C. (2004) The effect of tryptophan depletion on the action of haloperidol in MK-801-treated rats. European journal of pharmacology, 502: 1 –2, 109– 116.

Cahir, M., Ardis, T. and Reynolds G. P. (2007) Acute and chronic tryptophan depletion differentially regulate central 5-HT1A and 5-HT2A receptor binding in the rat. Psychofarmacology, 190: 497– 506.

Cervenka, I., Agudelo, L. Z. and Ruas, J. L. (2017) Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. Science, 357: 1– 10.

Cohen, S. J. and Stackman, R. W., Jr. (2015) Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. Behavioural brain research, 285: 105–117.

Compagnone, N. A. and Mellon, S. H. (2000) Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. Frontiers in Neuroendocrinology, 21: 1– 56.

Concu, A., Fadda, F., Blanco, S., Congia, S. and Lostia, M. (1977) Mental changes induced by the oral administration of tryptophan-free amino acid mixtures in man. IRCS Medical Science, 5: 520.

Cooke, H. J. and Christofi, F. L. (2006) Enteric neural regulation of mucosal secretion. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract, L. R. Johnson (ed.), Academic Press, New York, USA, pp. 737–762.

Crane, B. R., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Wu, C., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J. and Tainer, J. A. (1998) Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. Science, 279: 2121–2126.

Crismon, M. L. (1994) Tacrine: first drug approved for Alzheimer's disease. The Annals of pharmacotherapy, 28: 744–751.

Dahlstrom, A. and Fuxe, K. (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. Acta Physiologica Scandinavica, 62: 1–55.

Daly, E., Ecker, C., Hallahan, B., Deeley, Q., Craig, M., Murphy, C., Johnston, P., Spain, D., Gillan, N., Gudbrandsen, M., Brammer, M., Giampietro, V., Lamar, M., Page, L., Toal, F., Schmitz, N., Cleare, A., Robertson, D., Rubia, K. and Murphy, D. G. (2014) Response inhibition and serotonin in autism: a functional MRI study using acute tryptophan depletion. Brain: a journal of neurology, 137: 2600–2610.

Daniel, P. M., Love, E. R., Moorhouse, S. R. and Pratt, O. E. (1981) The effect of insulin upon the influx of tryptophan into the brain of the rabbit. The Journal of Physiology, 312: 551– 62.

Daniell, L. C. (1990) The noncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonists, MK-801, phencyclidine and ketamine, increase the potency of general anesthetics. Pharmacology, biochemistry, and behavior, 36: 111–115.

Dantzer, R. (2017) Role of the Kynurenine Metabolism Pathway in Inflammation-Induced Depression: Preclinical Approaches. Current topics in behavioral neurosciences, 31: 117–138.

Davis, I. and Liu, A. (2015) What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapeutics? Expert review of neurotherapeutics, 15: 719–721.

Denninger, J. K., Smith, B. M. and Kirby, E. D. (2018) Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget. Journal of visualized experiments, 141: 1– 10.

Diniz, D. M., Calabrese, F., Brivio, P., Riva, M. A., Grandjean, J. and Homberg, J. R. (2021) BDNF Overexpression in the Ventral Hippocampus Promotes Antidepressant- and

Anxiolytic-Like Activity in Serotonin Transporter Knockout Rats. International Journal of Molecular Sciences, 22: 1– 20.

Eichenbaum, G., Damsch, S., Looszova, A., Vandenberghe, J., van den Bulck, K., Roels, K., Megens, A., Knight, E., Hillsamer, V., Feyen, B., Kelley, M. F., Tonelli, A., and Lammens, L. (2011) Impact of gavage dosing procedure and gastric content on adverse respiratory effects and mortality in rat toxicity studies. Journal of applied toxicology, 31: 342–354.

Ellinger, A. and Flamand, C. (1908) Uber syntetisch gewonnes tryptophan und einige seiner derivate. Hoppe-Selye's Z Physiol Chemistry, 55: 8–24.

Ellison, G. D. and Bresler, D. E. (1974) Tests of Emotional Behavior in Rats following Depletion of Norepinephrine, of Serotonin, or of Both. Psychopharmacologia, 34: 275–288.

Ennaceur, A. and Delacour, J. (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. Behavioural Brain Research, 31: 47–59.

Fadda, F., Cocco, S. and Stancampiano, R. (2000) A physiological method to selectively decrease brain serotonin release. B, 5: 219–222.

Fantini, S., Sassaroli, A., Tgavalekos, K. T. and Kornbluth, J. (2016) Cerebral blood flow and autoregulation: current measurement techniques and prospects for noninvasive optical methods. Neurophotonics, 3: 1– 32.

Farhan, M., Rafiq, H. and Rafi, H. (2015) Anxiolytic profile of tryptophan as monitored following repeated administration in male rats. Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 48: 74– 78.

Felten, D. L., Sladek Jr., J. R. (1983) Monoamine distribution in primate brain *V. Monoaminergic nuclei*: anatomy, pathways and local organization. Brain Research Bulletin, 10: 171–284.

Fernando, A. B., and Robbins, T. W. (2011) Animal models of neuropsychiatric disorders. Annual review of clinical psychology, 7: 39–61.

Fernstrom, J. D. (1983) Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. Physiological Reviews, 63: 484– 546.

Fernstrom, J. D. and Wurtman, R. J. (1971) Brain serotonin content: physiological dependence on plasma tryptophan levels. Science, 173: 149–152.

Finn, D. A., Roberts, A. J., Long, S., Tanchuck, M. and Phillips, T. J. (2003) Neurosteroid consumption has anxiolytic effects in mice. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 76: 451– 462.

Forestiero, D., Manfrim, C. M., Guimarães, F. S. and de Oliveira, R. M. (2006) Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats. Psychopharmacology, 184: 166– 172.

Förstermann, U. and Sessa, W. C. (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. European heart journal, 33: 829–837.

Fozard, J. R. (1984) MDL 72222: a potent and highly selective antagonist at neuronal 5-hydroxytryptamine receptors. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 326: 36– 44.

Franklin, M., Bermudez, I., Murck, H., Singewald, N., and Gaburro, S. (2012) Sub-chronic dietary tryptophan depletion-an animal model of depression with improved face and good construct validity. Journal of psychiatric research, 46: 239–247.

Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S. I., Takada, Y. and Smith, Q. R. (1991) Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. Journal of Neurochemistry, 56: 2007–2017.

Fülling, C., Dinan, T. G., and Cryan, J. F. (2019) Gut Microbe to Brain Signaling: What Happens in Vagus…. Neuron, 101: 998–1002.

Funder, J. W. (2017) Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors-Physiology and Pathophysiology. International journal of molecular sciences, 18: 1–9.

Geyer, M. A. and Moghaddam, B. (2002) Animal models relevant to schizophrenia disorders. In: Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress, Kenneth L. Davis, Dennis Charney, Joseph T. Coyle and Charles Nemeroff (ed.), Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, USA, pp. 689–701.

Giacomini, A. C., Bueno, B. W., Marcon, L., Scolari, N., Genario, R., Demin, K. A., Kolesnikova, T. O., Kalueff, A. V. and de Abreu, M. S. (2020) An acetylcholinesterase inhibitor, donepezil, increases anxiety and cortisol levels in adult zebrafish. Journal of Psychopharmacology, 34: 1449–1456.

Gibson, G. E. and Manger, T. (1988) Changes in cytosolic free calcium with 1,2,3,4-tetrahydro-5-aminoacridine, 4-aminopyridine and 3,4- diaminopyridine. Biochemical Pharmacology, 37: 4191–4196.

Gillet, G., Ammor, S. and Fillion, G. (1985) Serotonin inhibits acetylcholine release from rat striatum slices: evidence for a presynaptic receptor-mediated effect. Journal of neurochemistry, 45: 1687–1691.

Golightly, K. L., Lloyd, J. A., Hobson, J. E., Gallagher, P., Mercer, G. and Young, A. H. (2001) Acute tryptophan depletion in schizophrenia. Psychological Medicine, 31: 75–84.

Gostner, J. M., Geisler, S., Stonig, M., Mair, L., Sperner-Unterweger, B. and Fuchs, D. (2020) Tryptophan Metabolism and Related Pathways in Psychoneuroimmunology: The Impact of Nutrition and Lifestyle. Neuropsychobiology, 79: 89–99.

Green, A. R. and Curzon, G. (1968) Decrease of 5-hydroxytryptamine in the brain provoked by hydrocortisone and its prevention by allopurinol. Nature, 220: 1095–1097.

Greenshaw, A. J. (1993) Behavioural pharmacology of 5-HT3 receptor antagonists: a critical update on therapeutic potential. Trends in Pharmacological Sciences, 14: 265–270.

Han, Q., Cai, T., Tagle, D. A. and Li, J. (2010) Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains. Cellular and Molecular Life Sciences, 67: 353– 368.

Harrison, N. L. and Simmonds, M. A. (1984) Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. Brain Research, 323: 287– 292.

Hatip-Al-Khatib, I., Mishima, K., Iwasaki, K. and Fujiwara, M. (2001) Microdialysates of amines and metabolites from core *nucleus accumbens* of freely moving rats are altered by dizocilpine. Brain Research, 902: 108–118.

Henry, Y., Colle´aux, Y., Ganier, P., Saligaut, A. and Je´go, P. (1992) Interactive effects of dietary levels of tryptophan and protein on voluntary feed intake and growth performance in pigs, in relation to plasma free amino acids and hypothalamic serotonin. Journal of Animal Science, 70: 1873–1887.

Henry, Y., Seve, B., Mounier, A. and Ganier, P. (1996) Growth performance and brain neurotransmitters in pigs as affected by tryptophan, protein, and sex. Journal of Animal Science, 74: 2700–2710.

Hoffman, D. C., Donovan, H. and Cassella, J. V. (1993) The effects of haloperidol and clozapine on the disruption of sensorimotor gating induced by the noncompetitive glutamate antagonist MK-801. Psychopharmacology, 111: 339– 344.

Höglund, E., Øverli, Ø. and Winberg, S. (2019) Tryptophan Metabolic Pathways and Brain Serotonergic Activity: A Comparative Review. Frontiers in endocrinology, 10: 1–11.

Hopkins, F. G and Cole, S. W. (1901) A contribution to the chemistry of proteids: Part I. A preliminary study of a hitherto undescribed product of tryptic digestion. The Journal of Physiology, 27: 418–28.

Horak, M., Holubova, K., Nepovimova, E., Krusek, J., Kaniakova, M., Korabecny, J., Vyklicky, L., Kuca, K., Stuchlik, A., Ricny, J., Vales, K. and Soukup, O. (2017) The pharmacology of tacrine at N-methyl-d-aspartate receptors. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 75: 54– 62.

Hoyer, D., Clarke, D. E., Fozard, J. R., Hartig, P. R., Martin, G. R., Mylecharane, E. J., Saxena, P. R., and Humphrey, P. P. (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). Pharmacological reviews, 46: 157–203.

Huang, P. L. (2003) Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. Current hypertension reports, 5: 473–480.

Hüfner, K., Galffy, M., Egeter, J., Giesinger, J. M., Arnhard, K., Oberacher, H., Gostner, J. M., Fuchs, D. and Sperner-Unterweger, B. (2020) Acute and Chronic Mental Stress Both Influence Levels of Neurotransmitter Precursor Amino Acids and Derived Biogenic Amines. Brain sciences, 10: 1–12.

Hughes, J. H., Gallagher, P., Stewart, M. E., Matthews, D., Kelly, T. P. and Young, A. H. (2003) The effects of acute tryptophan depletion on neuropsychological function. J. hypothalamus. Neuroscience, 62: 265–271.

Chartoff, E. H., Heusner, C. L. and Palmiter, R. D. (2005) Dopamine is not required for the hyperlocomotor response to NMDA receptor antagonists. Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 30: 1324–1333.

Chen, C. Q., Fichna, J., Bashashati, M., Li, Y. Y. and Storr, M. (2011) Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut. World journal of gastroenterology, 17: 3888–3898.

Chiarugi, A., Rovida, E., Dello Sbarba, P. and Moroni, F. (2003) Tryptophan availability selectively limits NO-synthase induction in macrophages. Journal of leukocyte biology, 73: 172–177.

Chobot, V., Hadacek, F., Weckwerth, W., and Kubicova, L. (2015) Iron chelation and redox chemistry of anthranilic acid and 3-hydroxyanthranilic acid: A comparison of two structurally related kynurenine pathway metabolites to obtain improved insights into their potential role in neurological disease development. Journal of organometallic chemistry, 782: 103–110.

Chojnacka-Wojcik, E., Klodzinska, A. and Pilc, A. (2001) Glutamate receptor ligands as anxiolytics. Current Opinion in Investigational Drugs, 2: 1112–1119.

Christmas, D. M., Potokar, J. and Davies, S. J. (2011) A biological pathway linking inflammation and depression: activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. Neuropsychiatric disease and treatment, 7: 431–439.

Christofi, F. L. (2008) Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. Purinergic Signal, 4: 213–236.

Izquierdo, A., Carlos, K., Ostrander, S., Rodriguez, D., McCall-Craddolph, A., Yagnik, G. and Zhou, F. (2012) Impaired reward learning and intact motivation after serotonin depletion in rats. Behavioural Brain Research, 233: 494–499.

Jacobs, B. L. and Azmitia, E. C. (1992) Structure and Function of the Brain Serotonin System. Physiological Reviews, 72: 165–215.

Jans, L. A. W., Korte-Bouws, G. A. H., Korte, S. M. and Blokland, A. (2010) The effects of acute tryptophan depletion on affective behaviour and cognition in Brown Norway and Sprague Dawley rats. Journal of Psychopharmacology, 24: 605–614.

Jans, L. A. W., Lieben, C. K. J., Smits, L. T. and Blokland, A. (2009) Pharmacokinetics of acute tryptophan depletion using a gelatin-based protein in male and female Wistar rats. Amino Acids, 37: 349–357.

Jefferson, B., Laine, A., Le Clech, P., Diaper, C., Carter, B. and Judd, S. (2001) Serotonin depletion attenuates cocaine seeking but enhances sucrose seeking and the effects of cocaine priming on reinstatement of cocaine seeking in rats. Psychopharmacology, 157: 340–348.

Jenkins, T. A., Elliott, J. J., Ardis, T. C., Cahir, M., Reynolds, G. P., Bell, R. and Cooper, S. J. (2010) Tryptophan depletion impairs object-recognition memory in the rat: Reversal by risperidone. Behavioural Brain Research, 208: 479483.

Johansson, C., Jackson, D. M., Zhang, J. and Svensson, L. (1995) Prepulse inhibition of acoustic startle, a measure of sensorimotor gating: effects of antipsychotics and other agents in rats. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 52: 649–654.

Kaidanovich-Beilin, O., Cha, D. S., and McIntyre, R. S. (2012) Crosstalk between metabolic and neuropsychiatric disorders. F1000 biology reports, 4: 1–10.

Kaniakova, M., Kleteckova, L., Lichnerova, K., Holubova, K., Skrenkova, K., Korinek, M., Krusek, J., Smejkalova, T., Korabecny, J., Vales, K., Soukup, O. and Horak, M. (2018) 7-Methoxyderivative of tacrine is a 'foot-in-the-door' open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity in vivo. Neuropharmacology, 140: 217–232.

Karu, N., McKercher, C., Nichols, D. S., Davies, N., Shellie, R. A., Hilder, E. F. and Jose, M. D. (2016) Tryptophan metabolism, its relation to inflammation and stress markers and association with psychological and cognitive functioning: Tasmanian Chronic Kidney Disease pilot study. BMC nephrology, 17: 1–13.

Kaye, W. H., Barbarich, N. C., Putnam, K., Gendall, K. A., Fernstrom, J., Fernstrom, M., McConaha, C. W. and Kishore, A. (2003) Anxiolytic effects of acute tryptophan depletion in *anorexia nervosa*. International Journal of Eating Disorders, 33: 257–267.

Kaye, W. H., Gendall, K. A., Fernstrom, M. H., Fernstrom, J. D., McConaha, C. W. and Weltzin, T. E. (2000) Effects of acute tryptophan depletion on mood in *bulimia nervosa*. Biological Psychiatry, 47: 151–157.

Kerr, Ch. W. (1994) The Serotonin Theory of Depression. Jefferson Journal of Psychiatry, 12: 3–14.

Khisti, R. T., Chopde, C. T. and Jain, S. P. (2000) Antidepressant-like effect of the neurosteroid 3alphahydroxy-5alpha-pregnan-20-one in mice forced swim test. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 67: 137–143.

Kim, Y., Jang, Y. N., Kim, J. Y., Kim, N., Noh, S., Kim, H., Queenan, B. N., Bellmore, R., Mun, J. Y., Park, H., Rah, J. C., Pak, D. T. S. and Lee, K. J. (2020) Microtubule-associated protein 2 mediates induction of long-term potentiation in hippocampal neurons. The FASEB Journal., 34: 6965–6983.

Kinlein, S. A., Wilson, C. D. and Karatsoreos, I. N. (2015) Dysregulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis function contributes to altered endocrine and neurobehavioral responses to acute stress. Frontiers in Psychiatry 6: 1–9.

Koek, W., Woods, J. H. and Winger, G. D. (1988) MK-801, a Proposed Noncompetitive Antagonist of Excitatory Amino Acid Neurotransmission, Produces Phencyclidine-like Behavioral Effects in Pigeons, Rats and Rhesus Monkeys. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 245: 969–974.

Konakchieva, R., Mitev, Y., Almeida, O. F. and Patchev, V. K. (1997) Chronic melatonin treatment and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat: attenuation of the secretory response to stress and effects on hypothalamic neuropeptide content and release. Biology of the cell, 89: 587–596.

Korinek, M., Kapras, V., Vyklicky, V., Adamusova, E., Borovska, J., Vales, K., Stuchlik, A., Horak, M., Chodounska, H. and Vyklicky Jr. L. (2011) Neurosteroid modulation of N-methyl-Daspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects. Steroids, 76: 1409–1418.

Kumar, N., Budania, N., Mondal, A., Tafseer, S., Ahuja, S. and Bhardwaj, V. (2018) Effect of dizocilpine (MK-801) on the working memory of rats on a three-panel runway apparatus. International journal of basic and clinical pharmacology, 7: 2373–2377.

Kurhe, Y. V., Radhakrishnan, M., Thangaraj, D. and Gupta, D. (2014) Anti-anxiety effect of a novel 5-HT_3 receptor antagonist N-(benzo[d]thiazol-2-yl)-3-ethoxyquinoxalin-2-carboxamide (6k) using battery tests for anxiety in mice. Indian journal of pharmacology, 46: 100–104.

Larkin, P. B., Sathyasaikumar, K. V., Notarangelo, F.M., Funakoshi, H., Nakamura, T., Schwarcz, R. and Muchowski, P. J. (2016) Tryptophan 2,3-dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 make separate, tissue-specific contributions to basal and

inflammation-induced kynurenine pathway metabolism in mice. Biochim Biophys Acta., 1860: 2345–2354.

Lavelle, E. C., Murphy, C., O'Neill, L. A. and Creagh, E. M. (2010) The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. Mucosal Immunol., 3: 17–28.

Le Floc'h, N., Otten, W. and Merlot, E. (2010) Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. Amino Acids, 41, 1195–1205.

Lesch, K. P. and Mössner, R. (1998) Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? Biol Psychiatry, 44: 179–192.

Lesch, K. P. and Waider, J. (2012) Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders. Neuron., 76: 175–191.

Li, C. C., Jiang, N., Gan, L., Zhao, M. J., Chang, Q., Liu, X. M. and Pan, R. L. (2020) Peripheral and cerebral abnormalities of the tryptophan metabolism in the depression-like rats induced by chronic unpredicted mild stress. Neurochemistry International, 138: 130.

Lieben, C. K. J., Blokland, A., Westerink, B. and Deutz, N. E. P. (2004a) Acute tryptophan and serotonin depletion using an optimized tryptophan-free protein–carbohydrate mixture in the adult rat. Neurochemistry International, 44: 9–16.

Lieben, C. K. J., Oorsouw, Kim van, Deutz, N. E. P. and Blokland, A. (2004) Acute tryptophan depletion induced by a gelatin-based mixture impairs object memory but not affective behavior and spatial learning in the rat. Behavioural Brain Research, 151: 53–64.

Lipska, B. K. and Weinberger, D. R. (2000) To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 23: 223–239.

Liu, H., Zhou, J., Fang, L., Liu, Z., Fan, S., and Xie, P. (2013) Acute Tryptophan Depletion Reduces Nitric Oxide Synthase in the Rat Hippocampus. Neurochemical Research, 38: 2595–2603.

Lopez, M. J. and Mohiuddin, S. S. (2020) Biochemistry, Essential Amino Acids. In: StatPearls [Internet], StatPearls Publishing, Treasure Island, Florida, USA. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/

López-Gil, X., Artigas, F. and Adell, A. (2009) Role of different monoamine receptors controlling MK-801-induced release of serotonin and glutamate in the medial prefrontal cortex: relevance for antipsychotic action. International Journal of Neuropsychopharmacology, 12: 487–499.

Lukić, I., Getselter, D., Koren, O. and Elliott, E. (2019) Role of Tryptophan in Microbiota-Induced Depressive-Like Behavior: Evidence From Tryptophan Depletion Study. Frontiers in behavioral neuroscience, 13: 1–10.

Maes, M., Leonard, B. E., Myint, A. M., Kubera, M. and Verkerk, R. (2011) The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry, 35: 702–721.

Mahan, D. C. and Shields, R. G. (1998) Essential and nonessential amino acid composition of pigs from birth to 145 kilograms of body weight, and comparison to other studies. Journal of Animal Science, 76: 513–521.

Majumdar, P. N. and Nakhla, A. M. (1977) Influence of tryptophan on the activity of acetylcholinesterase in the brain of well-fed normal and adrenalectomized rats. Biochemical and biophysical research communications, 76: 71–77.

Mammadova-Bach, E., Mauler, M., Braun, A. and Duerschmied, D. (2017) Immuno Thrombotic Effects of Platelet Serotonin. In: Serotonin: A Chemical Messenger Between All Types of Living Cells, Kaneez Fatima Shad (ed.), InTechOpen, London, UK, pp. 253–269.

Mann, C., Croft, R. J., Scholes, K. E., Dunne, A., O'Neill, B. V., Leung, S., Copolov, D., Phan, K. L. and Nathan, P. J. (2008) Differential effects of acute serotonin and dopamine depletion on prepulse inhibition and P50 suppression measures of sensorimotor and sensory gating in humans. Neuropsychopharmacology, 33: 1653–1666.

Marcotte, E. R., Pearson, D. M. and Srivastava, L. K. (2001) Animal models of schizophrenia: a critical review. Journal of psychiatry & neuroscience: JPN, 26: 395–410.

Markus, C. R. (2008) Dietary amino acids and brain serotonin function; implications for stress-related affective changes. NeuroMolecular Medicine, 10: 1-12.

Marx, C. E., Stevens, R. D., Shampine, L. J., Uzunova, V., Trost, W. T., Butterfield, M. I., Massing, M. W., Hamer, R. M., Morrow, A. L. and Lieberman, J. A. (2006) Neuroactive steroids are altered in schizophrenia and bipolar disorder: relevance to pathophysiology and therapeutics. Neuropsychopharmacology, 31: 1249–1263.

Mawe, G. M. and Hoffman, J. M. (2013) Serotonin signalling in the gut–functions, dysfunctions and therapeutic targets. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 10: 473–486.

McMenamy, R. H. (1965) Binding of indole analogues to human serum albumin. Effects of fatty acids. Journal of Biological Chemistry, 240: 4235–4243.

Mehta, H., Haobam, R., Usha, R. and Mohanakumar, K. P. (2005) Evidence for the involvement of central serotonergic mechanisms in cholinergic tremor induced by tacrine in Balb/c mice. Behavioural brain research, 163: 227–236.

Meijer, M. K. (2005) Urinary corticosterone levels in mice in response to intraperitoneal injections with saline. Journal of applied animal welfare science, 8: 279–283.

Meltzer, H. Y. (1990) Role of serotonin in depression. Annals of the New York Academy of sciences, 600: 486–499.

Mendelsohn, D., Riedel, W. J. and Sambeth, A. (2009) Effects of acute tryptophan depletion on memory, attention and executive functions. A systematic review, 33: 926–952.

Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A. and Meisel, A. (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. Trends in neurosciences, 36: 587–597.

Mineur, Y. S., Obayemi, A., Wigestrand, M. B., Fote, G. M., Calarco, C. A., Li, A. M. and Picciotto, M. R. (2013) Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety and depression-like behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110: 3573–3578.

Miranda, M., Morici, J. F., Zanoni, M. B. and Bekinschtein, P. (2019) Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. Frontiers in cellular neuroscience, 13: 1–25.

Modoux, M., Rolhion, N., Mani, S. and Sokol, H. (2020) Tryptophan Metabolism as a Pharmacological Target. Trends in Pharmacological Sciences, 42: 60–73.

Moehn, S., Pencharz, P. B. and Ball, R. O. (2012) Lessons Learned Regarding Symptoms of Tryptophan Deficiency and Excess from Animal Requirement Studies. The Journal of Nutrition, 142: 2231–2235.

Mondadori, C., Borkowski, J. and Gentsch, C. (1996) The memory-facilitating eff ects of the competitive NMDA-receptor antagonist CGP 37849 are steroid-sensitive, whereas its memory-impairing effects are not. Psychopharmacology, 124: 380–383.

Mosher, L. J., Cadeddu, R., Yen, S., Staudinger, J. L., Traccis, F., Fowler, S. C., Maguire, J. L. and Bortolato, M. (2019) Allopregnanolone is required for prepulse inhibition deficits induced by D1 dopamine receptor activation. Psychoneuroendocrinology, 108: 53–61.

Munafo, M. R., Hayward, G. and Harmer, C. (2006) Selective processing of social threat cues following acute tryptophan depletion. Journal of Psychopharmacology, 20: 33–39.

Murck, H., Schüssler, P. and Steiger, A. (2012) Renin-Angiotensin-Aldosterone System: The Forgotten Stress Hormone System: Relationship to Depression and Sleep. Pharmacopsychiatry, 45: 83–95.

Nance, D. and Kilbey, M. (1973) Effects of dl-para-chlorophenylalanine on sucrose preference and intake: reversal by 5-hydroxytryptophan and 6-methoxy 1,2,3,4,-tetrahydro-beta-carboline. Pharmacology, biochemistry, and behavior, 1: 255–258.

Napoli, E., Schneider, A., Wang, J. Y., Trivedi, A., Carrillo, N. R., Tassone, F., Rogawski, M., Hagerman, R. J. and Giulivi, C. (2019) Allopregnanolone Treatment Improves Plasma Metabolomic Profile Associated with GABA Metabolism in Fragile X-Associated Tremor/Ataxia Syndrome: a Pilot Study. Molecular neurobiology, 56: 3702–3713.

Naughton, M., Dinan, T. G. and Scott, L. V. (2014) Corticotropin-releasing hormone and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in psychiatric disease. Handbook of Clinical Neurology, 124: 69–91.

Nestler, E. J. and Hyman, S. E. (2010) Animal models of neuropsychiatric disorders. Nature neuroscience, 13: 1161–1169.

Neumeister, A., Bain, E., Nugent, A. C., Carson, R. E., Bonne, O., Luckenbaugh, D. A., Eckelman, W., Herscovitch, P., Charney, D. S., Drevets, W. C. (2004) Reduced serotonin type 1A receptor binding in panic disorder. The Journal of Neuroscience, 24: 589–591.

Nichols, D. E. and Nichols, C. D. (2008) Serotonin receptors. Chemical Reviews, 108: 1614–1641.

Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B. T., Pai, E. F. and Nishino, T. (2008) Mammalian xanthine oxidoreductase – mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. The FEBS Journal, 275: 3278–3289.

O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G. nad Cryan, J. F. (2015) Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. Behavioural Brain Research, 277: 32–48.

Obara-Michlewska, M., Tuszyńska, P. and Albrecht, J. (2013) Ammonia upregulates kynurenine aminotransferase II mRNA expression in rat brain: a role for astrocytic NMDA receptors? Metabolic brain disease, 28: 161–165.

Olivier, J. D. A., Jans, L. A. W., Blokland, A., Broers, N. J., Homberg, J. R., Ellenbroek, B. A. and Cools, A. R. (2009) Serotonin transporter deficiency in rats contributes to impaired object memory. Genes, Brain and Behavior, 8: 829–834.

Olivier, J. D. A., Jans, L. A. W., Korte-Bouws, G. A. H., Korte, S. M., Deen, P. M. T., Cools, A. R., Ellenbroek, B. A. and Blokland, A. (2008) Acute tryptophan depletion dose dependently impairs object memory in serotonin transporter knockout rats. Psychopharmacology, 200: 243–254.

Olney, J. W. (1989) Glutamate, a Neurotoxic Transmitter. Journal of Child Neurology, 4: 218–226.

Olsson, S. K., Samuelsson, M., Saetre, P., Lindström, L., Jönsson, E. G., Nordin, C., Engberg, G., Erhardt, S. and Landén, M. (2010) Elevated levels of kynurenic acid in the cerebrospinal fluid of patients with bipolar disorder. Journal of psychiatry & neuroscience, 35: 195–199.

Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemin, G. J., Miller, C. L., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., von Deimling, A., Wick, W. and Platten, M. (2011) An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. Nature, 478: 197–203.

Pähkla, R., Zilmer, M., Kullisaar, T. and Rägo, L. (1998) Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro. Journal of Pineal Research, 24: 96–101.

Palego, L., Betti, L., Rossi, A. and Giannaccini, G. (2016) Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. Journal of Amino Acids, 2016: 1–13.

Pan, S. Y., Yu, Z. L., Dong, H., Lee, N. T., Wang, H., Fong, W. F., Han, Y. F. and Ko, K. M. (2007) Evaluation of acute bis(7)-tacrine treatment on behavioral functions in 17-day-old and 30-day-old mice, with attention to drug toxicity. Pharmacology, biochemistry and behavior, 86: 778–783.

Pan, S. Y., Yu, Z. L., Xiang, C. J., Dong, H., Fang, H. Y. and Ko, K. M. (2009) Comparison Studies of Tacrine and Bis(7)-Tacrine on the Suppression of Scopolamine-Induced Behavioral Changes and Inhibition of Acetylcholinesterase in Mice. Pharmacology, 83: 294–300.

Pandi-Perumal, S. R., Srinivasan, V., Maestroni, G. J., Cardinali, D. P., Poeggeler, B. and Hardeland, R. (2006) Melatonin: Nature's most versatile biological signal? The FEBS Journal, 273: 2813–2838.

Papadia, C., Osowska, S., Cynober, L. and Forbes, A. (2018) Citrulline in health and disease. Review on human studies. Clinical nutrition, 37: 1823–1828.

Pardridge, W. M. (1979) Tryptophan transport through the blood–brain barrier: in vivo measurement of free and albumin-bound amino acid. Life Sciences, 25: 1519–1528.

Pardridge, W. M. (1998) Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. Neurochemical Research, 23: 635–644.

Patchev, V. K., Shoaib, M., Holsboer, F. and Almeida, O. F. (1994) The neurosteroid tetrahydroprogesterone counteracts corticotropin-releasing hormone-induced anxiety and alters the release and gene expression of corticotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus. Neuroscience, 62: 265–271.

Pelegrina, L. T., Escudero, C., Giuliani, F. A., García, M., Cabrera, R. J. and Laconi, M. R. (2015) Pharmacological effect of one icv dose of allopregnanolone in the female rat: behavioral profile. Brazilian Journal of Biological Sciences, 2: 39–50.

Pelosi, B., Pratelli, M., Migliarini, S., Pacini, G., and Pasqualetti, M. (2015) Generation of a Tph2 Conditional Knockout Mouse Line for Time and Tissue-Specific Depletion of Brain Serotonin. PloS one, 10: 1–19.

Pereira-Figueiredo, I., López, D. E., Nazaret, A. and Muñoz, L. J. (2015) Stressful effects of the intraperitoneal injections in rats. Laboratory Animals, 49: 90.

Pérez-Neri, I. and Diéguez-Campa, C. E. (2018) Relevancia de la citrulina para el sistema nervioso central. Archivos de Neurociencias, 23: 50–54.

Perkins, M. N. and Stone, T. W. (1983a) Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 226: 551–557.

Perkins, M. N. and Stone, T. W. (1983b) Quinolinic acid: regional variations in neuronal sensitivity. Brain Research, 259: 172–176.

Petrasek, T. and Stuchlik, A. (2009) Serotonin-depleted rats are capable of learning in active place avoidance, a spatial task requiring cognitive coordination. Physiological research, 58: 299–303.

Pinna, G. (2020) Allopregnanolone, the Neuromodulator Turned Therapeutic Agent: Thank You, Next? Frontiers in endocrinology, 11: 1–6.

Plałaźnik, A., Jessa, M. and Nazar, M. (1997) The behavioural effects of NMDA antagonist in serotonin depleted rats. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 58: 159–166.

Plitman, E., Iwata, Y., Caravaggio, F., Nakajima, S., Chung, J. K., Gerretsen, P., Kim, J., Takeuchi, H., Chakravarty, M. M., Remington, G. and Graff-Guerrero, A. (2017) Kynurenic Acid in Schizophrenia: A Systematic Review and Meta analysis. Schizophrenia bulletin, 43: 764–777.

Pockros, L. A., Pentkowski, N. S., Conway, S. M., Ullman, T. E., Zwick, K. R. and Neisewander, J. L. (2012) 5-HT(2A) receptor blockade and 5-HT(2C) receptor activation interact to reduce cocaine hyperlocomotion and Fos protein expression in the caudate putamen. Synapse 66: 989–1001.

Pokk, P. and Väli, M. (2002) The effects of the nitric oxide synthase inhibitors on the behaviour of small-platform-stressed mice in the plus-maze test. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 26: 241–247.

Porter, R. J., Lunn, B. S., Walker, L. L., Gray, J. M., Ballard, C. G. and O'Brien, J. T. (2000) Cognitive deficit induced by acute tryptophan depletion in patients with Alzheimer's disease. American Journal of Psychiatry, 157: 638–640.

Porter, R. J., Phipps, A. J., Gallagher, P., Scott, A., Stevenson, P. S. and O'Brien, J. T. (2005) Effects of acute tryptophan depletion on mood and cognitive functioning in older recovered depressed subjects. The American Journal of Geriatric Psychiatry, 13: 607–615.

Pourhamzeh, M., Moravej, F. G., Arabi, M., Shahriari, E., Mehrabi, S., Ward, R., Ahadi, R. and Joghataei, M. T. (2021) The Roles of Serotonin in Neuropsychiatric Disorders. Cellular and molecular neurobiology, 2021: 1–22.

Prusky, G. T., Harker, K. T., Douglas, R. M. and Whishaw, I. Q. (2002) Variation in visual acuity within pigmented, and between pigmented and albino rat strains. Behavioural brain research, 136: 339–348.

Radtke, F. A., Chapman, G., Hall, J. and Syed, Y. A. (2017) Modulating Neuroinflammation to Treat Neuropsychiatric Disorders. BioMed Research International, 2017: 1–21.

Rajkumar, R. and Mahesh, R. (2010) The auspicious role of the 5–HT3 receptor in depression: a probable neuronal target? Journal of Psychopharmacology, 24: 455–469.

Rambousek, L., Bubenikova-Valesova, V., Kacer, P., Syslova, K., Kenney, J., Holubova, K., Najmanova, V., Zach, P., Svoboda, J., Stuchlik, A., Chodounska, H., Kapras, V., Adamusova, E., Borovska, J., Vyklicky, L. and Vales, K. (2011) Cellular and behavioural effects of a new steroidal inhibitor of the N-methyl-d-aspartate receptor 3alpha5beta-pregnanolone glutamate. Neuropharmacology, 61: 61–68.

Rapport, M., Green, A. and Page, I. (1948a) Crystalline serotonin. Science, 108: 329–330. Rapport, M., Green, A. and Page, I. (1948b) Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. Journal of Biological Chemistry, 174: 735–741.

Rapport, M., Green, A. and Page, I. (1948c) Serum vasoconstrictor IV. Isolation and characterization. Journal of Biological Chemistry, 176: 1243–1251.

Rasgon, N., Serra, M., Biggio, G., Pisu, M., Fairbanks, L., Tanavoli, S. and Rapkin, A. (2001) Neuroactive steroid-serotonergic interaction: responses to an intravenous L-tryptophan challenge in women with premenstrual syndrome. European Journal of Endocrinology, 145: 25–33.

Richard, D. M., Dawes, M. A., Mathias, C. W., Acheson, A., Hill-Kapturczak, N. and Dougherty, D. M. (2009) L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. International Journal of Tryptophan Research, 2: 45–60.

Roager, H. M. and Licht, T. R. (2018) Microbial tryptophan catabolites in health and disease. Nature Communications, 9: 1–10.

Robinson, T. N., De Souza, R. J., Cross, A. J. and Green, A. R. (1989) The mechanism of tetrahydroaminoacridine-evoked release of endogenous 5-hydroxytryptamine and dopamine from rat brain tissue prisms. British Journal of Pharmacology, 98: 1127–1136.

Romeo, E., Strohle, A., Spalletta, G., di Michele, F., Hermann, B., Holsboer, F., Pasini, A. and Rupprecht, R. (1998) Effects of antidepressant treatment on neuroactive steroids in major depression. American Journal of Psychiatry, 155: 910–913.

Rose, W. C. (1968) The sequence of events leading to the establishment of the amino acid needs of man. American Journal of Public Health, 58: 2020–2027.

Rossi, F., Miggiano, R., Ferraris, D. M. and Rizzi, M. (2019) The Synthesis of Kynurenic Acid in Mammals: An Updated Kynurenine Aminotransferase Structural KATalogue. Frontiers in molecular biosciences, 6: 1–9.

Ruddick, J. P., Evans, A. K., Nutt, D. J., Lightman, S. L., Rook, G. A. and Lowry, C. A. (2006) Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. Expert Reviews in Molecular Medicine, 8: 1–27.

Rutten, K., Lieben, C., Smits, L. and Blokland, A. (2007) The PDE4 inhibitor rolipram reverses object memory impairment induced by acute tryptophan depletion in the rat. Psychopharmacology, 192: 275–282.

Sainio, E. L., Pulkki, K. and Young, S. N. (1996) L-tryptophan: Biochemical, nutritional and pharmacological agents. Amino Acids, 10: 21–47.

Sandi, C., Venero, C. and Guaza, C. (1995) Decreased spontaneous motor activity and startle response in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. European Journal of Pharmacology, 277: 89–97.

Sandyk, R. (1992) L-tryptophan in neuropsychiatric disorders: a review. The International journal of neuroscience, 67: 127–144.

Sarwar, G. and Botting, H. G. (1999) Liquid concentrations are lower in bioavailable tryptophan than powdered infant formulas, and tryptophan supplementation of formulas increases brain tryptophan and serotonin in rats. Journal of Nutrition, 129: 1692–1697.

Selye, H. (1941) Anesthetic Effect of Steroid Hormones. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 46: 116–121.

Semont, A., Fache, M., Ouafik, L., Hery, M., Faudon, M., and Hery, F. (1999) Effect of serotonin inhibition on glucocorticoid and mineralocorticoid expression in various brain structures. Neuroendocrinology, 69: 121–128.

Seyedabadi, M., Fakhfouri, G., Ramezani, V., Mehr, S. E. and Rahimian, R. (2014) The role of serotonin in memory: interactions with neurotransmitters and downstream signaling. Experimental brain research, 232: 723–738.

Shreiner, A. B., Kao, J. Y. and Young, V. B. (2015) The gut microbiome in health and in disease. Current Opinion in Gastroenterology, 31: 69–75.

Schmitt, A., Parlapani, E., Bauer, M., Heinsen, H. and Falkai, P. (2008) Is brain banking of psychiatric cases valuable for neurobiological research? Clinics, 63: 255–266.

Schneiderman, N., Ironson, G. and Siegel, S. D. (2005) Stress and health: psychological, behavioral, and biological determinants. Annual review of clinical psychology, 1: 607–628.

Scholtissen, B., Verhey, F. R., Adam, J. J., Prickaerts, J. and Leentjens, A. F. (2006) Effects of acute tryptophan depletion on cognition, memory and motor performance in Parkinson's disease. Journal of the Neurological Sciences, 248: 259–265.

Schopman, S., Bosman, R. C., Muntingh, A., van Balkom, A. and Batelaan, N. M. (2021) Effects of tryptophan depletion on anxiety, a systematic review. Translational psychiatry, 11: 1–13.

Siever, L. J., Kahn, R. S., Lawlor, B. A., Trestman, R. L., Lawrence, T. L. and Coccaro, E. F. (1991) Critical issues in defining the role of serotonin in psychiatric disorders. Pharmacological Reviews, 43: 509–525.

Sipes, T. A. and Geyer, M. A. (1994) Multiple serotonin receptor subtypes modulate prepulse inhibition of the startle response in rats. Neuropharmacology, 33: 441–448.

Smith, Q. R. (2000) Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. Journal of Nutrition, 130: 1016–1122.

Sobczak, S., Riedel, W. J., Booij, I., Aan Het Rot, M., Deutz, N. E. and Honig, A. (2002) Cognition following acute tryptophan depletion: difference between firstdegree relatives of bipolar disorder patients and matched healthy control volunteers. Psychological Medicine, 32: 503–515. Stahl, S. M. (2013)

Psychosis and schizophrenia. In: Essential psychopharmacology, Stephen M. Stahl (ed.), Cambridge University, New York, USA, pp. 79–128.

Steckler, T. and Sahgal, A. (1995) The role of serotonergic-cholinergic interactions in the mediation of cognitive behaviour. Behavioural brain research, 67: 165–199.

Steinbusch, H. W. (1981) Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-Cell bodies and terminals. Neuroscience, 6: 557–618.

Stone, T. W. (2001) Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. Progress in neurobiology, 64: 185–218.

Stone, T. W. and Darlington, L. G. (2013) The kynurenine pathway as a therapeutic target in cognitive and neurodegenerative disorders. British journal of pharmacology, 169: 1211–1227.

Strohle, A., Romeo, E., di Michele, F., Pasini, A., Hermann, B., Gajewsky, G., Holsboer, F. and Rupprecht, R. (2003) Induced panic attacks shift gamma-aminobutyric acid type A receptor modulatory neuroactive steroid composition in patients with panic disorder: preliminary results. Archives of General Psychiatry, 60: 161–168.

Suarez-Lopez, J., Suarez-Torres, J., Sheila, G., Lopez-Paredes, D. and Noble, M. (2019) Acetylcholinesterase inhibition and symptoms of depression and anxiety among adolescents in agricultural communities in Ecuador: transient effects on mood. Environmental Epidemiology, 3: 386.

Tan, D. X., Manchester, L. C., Esteban-Zubero, E., Zhou, Z. and Reiter, R. J. (2015) Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. Molecules, 20: 18886–18906.

Tavares, R. G., Tasca, C. I., Santos, C. E., Alves, L. B., Porciuncula, L. O., Emanuelli, T. and Souza, D. O. (2002) Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. Neurochemistry International, 40: 621–627.

Taylor, M. W. and Feng, G. S. (1991) Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. The FASEB Journal, 5: 2516–2522.

Tork, I. (1985) Raphe nuclei and serotonin containing systems. In: The Rat Nervous System. Vol. 2. Hindbrain and Spinal Cord, G. Paxinos (ed.), Academic Press, New York, USA, pp. 43–78.

Tork, I. (1990) Anatomy of the serotonergic system. The Neuropharmacology of Serotonin. Annals of the New York Academy of Sciences, 600: 9–35.

Trajkovska, V., Kirkegaard, L., Krey, G., Klein, A., Thomsen, M., Chourbaji, S., Brandwein, C., Ridder, S., Halldin, C., Gass, P., Knudsen, G. and Aznar, S. (2009) Activation of glucocorticoid receptors increases 5-HT2A receptor levels. Experimental neurology, 218: 83–91.

Tran-Nguyen, L. T., Baker, D. A., Grote, K. A., Solano, J. and Neisewander, J. L. (1999) Serotonin depletion attenuates cocaine-seeking behavior in rats. Psychopharmacology, 146: 60–66.

Turnbull, A. V. and Rivier, C. L. (1999) Regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. Physiological Reviews, 79: 1–71. Tyce, G. (1990) Origin and metabolism of serotonin. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 16: 1–7.

van der Does, A. J. (2001) The effects of tryptophan depletion on mood and psychiatric symptoms. Journal of Affective Disorders, 64: 107–119.

van der Kooij, M. A. (2020) The impact of chronic stress on energy metabolism. Molecular and cellular neurosciences, 107: 1–44.

van der Plasse, G., Meerkerk, D. T., Lieben, C. K., Blokland, A. and Feenstra, M. G. (2007) Lack of evidence for reduced prefrontal cortical serotonin and dopamine efflux after acute tryptophan depletion. Psychopharmacology, 195: 377–385.

van Donkelaar, E. L., Blokland, A., Lieben, C. K., Kenis, G., Ferrington, L., Kelly, P. A., Steinbusch, H. W. and Prickaerts, J. (2010) Acute tryptophan depletion in C57BL/6 mice does not induce central serotonin reduction or affective behavioural changes. Neurochemistry International, 56: 21–34.

van Donkelaar, E. L., Ferrington, L., Blokland, A., Steinbusch, H. W., Prickaerts, J. and Kelly, P. A. (2009) Acute tryptophan depletion in rats alters the relationship between cerebral blood flow and glucose metabolism independent of central serotonin. Neuroscience, 163: 683–694.

van Donkelaar, E. L., Rutten, K., Blokland, A., Akkerman, S., Steinbusch, H. W. and Prickaerts, J. (2008) Phosphodiesterase 2 and 5 inhibition attenuates the object memory deficit induced by acute tryptophan depletion. European Journal of Pharmacology, 600: 98–104.

van Donkelaar, E., Blokland, A., Ferrington, L., Kelly, P. A. T., Steinbusch, H. W. M. and Prickaerts, J. (2011) Mechanism of acute tryptophan depletion: is it only serotonin? Molecular Psychiatry, 16: 695–713.

van Dyken, P. and Lacoste, B. (2018) Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood-Brain Barrier. Frontiers in Neuroscience, 12: 1–19.

van Goethem, N. P., Rutten, K., van der Staay, F. J., Jans, L. A., Akkerman, S., Steinbusch, H. W., Blokland, A., van't Klooster, J. and Prickaerts, J. (2012) Object recognition testing: rodent species, strains, housing conditions, and estrous cycle. Behavioural brain research, 232: 323–334.

Van Oekelen, D., Luyten, W. H. M. L. and Leysen, J. E. (2003) 5-HT2A and 5-HT2C receptors and their atypical regulation properties. Life Sciences, 72: 2429–2449.

Virk, M. S., Sagi, Y., Medrihan, L., Leung, J., Kaplitt, M. G. and Greengard, P. (2016) Opposing roles for serotonin in cholinergic neurons of the ventral and dorsal *striatum*. Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 113: 734–739.

Wagstaff, A. J. and McTavish, D. (1994) Tacrine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease. Drugs & aging, 4: 510–540.

Watkins, P. B., Zimmerman, H. J., Knapp, M. J., Gracon, S. I. and Lewis, K. W. (1994) Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer’s disease. JAMA: The Journal of the American Medical Association, 271: 992–998.

Weaver, C. E., Land, M. B., Purdy, R. H., Richards, K. G., Gibbs, T. T. and Farb, D. H. (2000) Geometry andcharge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca(2+) accumulation and cell death. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 293: 747–754.

Wedzony, K., Maćkowiak, M., Czyrak, A., Fijał, K. and Michalska, B. (1997) Single doses of MK-801, a non-competitive antagonist of NMDA receptors, increase the number of 5-HT1A serotonin receptors in the rat brain. Brain research, 756: 84–91.

Weill-Engerer, S., David, J. P., Sazdovitch, V., Liere, P., Eychenne, B., Pianos, A., Schumacher, M., Delacourte, A., Baulieu, E. E. and Akwa, Y. (2002) Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 87: 5138–5143.

Weng, R., Shen, S., Tian, Y., Burton, C., Xu, X., Liu, Y., Chang, C., Bai, Y. and Liu, H. (2015) Metabolomics Approach Reveals Integrated Metabolic Network Associated with Serotonin Deficiency. Scientific Reports, 5: 1–13.

Wetzel, C. H. R., Hermann, B., Behl, C., Pestel, E., Rammes, G., Zieglgänsberger, W., Holsboer, F. and Rupprecht, R. (1998) Functional Antagonism of Gonadal Steroids at the 5-Hydroxytryptamine Type 3 Receptor. Molecular Endocrinology, 12: 1441–1451.

Whitaker-Azmitia, P., Borella, A. and Raio, N. (1995) Serotonin Depletion in the Adult Rat Causes Loss of the Dendritic Marker MAP-2. Neuropsychopharmacology, 12: 269–272.

Wiesinger, H. (2001) Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. Progress in Neurobiology, 64: 365–391.

Willner, P. (1986) Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, 10: 677–690.

Wittmann, I. (2007) Insulin Resistance and Metabolic Syndrome. Electronic Journal of IFCC, 18: 31–38. Wurtman, R. J., Hefti, F. and Melamed, E. (1981) Precursor control of neurotransmitter synthesis. Pharmacological Reviews, 32: 315–335.

Wurtman, R. J., Wurtman, J. J., Regan, M. M., McDermott, J. M., Tsay, R. H. and Breu, J. J. (2003) Effects of normal meals rich in carbohydrates or proteins on plasma tryptophan and tyrosine ratios. The American Journal of Clinical Nutrition, 77: 128–132.

Xie, Z. and Commissaris, R. L. (1992) Anxiolytic-like effects of the noncompetitive NMDA antagonist MK 801. Pharmacology, biochemistry and behavior, 43: 471–477.

Yan, Q. S., Reith, M. E., Jobe, P. C. and Dailey, J. W. (1997) Dizocilpine (MK-801) increases not only dopamine but also serotonin and norepinephrine transmissions in the nucleus accumbens as measured by microdialysis in freely moving rats. Brain research, 765: 149–158.

Yang, B., Ren, Q., Ma, M., Chen, Q. X. and Hashimoto, K. (2016) Antidepressant Effects of (+)-MK-801 and (-)-MK-801 in the Social Defeat Stress Model. The International Journal of Neuropsychopharmacology, 19: 1–5.

Yates, F., Marsh, D. and Maran, J. (1980) The adrenal cortex. In: Medical Physiology, Vernon Mountcastle (ed.), C. V. Mosby, St. Louis, USA, pp. 1558–1601.

Young S. N. (2013) Acute tryptophan depletion in humans: a review of theoretical, practical and ethical aspects. Journal of psychiatry & neuroscience, 38: 294–305.

Young, L. S. and Stoll, S. (2003) Proteins and amino acids. In: Contemporary Nutrition Support Practice, Laura E. Matarese and Michele M. Gottschlich (ed.), Saunders, New York, USA, pp. 94–104.

Young, S. N. (1996) Behavioral effects of dietary neurotransmitter precursors: Basic and clinical aspects. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 20: 313–323.

Zimmermann, R. C., McDougle, C. J., Schumacher, M., Olcese, J., Mason, J. W., Heninger, G. R., and Price, L. H. (1993) Effects of acute tryptophan depletion on nocturnal melatonin secretion in humans. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 76: 1160–1164.

Żmudzka, E., Sałaciak, K., Sapa, J. and Pytka, K. (2018) Serotonin receptors in depression and anxiety: Insights from animal studies. Life sciences, 210: 106–124.

Zorumski, C. F., Paul, S. M., Izumi, Y., Covey, D. F. and Mennerick, S. (2013) Neurosteroids, stress and depression: potential therapeutic opportunities. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 37: 109–122.