

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Alex Kratina

## **Vliv ketaminu na světlem indukované změny v cirkadiánním systému**

### **Effect of ketamine on light-induced changes in the circadian system**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Zdeňka Bendová, Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení:

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

V Praze, 7. 8. 2023

Bc. Alex Kratina

**Poděkování:**

Rád bych poděkoval především vedoucí své diplomové práce doc. RNDr. Zdeňce Bendové, Ph.D. za její velkou vstřícnost, ochotu a celkový přístup. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Veronice Spišské za její trpělivost, humor a velkou pomoc při zaučování v laboratoři i provádění experimentů. Poděkování za pomoc při provádění experimentů patří i Mgr. Anetě Kubištové a Mgr. Evě Filipovské a také Mgr. Elišce Přítulové za její obrovskou pomoc při optimalizaci práce se softwarem. Děkuji i svým přátelům za trpělivost a podporu a své rodině za poskytnuté zázemí. Poslední dík patří Alexanderovi. Svět býval lepší místo, když jsi v něm ještě byl.

## Abstrakt

Cirkadiální systém je řízen suprachiasmatickými jádry hypothalamu (SCN) a zajišťuje optimální načasování fyziologický procesů. Synchronizace tohoto systému s vnějšími světelnými podmínkami probíhá na základě aktivace NMDA receptorů při vystavení světlu v subjektivní noci. Ketamin představuje nekompetitivního antagonistu NMDA receptorů využívaného jako bezpečné anestetikum, jehož subanestetické dávky působí jako antidepresivum s rychlým nástupem účinku a zvyšují proliferaci v některých částech mozku. Objevují se hypotézy hovořící o možném vlivu subanestetických dávek ketaminu na cirkadiální systém, tento vliv však dosud nebyl testován. Tato práce má za cíl zkoumat vliv jednorázové subanestetické dávky ketaminu na cirkadiální systém potkana, zejména na světlem indukované změny v lokomoční aktivitě a světlem indukované markery v SCN a gyru dentatu, který představuje jednu ze silně proliferčních oblastí mozku. Naše výsledky ukazují, že ketamin snižuje expresi proteinu c-FOS v SCN vyvolanou světelným pulsem na počátku subjektivní noci, avšak za stejných podmínek zvyšuje tuto expresi v gyru dentatu. Snížení exprese c-FOS v SCN koreluje s behaviorálním výstupem cirkadiálního systému, a tedy potlačuje velikost fázového posunu v lokomoční aktivitě potkana.

**Klíčová slova:** cirkadiální systém, ketamin, suprachiasmatické jádro hypothalamu, SCN, světelná synchronizace, NMDA receptory, fázové posuny, c-FOS, gyrus dentatus, lokomoce

## Abstract

The circadian system is controlled by the suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus (SCN) and ensures optimal timing of physiological processes. Synchronization of this system with external light conditions is based on the activation of NMDA receptors during light exposure in the subjective night. Ketamine is a non-competitive antagonist of NMDA receptors used as a safe anesthetic, whose subanesthetic doses act as an antidepressant with a rapid onset of action, and increase proliferation in some parts of the brain. There are hypotheses about the possible effect of subanesthetic doses of ketamine on the circadian system, although this effect has not yet been tested. This work aims to investigate the effect of a single subanesthetic dose of ketamine on the circadian system of the rat, especially on light-induced changes in locomotor activity and light-induced markers in the SCN and dentate gyrus, which represents one of the strongly proliferative areas of the brain. Our results show that ketamine decreases light pulse-induced c-FOS protein expression in the SCN at the onset of the subjective night, but increases this expression in the dentate gyrus under the same conditions. Reduction of c-FOS expression in the SCN correlates with the behavioral output of the circadian system and thus suppresses the magnitude of phase shifts in the locomotor activity of the rat.

**Key words:** circadian system, ketamine, suprachiasmatic nuclei of the hypothalamus, SCN, light entrainment, NMDA receptors, phase shifts, c-FOS, dentate gyrus, locomotion

# Obsah:

## Seznam použitých zkratek

1. Úvod .....	7
2. Literární přehled.....	8
2.1 Cirkadiánní systém.....	8
2.1.1 Molekulární mechanismus buněčných hodin .....	8
2.1.2 Suprachiasmatické jádro.....	10
2.1.3 Světelná synchronizace .....	11
2.2 NMDA receptor a jeho podjednotky.....	13
2.3 Ketamin.....	14
2.3.1 Formy a metabolity ketaminu .....	15
2.3.2 Ketamin jako analgetikum a anestetikum.....	16
2.3.3 Subanestetické dávky ketaminu .....	18
2.3.4 Ketamin jako chronofarmakum .....	20
3. Cíle diplomové práce .....	22
4. Materiály a metody .....	23
4.1 Laboratorní zvířata .....	23
4.2 Aplikace ketaminu a vystavení světelnému pulzu .....	23
4.3 Příprava a odběr tkání.....	24
4.4 Imunohistochemie .....	24
4.4.1 Seznam použitých chemikálií .....	25
4.4.2 Příprava řezů.....	26
4.4.3 Citrátový antigen-retrieval.....	26
4.4.4 Pracovní postup IHC .....	26
4.4.5 Obrazová analýza mozkových řezů u metody IHC.....	27
4.5 Záznam lokomoční aktivity .....	31
4.6 Statistická analýza .....	33

5.	Výsledky .....	34
5.1	Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu c-FOS.....	34
5.1.1	Indukce c-FOS v SCN.....	34
5.1.2	Indukce c-FOS v DG.....	36
5.2	Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu pERK .....	37
5.2.1	Indukce pERK v SCN .....	37
5.2.2	Indukce pERK v DG .....	39
5.3	Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu pCREB.....	40
5.3.1	Indukce pCREB v SCN.....	40
5.3.2	Indukce pCREB v DG.....	42
5.4	Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu BDNF.....	44
5.4.1	Indukce BDNF v SCN.....	44
5.4.2	Indukce BDNF v DG.....	46
5.5	Vliv subanestetické dávky ketaminu na lokomoční aktivitu potkanů v kombinaci se světelným pulzem (1. běh experimentu).....	47
5.6	Vliv subanestetické dávky ketaminu na lokomoční aktivitu potkanů v režimu DD (2. běh experimentu).....	51
6.	Diskuze.....	56
6.1	Aplikace subanestetické dávky ketaminu.....	56
6.2	Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu světlo-reaktivních markerů v SCN a jejich behaviorální výstup.....	57
6.3	Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu světlo-reaktivních markerů v DG..	60
6.4	Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu BDNF.....	61
7.	Závěr .....	63
8.	Seznam použité literatury.....	64

## Seznam použitých zkratek

AMPA; AMPAR	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina; její receptor
ANOVA	statistická metoda analýzy rozptylu
AVP	arginin vasopresin
BDNF	mozkový neurotrofický faktor (z angl. <i>brain-derived neurotrophic factor</i> )
BMAL1	protein genu <i>Brain and Muscle Arnt-Like 1</i>
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. <i>bovine serum albumine</i> )
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CCG	hodinami řízené geny (z angl. <i>clock-controlled genes</i> )
CLOCK	zkratka pro protein genu <i>Circadian Locomotor Output Cycles Kaput</i>
CKI	kaseinová kináza
CNS	centrální nervová soustava
CRE	cAMP responsive element
CREB; pCREB	cAMP response element binding protein; jeho fosforylovaná forma
CRY	protein genu <i>Cryptochrome</i>
CT	cirkadiánní čas (tj. subjektivní čas v rámci endogenní periody živočicha)
DD	režim stálé tmy (z angl. <i>dark – dark</i> )
DG	gyrus dentatus
DHNK	dehydronorketamin
DM	dorsomediální
ERK; pERK	extracelulárním signálem regulovaná kináza; její fosforylovaná forma
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GRP	gastrin uvolňující peptid



GSK3 $\beta$	kináza glukogen syntázy 3 beta
HEB	hematoencefalická bariéra
HNK	hydroxynorketamin
IGL	intergenikulární lístek thalamu
IHC	imunohistochemie
ipRGCs	vnitřně fotosenzitivní gangliové buňky retiny
LD	režim střídání světla a tmy (z angl. <i>light – dark</i> )
LTP	dlouhodobá potenciace
MAPK	mitogenem-aktivovaná proteinová kináza
mPFC	mediální prefrontální kortex
mTOR	savčí cílový protein léku rapamycinu
NGS	standardní sérum (z angl. <i>normal goat serum</i> )
NMDA; NMDAR	N-methyl-D-asparagová kyselina; její receptor
norKET	norketamin
NR1D1	jaderný receptor podrodiny 1 skupiny D člen 1; synonymum je REV-ERB
NR1F1	jaderný receptor podrodiny 1 skupiny F člen 1; synonymum je ROR
PACAP	polypeptid aktivující adenylát cyklázu hypofýzy
PBS	fyzilogický roztok (z angl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PER	protein genu <i>Period</i>
PFA	paraformaldehyd
PKA	proteinikináza A
PRC	fázově responzní křivka (z angl. <i>phase-response curve</i> )
PVN	paraventriculární jádro hypothalamu
RHT	retinohypotalamický trakt
(R)-ket, (S)-ket	dva optické isomery ketaminu

REV-ERB	zkratka z angl. <i>reverse strand of ERBA</i> ; protein genu <i>Nr1d1</i>
ROI	označená oblast zájmu (z angl. <i>region of interest</i> )
ROR	sirotčí receptor příbuzný receptorům kyseliny retinové, zkratka z angl. <i>RAR-related orphan receptor</i> ; protein genu <i>Nr1f1</i>
RORE	retinoic acid-related orphan receptor response element
SCN	suprachiasmatické jádro hypothalamu
SST	somatostatin produkující (interneurony)
TrkB	tropomyosinová receptorová kináza B
TTFL	transkripčně-translační zpětnovazebná smyčka
VIP	vasoaktivní intestinální polypeptid
VL	ventrolaterální

# 1. Úvod

Cirkadiánní systém zajišťuje vhodné načasování fyziologických procesů do klidové či aktivní fáze živočicha. Tento systém odměřuje vnitřní, přibližně 24hodinovou periodu, a to již na molekulární úrovni mechanismem transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček hodinových genů.

Aby byla tato perioda skutečně dlouhá 24 hodin, je nutná synchronizace jednotlivých buněk těla. To zajišťuje hlavní pacemaker tvořený suprachiasmatickými jádry hypothalamu (SCN). Tento párový orgán je retinohypothalamickým traktem propojen se sítnicí oka, který přenáší informaci o světle a aktivací NMDA receptorů přizpůsobuje vnitřní periodu SCN tak, aby odpovídala vnějšímu solárnímu cyklu. Pokud je tento systém vystaven světlu zvečera či zrána, dochází k fázovým posunům, a tedy zpoždění nebo předběhnutí vnitřních hodin.

Desynchronizace cirkadiánního systému, ať už vzniká vnějšími vlivy (např. světelným znečištěním snižujícím kontrast mezi dnem a nocí) nebo vnitřními vlivy (např. genetickou mutací v molekulárním mechanismu hodin), je spojena s řadou patologických stavů; od metabolických poruch až po některá nádorová onemocnění. Poruchy cirkadiánních oscilací jsou také typické pro depresivní stavy, a to u unipolární i bipolární deprese.

Ketamin je nekompetitivní antagonist NMDA receptorů. Působí jako disociativní anestetikum, které je pro svou bezpečnost s oblibou užíváno u dětí a ve veterinární medicíně. Jeho subanestetické dávky nicméně představují dlouho účinkující antidepresivum s nezvykle rychlým nástupem působení, funkční dokonce i u pacientů rezistentních vůči běžné léčbě. Některé publikované hypotézy naznačují, že rychlé působení tohoto farmaka by mohlo být vysvětleno právě jeho vlivem na cirkadiánní systém. Starší studie prováděné *in vitro* ukazují, že ketamin má vliv na hodinové geny a je schopen způsobit fázové posuny v lokomoční aktivitě zvířat. Vliv subanestetických dávek tohoto farmaka na cirkadiánní systém však dosud nebyl testován.

Tato práce má za cíl blíže prozkoumat účinky subanestetických dávek ketaminu na cirkadiánní systém potkana a popsat vliv těchto dávek na světlem indukované buněčné procesy v SCN a gyru dentatu.

## 2. Literární přehled

### 2.1 Cirkadiánní systém

Všechny žijící organismy na planetě Zemi čelí měnícímu se prostředí. Některé z těchto změn je obtížné předvídat, některé však v evoluci nám známého života představovaly (minimálně až donedávna) neochvějnou jistotu. Jednou z takových jistot bylo střídání světla a tmy během dne a noci. U organismů se v reakci na tuto rytmickou změnu vyvinul systém schopný odměřovat přibližně 24hodinovou periodu, který se podle latinského *circa diem* („přibližně denní“) pojmenoval cirkadiánní.

Cirkadiánní systém umožňuje vhodné načasování fyziologických a molekulárních procesů a jejich přizpůsobení temnostní či světelné fázi dne. Zajišťuje navýšení aktivity a efektivity činnosti orgánových soustav do doby aktivní fáze, a naopak jejich utlumení a regeneraci ve fázi klidu. Představuje vnitřní hodiny, vlivem kterých můžeme pozorovat rytmicitu například v metabolických funkcích, funkcích kardiovaskulárního systému, produkci hormonů, imunitě či dokonce kognitivních funkcích (Richards & Gumz, 2013; Finger & Kramer, 2021; Xu *et al.*, 2021).

Vnitřní měření času má svůj základ již na molekulární úrovni. Ve většině jaderných buněk existují transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky hodinových genů (zkratka TTFL z anglického „*transcriptional-translational feedback loop*“). Tento systém generuje přibližně 24hodinovou periodu.

#### 2.1.1 Molekulární mechanismus buněčných hodin

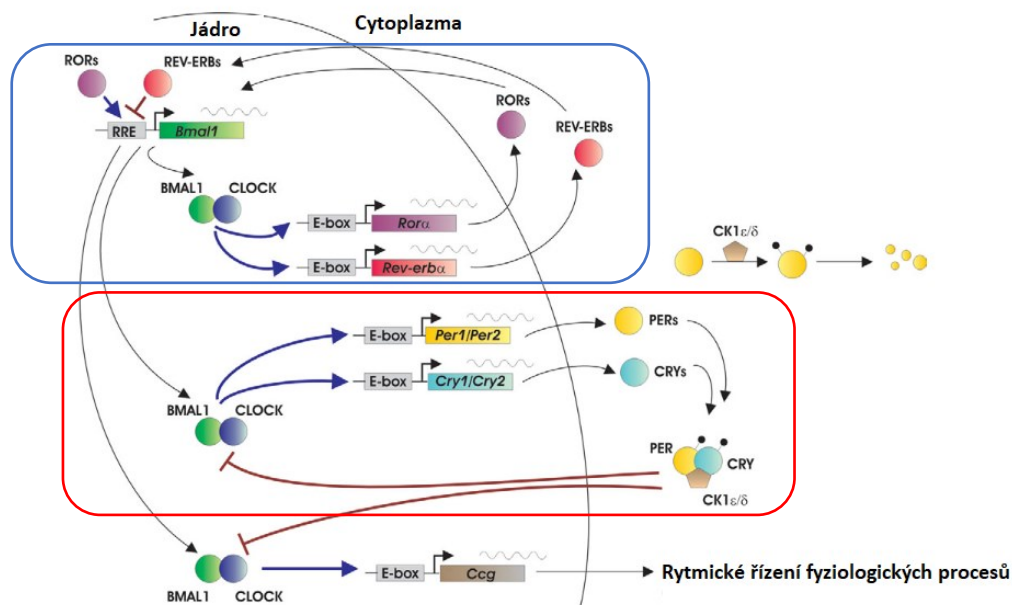
Transkripčně-translační vazebná smyčka je tvořena tzv. hodinovými geny (obr. 1). Základ představují geny *Clock* (zkratka z anglického *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*) a *Bmal1* (zkratka z anglického *Brain and Muscle ARNT-like 1*), jejichž proteinové produkty spolu vytváří heterodimer CLOCK:BMAL1. Tento heterodimer translokuje zpět do buněčného jádra, kde nasedá na místa zvaná E-box v promotorových sekvencích řady genů, přičemž působí jako aktivátor jejich transkripce (Gekakis *et al.*, 1998; Menet *et al.*, 2012). Mezi takto aktivované geny patří také hodinové geny *Per1,2,3* (zkratka z anglického *Period*) a *Cry1,2* (zkratka z anglického *Cryptochrome*) (van der Horst *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2001). Produkty těchto genů, proteiny PER a CRY, se strádají v cytoplazmě, kde je jejich stabilita silně ovlivňována fosforylací. Proteiny PER mohou být typicky fosforylovány kaseinovou kinázou (CKI, konkrétně typy CKIε či CKIδ), což vede buď k jejich degradaci ubiquitinací, či k jejich

transportu do jádra (Akashi *et al.*, 2002; Etchegaray *et al.*, 2009). Do jádra spolu s PER proteiny vstupují i proteiny CRY a zmíněná CKI $\delta$ , a společně vytvářejí jaderný PER komplex (Aryal *et al.*, 2017). Tento komplex, respektive heterodimer proteinů PER a CRY, následně blokuje nasedání heterodimeru CLOCK:BMAL1 na DNA, a efektivně tak funguje jako represor vlastní transkripce (Kume *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2014). Snížení transkripční aktivity vede k postupnému snížení hladiny proteinů PER a CRY, což znovu umožní interakci komplexu CLOCK:BMAL1 s E-box sekvencemi, a tedy znovuobnovení transkripce. Celý tento proces trvá přibližně 24 hodin a je označován jako primární smyčka.

Kromě primární smyčky existuje také sekundární smyčka, která sice není nezbytná pro samotné vytváření a udržování cirkadiálních rytmů, ale má vliv na délku endogenní periody a fázové posuny (Preitner *et al.*, 2002). V této smyčce se heterodimer CLOCK:BMAL1 váže na E-box genů *Nr1d1* (z anglického *nuclear receptor subfamily 1 group D member 1*) a *Nr1f1* (z anglického *nuclear receptor subfamily 1, group F, member 1*), čímž, stejně jako tomu bylo u genů *Per* a *Cry*, dochází k aktivaci jejich transkripce. Proteinovým produktem genu *Nr1d1* je jaderný receptor REV-ERB $\alpha$ , produktem genu *Nr1f1* je jaderný receptor ROR $\alpha$  (z anglické zkratky *RAR-related orphan receptor*, zkratka RAR zde označuje *retinoid acid receptor*, receptor kyseliny retinové). Tyto dva proteiny se vážou na sekvenci RORE v promotoru genu *Bmall*, přičemž působí antagonisticky – zatímco vazba REV-ERB $\alpha$  na RORE inhibuje transkripci *Bmall*, vazba ROR ji aktivuje (Preitner *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004). Kompetice proteinů o vazbu na RORE sekvenci vytváří rytmicitu v indukci proteinu BMAL1.

Kromě samotných hodinových genů existují také geny tzv. hodinami ovládané (z angl. *clock-controlled genes*). Ty sice nejsou součástí zpětnovazebných smyček a nevytvářejí molekulární mechanismus vnitřních hodin, ale vykazují rytmicitu ve své expresi vlivem přítomnosti promotorových sekvencí (jako byl např. již zmíněný E-box), na které se mohou proteiny hodinových genů vázat a působit tak jako transkripční aktivátory či represory. Odhaduje se, že až polovina genomu by mohla vykazovat rytmickou expresi (Zhang *et al.*, 2014b). Zastoupení těchto genů je v různých tkáních různé, což ostatně zajišťuje specifickou časovou organizaci jednotlivých fyziologických procesů.

Časová organizace se netýká pouze úrovně genomu, ale probíhá i na epigenetické úrovni – například acetylace histonů je také časově řízená, a dále ovlivňuje expresi hodinových genů (Etchegaray *et al.*, 2003). Také se cirkadiální modifikace projevují na translační a posttranslační úrovni, zvláště například v procesech metabolismu (Mauvoisin, 2019).



**Obrázek 1. Molekulární mechanismus buněčných hodin.** Heterodimer proteinů BMAL1 a CLOCK nasedá na promotorovou sekvenci E-box, čímž indukuje transkripci genů s touto sekvencí. Mezi tyto geny patří *Per* a *Cry*, jejichž proteinové produkty v cytoplasmě vytvářejí komplex s kaseinovou kinázou. Tento komplex translokuje zpět do jádra, kde inhibuje další nasedání CLOCK:BMAL1 komplexu na E-box, čímž efektivně zabraňuje transkripci vlastní elementů. Tomuto se říká primární smyčka, na obrázku označená červeným obrysem. Současně také CLOCK:BMAL1 indukuje expresi genů *Rora* (*Nr1f1*) a *Rev-erba* (*Nr1d1*), přičemž jejich proteinové produkty působí v tomto pořadí jako aktivační či inhibiční regulátory transkripce genu *Bmal1* vlivem své vazby na RRE (někdy také RORE) vazebné místo. Tento proces tvoří sekundární smyčku, na obrázku označenou modrým obrysem. Vazebné místo E-box se nachází i v sekvencích tzv. hodinami ovládaných genů (*Ccg*) které vlivem své rytmické indukce zajišťují cirkadiánní řízení fyziologických procesů v těle. Převzato a upraveno z Ko & Takahashi, 2006.

### 2.1.2 Suprachiasmatické jádro

Řízení cirkadiánních procesů a synchronizaci rytmů v organismu zajišťuje hlavní pacemaker, část mozku jménem suprachiasmatická jádra hypothalamu (SCN) (Stephan & Zucker, 1972; Ralph *et al.*, 1990). Tato párová struktura, pojmenovaná podle svého uložení nad optickým chiasmatem, vykazuje spontánní rytmus v elektrické aktivitě (Inouye & Kawamura, 1979). Svými výstupy diriguje celý cirkadiánní systém těla a synchronizuje ho s vnějšími časovými podněty, tzv. zeitgebery. Nejsilnějším zeitgeberem je světlo.

Morfologicky lze rozlišit dvě části SCN – část ventrolaterální (VLSCN, také nazývanou *core*) a část dorsomediální (DMSCN, také nazývanou *shell*). Tyto části se liší také svými aferentními a eferentními dráhami. VLSCN přijímá informace z retiny a intergenikulárního listku thalamu (IGL) a serotoninové signály z rapheálních jader. Projikuje pak především do DMSCN (Leak *et al.*, 1999). DMSCN naopak do ventrolaterální části projikuje velmi málo, většina výstupů této části SCN míří do hypothalamických jader, která následně regulují jednotlivé nervové i humorální výstupy hodin (Leak *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2002).

Ačkoliv hlavní neurotransmitter celého SCN je kyselina  $\gamma$ -aminomáselná (GABA) (Moore & Speh, 1993), obě jeho části mají i své specifické mediátory. Zatímco ve VLSCN převládají vasoaktivní intestinální polypeptid (VIP) (Card *et al.*, 1981) a gastrin-uvolňující peptid (GRP) (Mikkelsen *et al.*, 1991), v DSCN nalézáme spíše arginin vasopresin (AVP) (Castel *et al.*, 1990). VIP není důležitý peptid jen pro ventrolaterální část, ale pro celé SCN, neboť zajišťuje jeho synchronizaci a jednotný cirkadiánní výstup – nepřítomnost VIP nebo jeho funkčního receptoru, ale i přílišný nadbytek VIP způsobí narušení synchronní rytmicity cirkadiánního systému (Harmar *et al.*, 2002; Aton *et al.*, 2005; An *et al.*, 2013). Podobnou roli v synchronizaci SCN má i zmíněná GABA (Liu & Reppert, 2000).

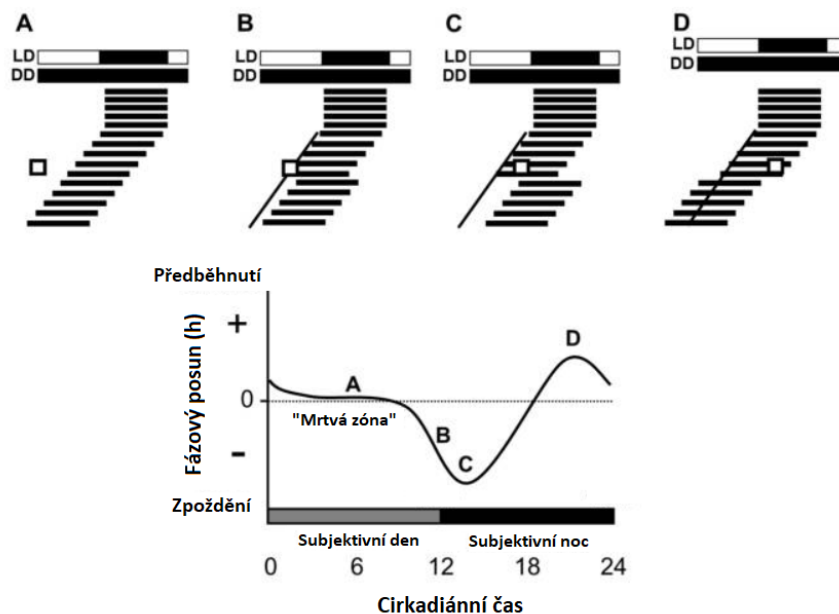
Nejprominentnějším výstupem SCN je regulace rytmu produkce melatoninu v epifýze. VLSCN projikuje do paraventriculárního jádra hypothalamu (PVN), odkud je přes přepojení v míše regulována aktivita dvou zásadních enzymů epifýzy nutných pro syntézu melatoninu (Klein *et al.*, 1983). Výstupy SCN dále také ovlivňují autonomní nervový systém či například zajišťují rytmický výlev kortikosteronu z kůry nadledvin (Moore & Eichler, 1972).

### 2.1.3 Světelná synchronizace

Informace o světle jakožto zeitgeberu je zaznamenávána speciálním typem fotosenzitivních gangliových buněk retiny, tzv. ipRGCs (zkratka z anglického *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells*) s fotopigmentem melanopsinem (Berson *et al.*, 2002). Axony těchto buněk tvoří retinohypothalamický trakt (RHT), který informaci přivádí do VLSCN (Moore *et al.*, 1995), kde probíhá světelná synchronizace. Protože ipRGCs nejsou součástí zrakové dráhy sloužící k vytváření obrazu, zůstává schopnost světelné synchronizace zachována i u některých nevidomých lidí (Czeisler *et al.*, 1995; Berson *et al.*, 2002). Bez světelných informací z vnějšího prostředí však dochází k tzv. volnému běhu cirkadiánních rytmů, kdy se organismus řídí pouze svou endogenní periodou. Pro určení vnitřního času

živočicha s volně běžící endogenní periodou se používá označení CT (cirkadiánní čas), přičemž CT0 značí začátek subjektivního dne a CT12 začátek subjektivní noci.

Vystavení světlu mimo den nebo subjektivní den způsobuje u živočichů fázové posuny jejich cirkadiánních rytmů, tedy posunutí hodin v SCN na základě změn vyvolaných v molekulárním mechanismu. Světlo na počátku noci způsobuje fázové zpoždění, světlo na konci noci způsobuje fázové předběhnutí. Velikost a směr fázových posunů v závislosti na časech vystavení světlu je možné vynést na tzv. fázově responzní křivku (PRC z anglického *phase-response curve*), jak je ukázáno na obrázku 2.



**Obrázek 2. Fázově responzní křivka.** Horní část obrázku zobrazuje čtyři aktigrafy (záznamy lokomoční aktivity) nočního živočicha. V LD podmínkách neboli při střídání světla a tmy živočich soustředí svou aktivitu do temnostní fáze dne – v DD podmínkách neboli stálé tmě je aktivita řízena endogenní periodou živočicha a tzv. volně běží. Protože je endogenní perioda tohoto živočicha o něco kratší než 24 hodin (jedná se o myš), ve volném běhu každý den čím dál více předbíhá skutečný 24hodinový solární cyklus. Působení světlem (naznačené čtvercem) v době subjektivního dne, jak ukazuje aktigraf A, nevyvolá u živočicha žádný fázový posun v lokomoční aktivitě, což je vyjádřeno tzv. „mrtvou zónou“ na fázově responzní křivce dole. Působení světlem na počátku subjektivní noci, jak ukazuje aktigraf B, však vyvolá fázové zpoždění. Působení světlem v první třetině subjektivní noci, jak ukazuje aktigraf C, vyvolá maximum tohoto fázové zpoždění. Působení světlem na konci subjektivní noci, jak ukazuje aktigraf D, vyvolá fázové předběhnutí. Převzato a upraveno z Foster *et al.*, 2020.



Působení světla v noci depolarizuje ipRGCs, což vyvolává výlev glutamátu (Liou *et al.*, 1986) a polypeptidu aktivujícího adenylát cyklázu hypofýzy (PACAP) (Hannibal *et al.*, 1997) na synapsích těchto buněk s neurony SCN. Působením tohoto neurotransmiteru dochází v SCN k aktivaci NMDA receptorů (zkráceně NMDAR; název vychází z vysoké afinity tohoto receptoru k umělému agonistovi N-metyl-D-aspartátu), což způsobí influx vápníku (Colwell, 2001). To indukuje transkripce a translace okamžitých časných genů (například genu *c-fos*) (Morris *et al.*, 1998) a také spuštění signální kaskády vedoucí k ovlivnění genů TTFL. Užití antagonistů NMDAR (Colwell *et al.*, 1991) či potlačení exprese *c-fos* (Wollnik *et al.*, 1995; Trávníčková *et al.*, 1996) vede ke snížení až inhibici fázových posunů vyvolaných světlem.

Influx vápenatých iontů způsobuje fosforylaci extracelulárně regulované kinázy ERK1/2 (při fosforylaci se dále užívá označení pERK1/2), důležité komponenty signální kaskády mitogenem-aktivovaných proteinových kináz (MAPK) (Obrietan *et al.*, 1998). Dochází také k fosforylaci proteinu CREB (zkratka vychází z anglického *cAMP response element binding protein*), který se ve své fosforylované formě (pCREB) váže na cAMP responsive element (CRE) v promotorových sekvencích genů *Per1* a *Per2* a indukuje expresi těchto genů (Trávníčková-Bendová *et al.*, 2002; Tischkau *et al.*, 2003). Indukce těchto hodinových genů způsobí seřízení vnitřních hodin na molekulární úrovni (Shigeyoshi *et al.*, 1997) a příslušný fázový posun i s jeho behaviorálním výstupem (Akiyama *et al.*, 1999).

Kromě pERK1/2 hraje ve světle indukovaných fázových posunech důležitou roli ještě další kináza, a to kináza glukogen syntázy 3 beta (GSK3 $\beta$ ). Fosforylace této kinázy inhibuje její aktivitu, světelný pulz během subjektivní noci pak její aktivitu zvyšuje (tj. snižuje množství její fosforylované formy), což se ukázalo být pro indukci fázových posunů nezbytné (Červená *et al.*, 2015; Paul *et al.*, 2017). GSK3 $\beta$  je schopná interagovat s různými hodinovými proteiny, čímž také ovlivňuje molekulární mechanismus hodin (Besing *et al.*, 2015).

## 2.2 NMDA receptor a jeho podjednotky

NMDA receptory jsou jedním ze tří typů ionotropních receptorů, jejichž primárním přirozeným agonistou je aminokyselina glutamát. Jelikož glutamát představuje hlavní excitační neurotransmitter centrální nervové soustavy, jedná se o receptory hojně nacházené v oblastech celé CNS (Monaghan & Cotman, 1985). Vyšší zastoupení NMDAR lze nalézt především v hipokampu, kde jsou zcela zásadní pro proces tvorby a uchovávání vzpomínek a procesy

učení (Morris *et al.*, 1986). Mají totiž klíčovou roli v tzv. dlouhodobé potenciaci (LTP z anglického *long term potentiation*), procesu zásadním pro synaptickou plasticitu (Harris *et al.*, 1984). Intenzivní aktivace NMDA receptorů má nicméně, podobně jako u ostatních ionotropních glutamátových receptorů, na neurony excitotoxický účinek (Rothman *et al.*, 1987).

NMDA receptory se skládají ze čtyř podjednotek poskládaných do funkčního heterotetrameru a tvořících centrální neselektivní iontový kanál. Jsou známé tři hlavní typy podjednotek NMDAR – GluN1-3 – které jsou evolučně velmi konzervované. Podjednotkové složení určuje vlastnosti daného receptoru (Vyklícky *et al.*, 2014). Každý funkční heterotetramer NMDAR je složen ze dvou podjednotek typu GluN1 schopných vázat glycin, nezbytný koaktivátor receptoru (Kleckner & Dingledine, 1988; Kuryatov *et al.*, 1994). Zbývající dvě podjednotky tvoří buď dvojice podjednotek typu GluN2 nebo dvojice podjednotek typu GluN3. Častější bývá složení heterotetrameru GluN1/GluN2, přičemž podjednotky GluN2 váží přirozeného agonistu NMDA receptoru, glutamát (Anson *et al.*, 1998). Existuje více typů podjednotek GluN2, přičemž jeden receptor může být složen i ze dvou odlišných podjednotkových typů. Distribuce jednotlivých podjednotkových typů se liší napříč CNS – např. v koncovém mozku jsou nejčastější zástupci podjednotkové typy GluN2A a GluN2B, zatímco v mozečku se jedná o GluN2C (Monyer *et al.*, 1992; Chazot & Stephenson, 1997). Jednotlivé typy podjednotek se liší svou afinitou ke glutamátu.

Samotná vazba glutamátu a glycinu nejsou za klidového membránového potenciálu dostačující pro aktivaci NMDA receptoru. K té je třeba ještě odstranit tzv. hořčičkový blok (Mayer *et al.*, 1984).

Podjednotkové složení NMDA receptorů není v jednotlivých částech mozku stálé. Nejen, že se toto složení mění v průběhu postnatálního vývoje, ale vykazuje také cirkadiánní rytmicitu (Bendová *et al.*, 2009). Bylo navíc zjištěno, že má toto složení stěžejní roli při procesu světelné synchronizace. Podání antagonistů specifických pro podjednotku GluN2B inhibuje glutamátem vyvolanou fosforylaci proteinu CREB a kinázy ERK1/2 v SCN (Bendová *et al.*, 2012).

### 2.3 Ketamin

Ketamin, chemicky řazený do skupiny cyklohexylaminů, je látka poprvé syntetizovaná v roce 1963. V tomtéž roce byl také poprvé úspěšně použitý jako anestetikum a jeho objevitel Ed Domino zavedl označení „disociativní anestetika“ pro celou kategorii látek s anestetickým

účinkem, které současně způsobují pocit disociace od vlastního smyslového vnímání a reality (Denomme, 2018).

Pro své bronchodilatační účinky, rozpustnost ve vodě i tucích, mírné a bezpečné působení na kardiovaskulární systém, velkou šíří terapeutické dávky a rozmanité možnosti aplikace je ketamin s oblibou užíván jako anestetikum ve veterinární i lidské medicíně, především u dětí (Marland *et al.*, 2013). Popularitě se ale těší i jeho subanestetické dávky, které jsou využívány pro své analgetické účinky, a to zvláště ve snaze ustupovat od užívání opioidních přípravků (Barrett *et al.*, 2020). V posledních dvaceti letech se navíc zvyšuje zájem o využívání subanestetických dávek této látky jako antidepresiva s rychlým nástupem účinku (Kohtala, 2021).

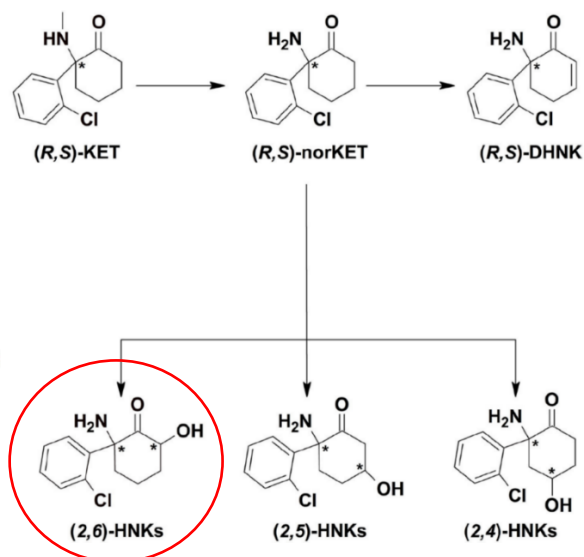
### 2.3.1 Formy a metabolity ketaminu

Ketamin je chirální sloučenina. Existují dva optické izomery (enantiomery) ketaminu označované jako (R)-ketamin (R-Ket), někdy také nazývaný *arketamin* či (-)ketamin, a (S)-ketamin (S-Ket), někdy také nazývaný *esketamin* či (+)ketamin.

Obě tyto formy podléhají v organismu demethylaci, tedy přeměně na norketamin (opět v rámci dvou chirálních forem, R a S), kterou zprostředkovávají enzymy jaterního cytochromu P450. Je známo, že (S)-ketamin podléhá metabolické přeměně rychleji než druhý stereoizomer (Kharasch & Labroo, 1992). Norketamin představuje aktivní metabolit s účinky stejnými, jaké má samotný ketamin (Shimoyama *et al.*, 1999).

Dále podléhá norketamin přeměně na dehydronorketamin (DHNK; opět s R a S chirálními formami) s dvojnou vazbou v cyklohexanové části, či na hydroxynorketamin (HNK), u kterého může docházet k hydroxylaci na několika uhlících, jak lépe znázorňuje obrázek 3.

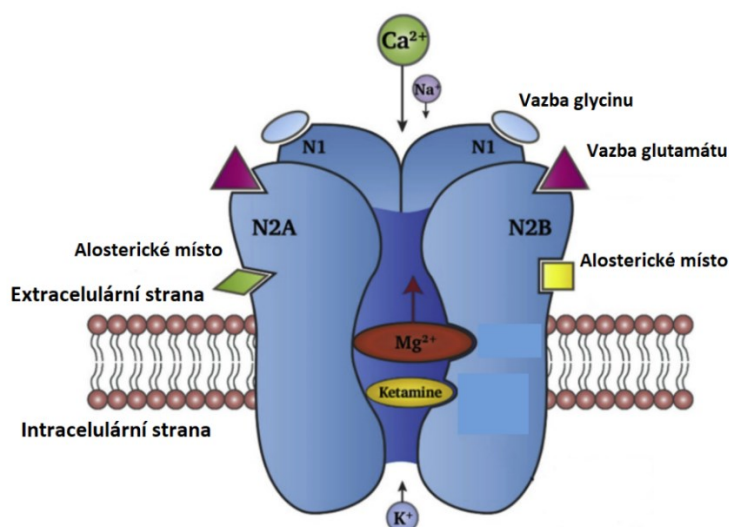
Bylo zjištěno, že skupina (2,6)-HNK, tedy norketamin hydroxylovaný na uhlíku C6, představuje dominantní metabolity nacházené po ketaminové infuzi v lidské plazmě (Moaddel *et al.*, 2010). Tyto metabolity jsou také biologicky aktivní, ačkoliv jiným mechanismem, než je ketamin nebo norketamin (Zanos *et al.*, 2016) – dále v sekci 2.3.3.



**Obrázek 3. Metabolické přeměny ketaminu.** (R) i (S) izomery ketaminu (KET) podléhají vlivem cytochromu P450 demethylaci a stávají se z nich (R) a (S) izomery norketaminu (norKET). Tyto izomery jsou následně buď dehydrogenovány za vzniku (R) a (S) izomerů dehydronorketaminu (DHNK), či hydroxylovány za vzniku hydroxyketaminu (HNK). Hydroxylace norketaminu může probíhat na třech různých místech jeho cyklohexanového kruhu. Hydroxylovaný uhlík se stává dalším chirálním centrem, vlivem čehož může vznikat mnoho různých enantiomerů jednotlivých hydroxyketaminů. Jen některé z nich se však vyskytují jako přirozené metabolické produkty v organismu. Červený kroužek označuje dominantní metabolit nacházený v lidské plazmě. Převzato a upraveno z Highland *et al.*, 2022.

### 2.3.2 Ketamin jako analgetikum a anestetikum

Hlavní účinky ketaminu na fyziologické procesy jsou připisovány jeho působení na NMDA receptory (Anis *et al.*, 1983). Ketamin působí jako nekompetitivní antagonist těchto receptorů. Váže se dovnitř iontového kanálu NMDAR (podobně jako se uvnitř váže molekula hořčíku při hořčíkovém bloku), čímž zabraňuje toku /proudění proudu iontů kanálem (MacDonald *et al.*, 1991). Tento mechanismus lépe ilustruje 4.



**Obrázek 4. NMDA receptor a jeho nekompetitivní agonista ketamin.** NMDA receptor je heterotetramer složený ze dvou podjednotek GluN1 (na obrázku jako N1) a dvou podjednotek GluN2 (na obrázku ve dvou typech, N2A a N2B). Podjednotky N1 váží glycin, nezbytný koaktivátor receptoru. Podjednotky N2 váží glutamát, přirozeného agonistu receptoru, a obsahují také alosterická vazebná místa pro další ligandy. Za klidového membránového potenciálu je neselektivní iontový kanál receptoru blokován hořčíkovým blokem. Ketamin představuje nekompetitivního antagonistu NMDAR, neboť má podobně jako iont  $Mg^{2+}$  vazebné místo uvnitř iontového kanálu, a to konkrétně na N2 podjednotkách. Převzato a upraveno z Kokane *et al.*, 2020.

Inhibice NMDAR se pojí nejen se snížením excitačního přenosu v CNS, ale také s inhibicí LTP a snížením procesu ukládání paměťových stop. Kromě účinků sedace se tak s užitím ketaminu pojí také nežádoucí účinky především psychotického rázu – tyto účinky bývají popisovány jako pocit odtržení od sebe sama (Kohtala, 2021).

Je již dlouho známo, že (S)-ketamin je ve svých anestetických i analgetických účincích více potentní, než je racemická směs nebo (R)-ketamin (White *et al.*, 1980; Mathisen *et al.*, 1995). Současně se však s užitím výhradně tohoto enantiomeru pojí i horší psychotické vedlejší účinky (White *et al.*, 1985). Obě tyto skutečnosti se váží k faktu, že (S)-ketamin má vyšší potenci blokovat činnost NMDA receptorů – disociuje od nich ve výrazně menší míře, než druhý stereoizomer (Zeilhofer *et al.*, 1992). Nežádoucí účinky (S)-ketaminu bývají užívány pro studium negativních, pozitivních i kognitivních příznaků schizofrenie a podporují hypotézu glutamátového modelu schizofrenie (Frohlich & Van Horn, 2014). Indukované prožitky derealizace, depersonalizace, úzkostí a pocitu ohrožení spolu se ztrátou kontroly nad vlastním myšlením se podobají akutním

psychotickým epizodám, jaké se u schizofrenie vyskytují (Lahti *et al.*, 1995; Vollenweider *et al.*, 1997).

### 2.3.3 Subanestetické dávky ketaminu

Anestetické dávky ketaminu vedou blokací NMDA receptorů ke snížení glutamátového výlevu v CNS. Již před dlouhou dobou bylo ale zjištěno, že nižší dávky ketaminu mají antidepresivní účinky (Berman *et al.*, 2000). Paradoxně tyto nízké dávky zvyšují glutamátový výlev a excitaci v některých částech mozku – například v mediálním prefrontálním kortexu (mPFC) (Moghaddam *et al.*, 1997) nebo v hipokampu (Widman & McMahon, 2018). Tento paradox se vysvětluje tak, že NMDA receptory v těchto oblastech přednostně regulují frekvenci akčních potenciálů inhibičních GABA interneuronů spíše než excitačních pyramidových neuronů (Homayoun & Moghaddam, 2007). Protože GABA neurony svou aktivitou inhibují aktivitu pyramidových neuronů, dochází při podání nízkých dávek antagonisty NMDAR k nárůstu excitace v těchto oblastech. Bylo prokázáno, že pro tento efekt je nutná přítomnost podjednotky GluN2B v NMDA receptorech GABA interneuronů (Miller *et al.*, 2014; Gerhard *et al.*, 2020). Stejný efekt mají subanestetické dávky ketaminu také na somatostatin produkující (zkráceně SST) interneurony v prefrontálním kortexu. Tlumením NMDAR na těchto interneuronech dochází ke snížení jejich inhibičního působení na dendrity a synaptické vstupy, což vede ke zvýšenému vstupu vápníku do pyramidových neuronů PFC (Ali *et al.*, 2020).

Nižší dávky ketaminu mají antidepresivní účinky s velmi rychlým nástupem a dlouhotrvajícím působením. Navíc působí často i u lidí rezistentních vůči standardní terapii (Murrough *et al.*, 2013), což z ketaminu dělá slibný farmakologický cíl pro účinnější léčbu deprese (Krystal *et al.*, 2019). Ačkoliv byly i u jiných antagonistů NMDAR pozorovány antidepresivní účinky (Trullas & Skolnick, 1990), je zřejmé, že tento antagonismus není jediným mechanismem, který za těmito účinky stojí. Bylo ostatně prokázáno, že antidepresivní účinky izolovaného (R)-ketaminu jsou potentnější a déle trvající než v případě (S)-ketaminu, který s NMDA receptory interaguje více (Zeilhofer *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2014a). S užitím tohoto izomeru se navíc také nepojí psychotické nežádoucí účinky, jaké inhibici glutamátové transmise na NMDAR většinou provázejí (Allen & Young, 1978; Yang *et al.*, 2015).

Antidepresivní působení ketaminu je spojené i s další skupinou ionotropních glutamátových receptorů, a to s AMPA receptory (AMPA; zkratka vychází z kyseliny  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionové, která představuje umělého agonistu s vysokou afinitou k tomuto receptoru). Zatímco pro NMDAR představuje ketamin

antagonistu, u AMPAR způsobuje vyšší aktivaci. AMPAR reagují na přemíru glutamátu snížením své senzitivity, což je zajišťováno fosforylací podjednotky GluR1 tohoto receptoru a je dalším z procesů ovlivňujících LTP (Lee *et al.*, 2010). Aplikace ketaminu snižuje hladiny fosforylované GluR1 podjednotky (Maeng *et al.*, 2008), čímž se zvyšuje glutamátová transmise a antidepresivní účinky – bylo ostatně prokázáno, že podání antagonisty AMPAR současně s ketaminem antidepresivní účinky výrazně sníží (Koike *et al.*, 2011). Zajímavé je, že antidepresivní účinky metabolitu (S)-norketaminu (druhý enantiomer, (R)-norketamin, tyto účinky nemá) zůstávají nesníženy i v přítomnosti AMPAR agonisty (Yang *et al.*, 2018), zatímco účinky (2R,6R)-HNK jsou vyvolané primárně působením tohoto metabolitu na AMPAR – a to dokonce i v dlouhodobém měřítku, neboť způsobuje upregulaci těchto receptorů (Zanos *et al.*, 2016). Účinek (2R,6R)-HNK na AMPAR je o to pozoruhodnější tím, že na NMDAR působí tento metabolit jen málo (Lumsden *et al.*, 2019).

V buněčných kulturách bylo prokázáno, že ketamin zvyšuje produkci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), což vede k vyšší aktivaci proteinkinázy A (PKA) (Wray *et al.*, 2019). Ta zajišťuje fosforylací proteinu CREB, který slouží jako transkripční faktor řady genů, včetně genů důležitých pro neuroprotektci a synaptickou plasticitu (Dwivedi & Pandey, 2008). Jedním z takových genů je i gen pro mozkový neurotrofický faktor (BDNF, zkratka z anglického *brain-derived neurotrophic factor*). BDNF interaguje s fosforylovanou tropomyosinovou receptorovou kinázou B (TrkB), a podporuje tak neurogenezi – přispívá k buněčnému přežití a proliferaci a k růstu axonů a dendritů. Zvýšení buněčné proliferace při aplikaci subanestetických dávek ketaminu bylo již experimentálně prokázáno, a to konkrétně v oblasti gyru dentatu (DG) (Michaëlsson *et al.*, 2019). Snížené hladiny BDNF a fosforylované TrkB naopak provází některé neurodegenerativní choroby, jako je např. Alzheimerova či Parkinsonova choroba, nebo roztroušená skleróza (Bathina & Das, 2015), a ostatně i depresi (Nibuya *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2015). Zajímavé je, že pozitivní modulace AMPA receptorů vedla u tkáňových kultur hipokampu také ke zvýšení hladin BDNF (Lauterborn *et al.*, 2000). To je v souladu s poznatkem, že při současném podání ketaminu a AMPAR antagonistů *in vivo* nedochází ke zvýšení hladin BDNF (Zhou *et al.*, 2014).

Aplikace ketaminu přispívá ke zvýšení neurogeneze také indukci signální dráhy spojené s fosforylací proteinu mTOR (z anglického *mammalian target of rapamycin*) (Li *et al.*, 2010). K fosforylací mTOR také přispívají metabolity ketaminu – obě chirální formy norketaminu a (2S,6S)-hydroxynorketamin (Paul *et al.*, 2014). Důležitou komponentou této signální dráhy je fosforylace extracelulárně regulované kinázy ERK1/2, kterou subanestetické dávky ketaminu také zvyšují (Lepack *et al.*, 2016). Ketaminem indukované zvýšení hladin pERK1/2 se váže

také k signalizační dráze mitogenem-aktivovaných proteinových kináz (MAPK), která též hraje důležitou roli pro synaptickou plasticitu (Réus *et al.*, 2014). Podobně, jako je tomu u efektu na hladiny BDNF, ani tyto účinky ketaminu nejsou pozorovány při současném podání antagonisty AMPAR (Lepack *et al.*, 2016).

Kromě kináz, u kterých ketamin jejich aktivitu indukuje, je však i taková, jejíž aktivitu inhibuje. Bylo zjištěno, že GSK3 je fosforylována, tedy inhibována, již při aplikaci nízkých dávek ketaminu (Beurel *et al.*, 2011). Tato kináza nejen moduluje procesy neurogenese, synaptické plasticity a buněčné smrti, ale bylo zjištěno, že její přehnaná aktivita může přispívat k poruchám nálady až k depresím (Li & Jope, 2010).

#### 2.3.4 Ketamin jako chronofarmakum

Aplikace stejné látky v různou denní dobu může mít velmi odlišné účinky na organismus. Protože je velká část fyziologických a molekulárních procesů cirkadiánně řízená – s vnitřní periodou se například mění téměř 70 % transkriptů důležitých pro synaptický přenos (Noya *et al.*, 2019) – lze předpokládat, že čas podání látky je minimálně stejně tak důležitý jako je její léková forma nebo dávka. Chronofarmakologický přístup si klade za cíl podávat farmaka v době, kdy se dá předpokládat jejich maximální pozitivní a minimální negativní účinek.

Účinky ketaminu mohou být cirkadiánně ovlivněné na mnoha úrovních. Základní úrovně jsou již farmakokinetické. Pro působení na struktury CNS musí farmakum nejprve překonat hematoencefalickou bariéru (HEB, někdy také BBB z anglického *blood-brain barrier*). Propustnost této bariéry pro xenobiotika je však cirkadiánně řízená (Cuddapah *et al.*, 2019), což znamená, že stejná dávka podaná v různých časech nemusí mít stejnou distribuci k cílovým tkáním. Co víc, většina metabolických enzymů v játrech vykazuje v průběhu dne odlišnou aktivitu (DeBruyne *et al.*, 2014; Tahara & Shibata, 2016), což ovlivňuje i hladinu jednotlivých metabolitů ketaminu (Martinez-Lozano Sinues *et al.*, 2017). Protože jsou některé metabolity ketaminu nadále biologicky aktivní, a u některých bylo dokonce prokázáno, že jejich cílové struktury jsou odlišné od těch, na které působí ketamin samotný, může cirkadiánní ovlivnění metabolismu hrát velkou roli v celkovém účinku této látky.

Farmakodynamické parametry ketaminu mohou být cirkadiánně také značně ovlivněny. Cirkadiánně řízené je podjednotkové složení NMDA receptorů (Bendová *et al.*, 2009), hlavního cíle anestetických i subanestetických dávek ketaminu. Stejně tak je cirkadiánně řízené i podjednotkové složení AMPA receptorů (Míková *et al.*, 2021), jejichž aktivita je nezbytná pro účinky subanestetických dávek ketaminu. Současně vykazují cirkadiánní rytmicitu i další



molekulární cíle tohoto farmaka. Fosforylací modulovaná aktivita kináz ERK1/2 a GSK3 $\beta$  se mění v průběhu dne, s vyšší aktivitou v aktivní fázi živočicha (Pačesová *et al.*, 2015; Bendová *et al.*, 2020). Denní rytmicitu vykazují také protein BDNF, který je ještě zajímavější tím, že při depresivních stavech tuto rytmicitu ztrácí (Yi *et al.*, 2015).

Důležité nicméně je zabývat se chronofarmakologickým působením látky i z druhého směru, tzn. nejen, jak je působení farmaka ovlivněné cirkadiánním systémem, ale jak je cirkadiánní systém ovlivněn působením farmaka. Zvláště zajímavé je zabývat se tímto působením právě u ketaminu známého svými antidepressivními účinky, neboť deprese je choroba spojená s narušením cirkadiánního systému (Lam, 2008).

Studií, které by se tímto působením zabývaly, je však málo. Navíc se věnují pouze účinkům vysokých, anestetických dávek ketaminu. Jedna taková studie ukazuje, že tyto dávky způsobují fázové posuny – aplikace v aktivní fázi způsobí fázové předběhnutí lokomoční aktivity, zatímco aplikace v klidové fázi způsobí fázové zpoždění (Mihara *et al.*, 2012). Jiná studie hovoří o tom, že aplikace ketaminu snižuje fázové posuny lokomoční aktivity po vystavení zvířat světelnému pulzu (Colwell *et al.*, 1990). Studie prováděná *in vitro* dokonce ukazuje, že ketamin může vnitřní hodiny ovlivňovat již na molekulární úrovni – v buněčných kulturách způsobila jeho aplikace zpoždění nasedání komplexu CLOCK:BMAL1 na E-boxy hodinových genů TTF1 a hodinami kontrolovaných genů (Bellet *et al.*, 2011).

Tyto studie ukazují, že ketamin není vhodný pro anestezii zvířat v cirkadiánních pokusech kvůli možnému ovlivnění experimentu. Dalo by se nicméně očekávat, že účinek subanestetických dávek na cirkadiánní systém bude, vzhledem k jejich prokázanému odlišnému působení na mozkové struktury, odlišný. Tato hypotéza však dosud nebyla testována, a to navzdory tomu, že některé publikace naznačují, že rychlé antidepressivní působení ketaminu by mohlo být způsobeno právě jeho vlivem na cirkadiánní rytmy (Duncan *et al.*, 2017; Orozco-Solis *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2021).

### 3. Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, jaký vliv má aplikace subanestetické dávky ketaminu na cirkadiánní systém potkana, zejména na světlem indukované změny v lokomoční aktivitě a světlem indukované markery v SCN a DG, který představuje jednu ze silně proliferačních oblastí mozku.

Pomocí protilátek byly stanoveny hladiny proteinu c-FOS, aktivované kinázy pERK, fosforylovaného transkripčního faktoru pCREB a neurotrofinu BDNF. Zatímco c-FOS, pERK a pCREB představují světloreaktivní markery, BDNF je marker neurogeneze. Také byla sledována lokomoční aktivita, jeden z nejlépe pozorovatelných behaviorálních výstupů aktivity SCN, pro porovnání změn indukovaných v této aktivitě a v hladinách světloreaktivních markerů.

## 4. Materiály a metody

### 4.1 Laboratorní zvířata

V experimentech byli použiti dospělí samci potkanů kmene Wistar (dodavatel Velaz, s.r.o) o hmotnostech 460–610 g. Krmení byli standardní laboratorní krmnou směsí ST-1 a přístup k potravě i vodě měli *ad libitum*. Umístění byli v boxech vybavených standardní podestýlkou v chovné místnosti s udržovanou pokojovou teplotou ( $22 \pm 2$  °C).

Osvětlení poskytovaly LED umístěné přímo nad chovnými boxy, které zajišťovaly intenzitu světla okolo 30 luxů. Před začátkem experimentu byla zvířata chována ve standardním světelném režimu LD12:12, tedy střídání světla a tmy po 12 hodinách, se začátkem dne v 6:00. V den experimentu byl standardní světelný režim změněn na režim stálé tmy (dále označován jako DD). Při práci s potkany v DD podmínkách bylo dbáno na to, aby se v místnosti žádným způsobem neobjevilo bílé světlo. Veškeré osvětlení nutné pro manipulaci v těchto podmínkách bylo zajištěné červeným světlem, které z viditelného spektra světla nejméně excituje fotopigment ipRGCs, melanopsin (Newman *et al.*, 2003).

Pro účely experimentu byli potkani rozděleni do dvou skupin, na zvířata pulzovaná světlem a nepulzovaná, představující vůči nim kontrolní skupinu. Skupina pulzovaných čítala 16 zvířat, skupina nepulzovaných čítala 24 zvířat, tedy dohromady 40 zvířat.

### 4.2 Aplikace ketaminu a vystavení světelnému pulzu

V CT 14 (tj. ve 20 hodin) byl polovině zvířat ze skupiny pulzovaných ( $n = 8$ ) a polovině zvířat ze skupiny nepulzovaných ( $n = 12$ ) aplikován roztok ketaminu intraperitoneální injekcí (Narkamon – 10 % roztok ketaminu ve formě hydrochloridu; Bioveta a. s.) s cílem zajistit dávku subanestetickou, ale s pozorovatelným účinkem. Tato dávka byla experimentálně stanovena na 40 mg/kg živé váhy, což objemově činilo přibližně 200 ml roztoku ketaminu na jedno zvíře. Druhá polovina zvířat obou skupin představovala kontrolu a byl jim ve stejný čas aplikován intraperitoneálně fyziologický roztok taktéž v objemu 200 ml.

V čase CT 15 následně byla skupina pulzovaných zvířat vystavena 15minutovému světelnému pulsu, který byl prováděn stropním světlem. Nepulzovaná zvířata setrvala ve tmě.

### 4.3 Příprava a odběr tkání

V konkrétních časových bodech (jak je zobrazeno v tabulce 1) v průběhu dvou dnů byli potkani z obou skupin postupně uspávaní intraperitoneální aplikací roztoku thiopentalu (50mg/kg) a usmrcováni za účelem odběru tkání pro imunohistochemii.

**Tabulka 1. Časové body jednotlivých odběrů tkáně.** V čase CT14 byl polovině zvířat z každé skupiny aplikován ketamin, druhá polovina představovala kontrolu. V čase CT15 byla zvířata ze skupiny pulzovaných vystavena 15minutovému světelnému pulzu. Zvířata skupiny nepulzovaných zůstala ve tmě. Následovaly jednotlivé odběry tkáně podle časového harmonogramu počítaného od CT15. V každém časovém bodě bylo za účelem transkardiální perfuze pro odběr mozku uspáno vždy 8 zvířat, z nichž čtyřem byl aplikován ketamin a čtyři byla kontrolní. Poslední časový bod CT15 + 5 h se týkal pouze skupiny nepulzovaných zvířat.

	CT14	CT15	+ 15 min	+ 1 h 45 min	+ 5 h
<b>Pulzovaná (n = 16)</b>	Ketamin (n = 8)	Světelný pulz (15 min)	Odběr tkáně (n = 8)	Odběr tkáně (n = 8)	X
<b>Nepulzovaná (n = 24)</b>	Ketamin (n = 12)	X	Odběr tkáně (n = 8)	Odběr tkáně (n = 8)	Odběr tkáně (n = 8)

Uspaným zvířatům byla otevřena hrudní dutina pro odhalení srdce, a do levé srdeční komory byl injekčně aplikován heparin pro zabránění srážení krve. Následovala transkardiální perfuze tkání. Levou srdeční komorou byla zavedena perfuzní jehla směřující k aortě pro aplikaci fyziologického roztoku za účelem promytí krevního oběhu. Pravá síň byla prostřižena chirurgickými nůžkami pro volný odtok krve. Po odmytí tkání byl toutéž perfuzní jehlou aplikován 4% roztok paraformaldehydu (PFA) pro fixaci tkání.

Po dostatečné fixaci byly vypreparovány mozky a umístěny v 4% roztoku PFA po 24 hodin ve 4 °C pro post-fixaci. Poté byly přemístěny do 20% roztoku sacharózy po 24 hodin ve 4 °C. Nakonec byly mozky zamrazeny na suchém ledu a uloženy v -80 °C.

### 4.4 Imunohistochemie

Celkem 40 fixovaných mozků bylo využito pro detekci proteinů metodou free-floating imunohistochemie (IHC).

#### 4.4.1 Seznam použitých chemikálií

Seřazený dle použití:

- Fyziologický roztok (PBS)
  - 8,05 g NaCl, 2,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O, 0,2 g KCl, 0,2 g K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (všechny chemikálie od PENTA) na 1 l destilované vody; pH upraveno na 7,4
- Citrátový pufr (10mM)
  - 0,294 g dihydrát citrátu sodného (Sigma-Aldrich) na 100 ml destilované vody; pH upraveno na 6,0; přidáno 50 µl Tween
- 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Hovězí sérový albumin (BSA z angl. *bovine serum albumine*; Sigma-Aldrich)
  - 1% – 1 g BSA rozpuštěno ve 100 ml PBS; přidáno 300 µl Tritonu
  - 0,3% – 1% BSA ředěno v PBS
- 2% standardní sérum (NGS z angl. *normal goat serum* – Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories)
- Primární protilátky (1°Ab) detekující následující proteiny. Ředění probíhalo vždy v 1% BSA.
  - pERK (Cell Signaling Technology) – ředění 1:750
  - pCREB (Cell Signaling Technology) – ředění 1:500
  - BDNF (LifeSpan BioSciences, Inc.) – ředění 1:100
  - c-FOS (Calbiochem – Merck) – ředění 1:10 000
- Sekundární protilátka, 2°Ab – ředění 1:400 v 1% BSA (Rabbit IgG – Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories)
- ABC – AB komplex – ředění A 1:400, B 1:400 (Vectastain Elite ABC Kit; Vector Laboratories)
- DAB – 3,3-diaminobenzidin tetrahydrochlorid
  - 10 mg (Sigma-Aldrich) rozpuštěných ve 20 ml PBS + 7µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- EtOH – ethanolová alkoholová řada, 70% a 96%
- Xylen
- DPX Mountant for histology (Sigma-Aldrich)

#### 4.4.2 Příprava řezů

Mozky získané postupem popsaným v sekci 4.3 byly nakrájeny na kryokatu (Leica CM 1860) za teploty  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  na koronární řezy o tloušťce  $30\text{ }\mu\text{m}$ . Následně byly štětečkem přendávány do jamek předem naplněných roztokem PBS. Z řezů byly vybrány ty nejlépe zachycující struktury zájmu, tedy SCN a hipokampus.

#### 4.4.3 Citrátový antigen-retrieval

U řezů mozků, pro které měla být následně užitá primární protilátka proti proteinu BDNF, bylo nutné nejprve provést citrátový antigen-retrieval za účelem lepší penetrace protilátky.

Do zkumavek Eppendorf byl připraven citrátový pufr (jeho složení bylo popsáno v sekci 4.4.1), a do něj umístěny řezy mozků. Zkumavky byly ponechány inkubaci v horké vodní lázni ( $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) po dobu 5 minut. Po vytažení z vodní lázně proběhla 30minutová inkubace při pokojové teplotě.

Následně byly řezy promyty v PBS (2 x 5 minut). Veškerý další postup probíhal u všech řezů totožně a je popsán v následující sekci.

#### 4.4.4 Pracovní postup IHC

Pokud není zmíněno jinak, veškeré inkubace probíhaly při pokojové teplotě.

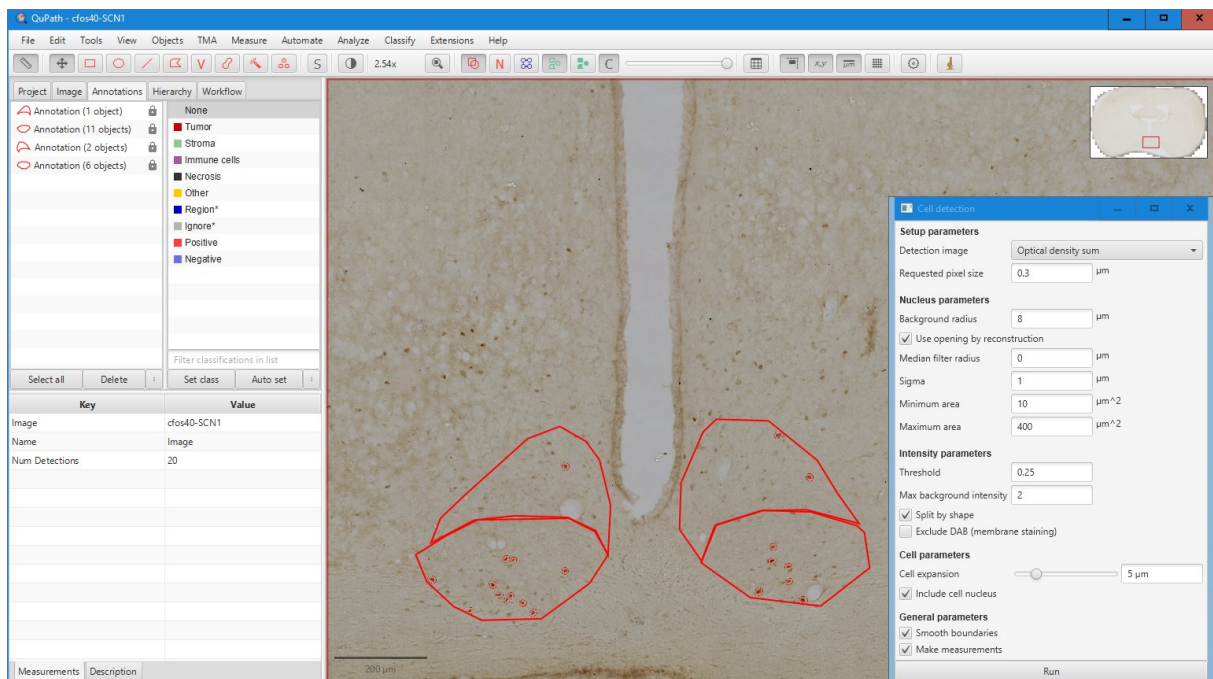
- Inkubace řezů 10 minut v 0,5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  za účelem zablokování endogenních peroxidáz.
- Promytí řezů v PBS (3 x 5 minut).
- Inkubace řezů 1 hodinu v 2% NGS za účelem zablokování nespecifického pozadí.
- Inkubace řezů přes noc při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  v příslušné primární protilátce ( $1^{\circ}\text{Ab}$ ). Použité primární protilátky jsou popsány v sekci 4.4.1.
- Následující den promytí v 0,3% BSA pufru (2 x 5 minut).
- Inkubace řezů 1 hodinu v sekundární protilátce ( $2^{\circ}\text{Ab}$ ).
- Promytí v 0,3% BSA pufru (2 x 5 minut).
- Inkubace 1 hodinu v roztoku ABC.
- Promytí v 0,3% BSA pufru (1 x 5 minut).
- Promytí řezů v PBS (2 x 5 minut).

- Obarvení řezů v DAB pro reakci DAB s peroxidázou v AB komplexu za vzniku nerozpustného hnědého produktu a umožnění vizualizaci antigenů primárních protilátek.
- Promytí řezů v PBS (2 x 5 minut).
- Natažení řezů na popsaná želatinová podložní skla pomocí štětečku. Schnutí řezů na sklech nejméně 24 hodin.
- Odvodnění řezů na sklech pomocí alkoholové řady:
  - 70% ethanol – 3 minuty
  - 96% ethanol – 2 x 3 minuty
  - Xylen – 3 x 3 minuty
- Připevnění krycích skel pomocí média DPX.

#### 4.4.5 Obrazová analýza mozkových řezů u metody IHC

Zafixované mozkové řezy získané metodou IHC na 160 sklech byly digitalizovány za pomoci přístroje Zeiss Axioscan Z1. Tento přístroj umožňuje snímání celých skel za vysokého rozlišení, řezy mozků byly proto fotografovány celé. Příslušné oblasti zájmu (tedy SCN a DG v hipokampu) byly ve fotografiích identifikovány za pomoci atlasu (The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Paxinos & Watson, 2006). Fotografie byly využity pro obrazovou analýzu v programu QuPath. QuPath představuje nový „open source“ software umožňující zpracování datově objemných tkáňových fotografií (Bankhead *et al.*, 2017), který je prokazatelně využíván v imunohistochemických analýzách (Hornsby *et al.*, 2020; Aung *et al.*, 2021; Mäkinen *et al.*, 2021) i v chronobiologických experimentech (Welz *et al.*, 2019).

Pro analýzu signálu ve fotografiích byla v programu využita funkce „*cell detection*“ (vyjma protilátky BNDF, viz dále). U každé užití protilátky byly nastaveny vhodné parametry nezbytné pro správné automatické spočítání buněk. Tyto parametry byly pro zachování co nejvyšší objektivity jednotné pro všechny fotografie řezů mozků obarvených danou protilátkou. Nastavení parametrů lépe ilustruje reprezentativní obrázek 5.

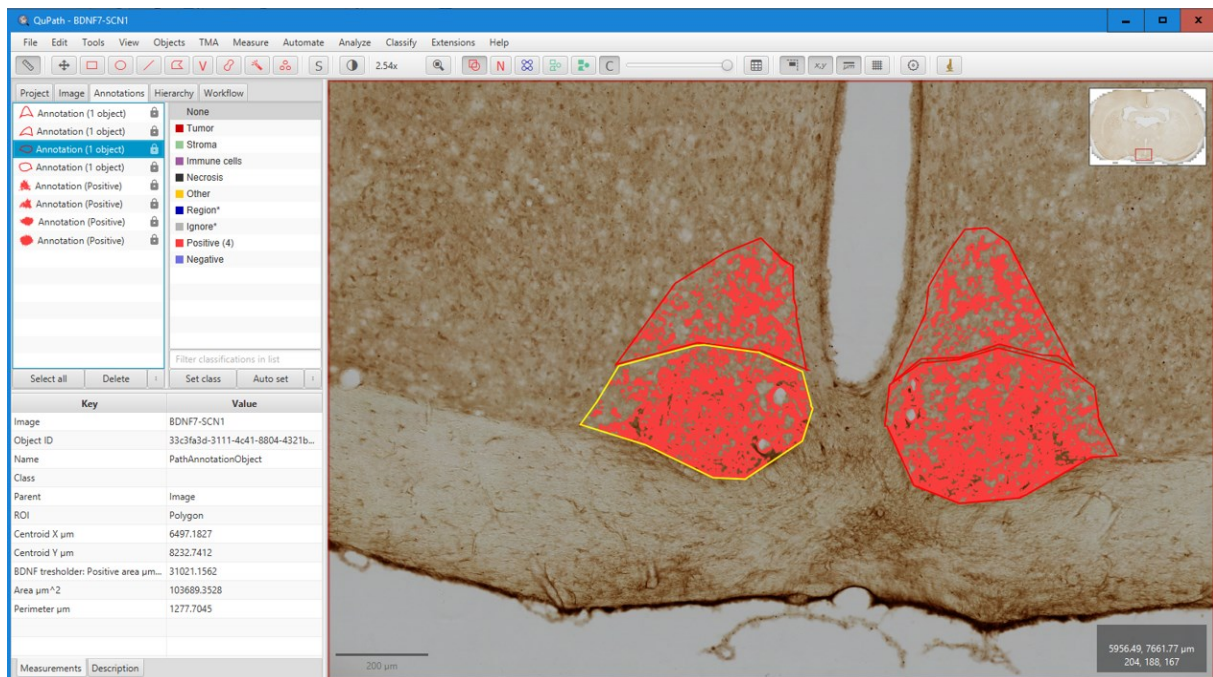


**Obrázek 5. Nastavení parametrů programu QuPath pro automatické počítání imunoreaktivních buněk c-FOS v SCN.** Fotografie řezu mozku otevřená v programu QuPath, v pravém dolním rohu s měřítkem (délka úsečky představuje 200  $\mu\text{m}$ ), zobrazuje levou a pravou hemisféru SCN, které jsou červenou linkou rozdělené na dorsomediální a ventrolaterální část. V pravém horním rohu se zobrazuje umístění výřezu fotografie na řezu celého mozku. Okno pro funkci *cell detection* v pravé části umožňuje zvolení parametrů pro automatické spočítání imunoreaktivních buněk. Imunoreaktivní buňky c-FOS vyhovující parametrům jsou automaticky označeny červeně. Počty těchto buněk v rozdělených částech SCN jsou zobrazeny na liště vlevo.

Pro řezu SCN byly u dané protilátky a daného mozku vždy nalezeny 1 až 2 fotografie zachycující mediální část SCN. Jádra byla následně rozdělena na dvě části, a to VLSCN a DMSCN, jak je zobrazeno na obrázku 5. Buňky v obou těchto částech byly počítány zvlášť. Výsledný počet buněk u  $n = 1$  představuje průměr počtu buněk levých a pravých jednotlivých částí SCN.

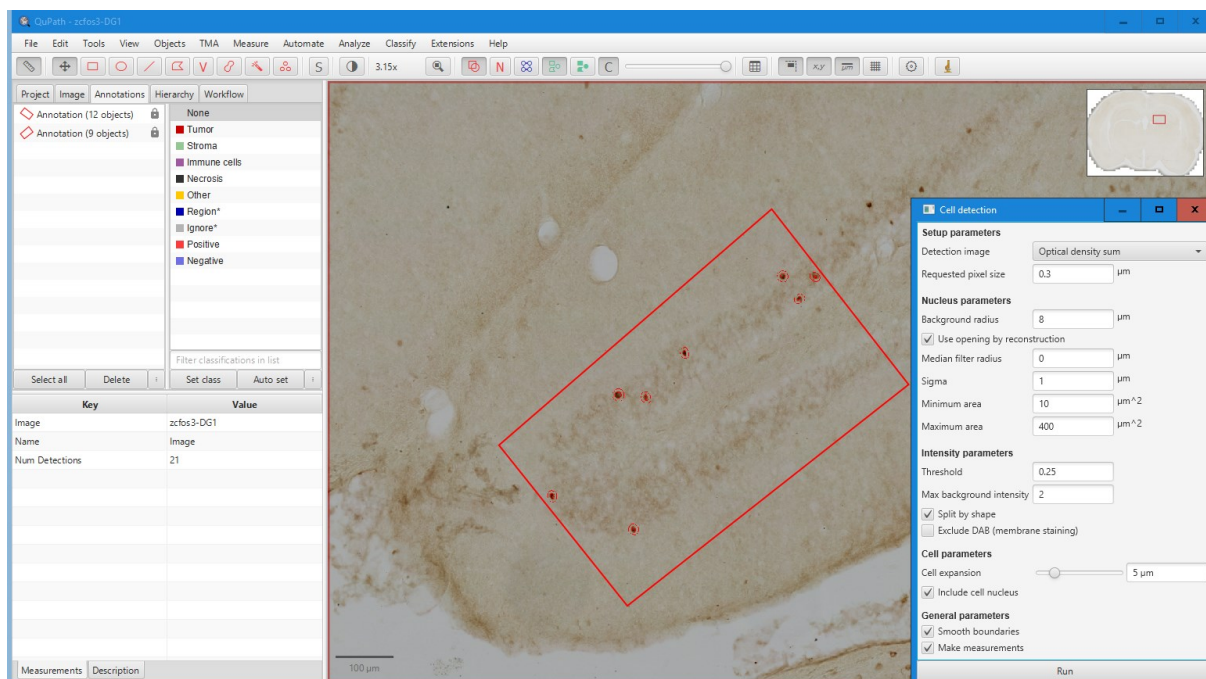
U protilátky proti BDNF nebylo vlivem silně obarveného pozadí možné použít funkci „*cell detection*“. Byla proto využita funkce „*thresholder*“, která umožnila měření relativní optické denzity. Po rozdělení SCN na VLSCN A DMSCN byl u každé části počítán poměr celkové plochy (v  $\mu\text{m}^2$ ) pozitivně obarvené části (tak, jak byla určena jednotným *thresholdem*) vůči celkové ploše dané části SCN, jak lépe ilustruje obrázek 6. Výsledný poměr u  $n = 1$  představuje průměr poměrů z levých a pravých jednotlivých částí SCN.





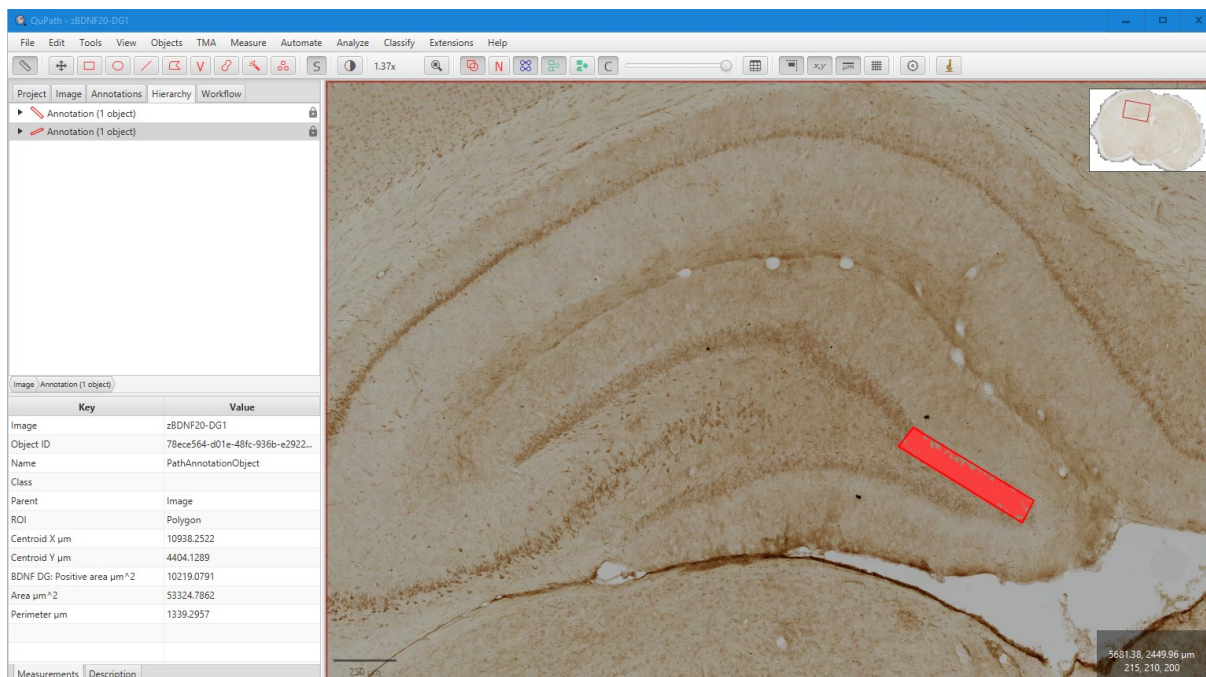
**Obrázek 6. Ukázka počítání relativní denzity protilátky BDNF v SCN v programu QuPath.** Fotografie řezu mozku otevřená v programu QuPath, v pravém dolním rohu s měřítkem (délka úsečky představuje 200  $\mu\text{m}$ ), zobrazuje levou a pravou hemisféru SCN, které jsou červenou linkou rozdělené na dorsomediální a ventrolaterální část. Žlutá linka označuje v tu chvíli vybranou část (levé VLSCN v tomto případě). Na liště vlevo lze vidět celkovou velikost žlutě označené oblasti ( $\text{Area } \mu\text{m}^2$ ) a velikost pozitivně obarvené části oblasti (*BDNF threshold: Positive area  $\mu\text{m}^2$* ) vyznačené na řezu červeně.

Na řezech zachycujících oblast hipokampu byla v DG zvolena oblast zájmu, tzv. ROI (z anglického *region of interest*), neboli oblast s definovanými a neměnnými rozměry, uvnitř které se počítaly imunoreaktivní buňky (obr. 7). Tato ROI byla vždy umístěna a nastavena na vnější okraj DG tak, aby se u každého řezu počítala co nejpodobnější oblast. Velikost ROI zůstávala napříč řezy zachována. Parametry pro počítání imunoreaktivních buněk v DG byly stejné jako parametry pro počítání buněk v SCN. Výsledný počet buněk u  $n = 1$  vždy představuje průměr 1 až 2 fotografií a levé a pravé hemisféry.



**Obrázek 7. Nastavení parametrů programu QuPath pro automatické počítání imunoreaktivních buněk c-FOS v DG.** Fotografie řezu mozku otevřená v programu QuPath, v pravém dolním rohu s měřítkem (délka úsečky představuje 100  $\mu\text{m}$ ), zobrazuje pravou hemisféru DG. Červený obdélník označuje zvolenou ROI. V pravém horním rohu se zobrazuje umístění výřezu fotografie na řezu celého mozku. Okno pro funkci *cell detection* v pravé části umožňuje zvolení parametrů pro automatické spočítání imunoreaktivních buněk. Imunoreaktivní buňky c-FOS vyhovující parametrům jsou automaticky označeny červeně. Počty těchto buněk uvnitř ROI v levém a pravém DG jsou zobrazeny na liště vlevo.

U protilátky BDNF neměl ROI definované a neměnné rozměry, ale byl svou šířkou vždy co nejvíce přizpůsoben vrstvě granulárních buněk DG (obr. 8). Protože se následně počítal poměr celkové plochy (v  $\mu\text{m}^2$ ) obarvené části (tak, jak byla určena jednotným *thresholdem*) vůči celkové ploše DG, bylo toto přizpůsobení rozměrů ROI pro zachování objektivity nezbytné, jelikož by u některých řezů hrozilo velké snížení výsledného poměru vlivem počítání celkové plochy DG i v oblastech mimo tuto vrstvu, které se přirozeně příliš nebarví. Výsledný poměr u  $n = 1$  představuje průměr poměrů 1 až 2 fotografií a levé a pravé hemisféry.



**Obrázek 8.** Ukázka počítání relativní density protilátky BDNF v DG v programu QuPath. Fotografie řezu mozku otevřená v programu QuPath, v pravém dolním rohu s měřítkem (délka úsečky představuje 250  $\mu\text{m}$ ), zobrazuje levou hemisféru hipokampu. Červený obdélník zobrazuje ROI velikostně přizpůsobenou horní části vrstvy granulárních buněk DG. Na liště vlevo lze vidět celkovou velikost žlutě označené oblasti ( $\text{Area } \mu\text{m}^2$ ) a velikost pozitivně obarvené části oblasti ( $\text{BDNF DG: Positive area } \mu\text{m}^2$ ).

#### 4.5 Záznam lokomoční aktivity

Pro účely záznamu lokomoční aktivity bylo použito 9 dospělých samců potkanů kmene Wistar (dodavatel Velaz, s.r.o) o hmotnostech 460–610 g. Tato zvířata byla umístěna samostatně do chovných boxů vybavených standardní podestýlkou. Nad každý chovný box byl nainstalován infračervený detektor Mini-Mitter VitalView (výrobce Starr, USA) schopný nepřetržitě snímat pohyb zvířete a ukládat záznam této jeho lokomoční aktivity v programu VitalView. Nainstalovaný detektor je ukázán na obrázku 9.



**Obrázek 9.** Nainstalovaný infračervený detektor pohybu Mini-Mitter VitalView schopný nepřetržitě snímat a ukládat lokomoční záznam zvířete. Potkan je samostatně umístěný v boxu vybaveném standardní podestýlkou s přístupem k jídlu a vodě ad libitum.

Zvířata byla nejprve chována ve standardních světelných podmínkách (LD 12:12). Osvětlení bylo zajištěné pásky LED umístěnými přímo nad chovnými boxy (intenzita světla okolo 30 luxů).

Po měsíci snímání lokomoční aktivity byly světelné podmínky změněny na DD a započal tzv. první běh pokusu. V CT14 téhož dne byl 4 zvířatům aplikován roztok ketaminu (40 mg/kg, i.p.), zatímco 5 zvířatům představujícím kontrolní skupinu byl stejným způsobem aplikován fyziologický roztok ve stejném objemu. Po hodině, tj. v CT 15, byla zvířata vystavena 15minutovému pulzu zajištěnému stropním osvětlením. Následně setrvala dalších 10 dní v DD podmínkách pro odečtení fázového posunu lokomoční aktivity.

Po těchto 10 dnech byl sběr dat ukončen, čímž se ukončil i první běh pokusu. Světelné podmínky potkanů byly změněny na LD (12:12) pro jejich re-synchronizaci se světelným cyklem. V těchto podmínkách setrvala zvířata dva týdny.

Po dvou týdnech započal nový sběr dat a tzv. druhý běh pokusu. Světelné podmínky zvířat byly opět změněny na DD. V těchto podmínkách setrvali potkani dva týdny, následně byl stažen záznam jejich lokomoční aktivity a pomocí analýzy v programu ClockLab (Actimetrics) byla určena jejich endogenní perioda. Na základě této periody byl odečten čas CT15 pro jednotlivá zvířata, načež byl v tomto čase 5 zvířatům aplikován roztok ketaminu

(40 mg/kg, i.p.) a 4 kontrolním zvířatům fyziologický roztok ve stejném objemu. Ketamin byl aplikován těm zvířatům, která se s ním v prvním běhu experimentu nesetkala. Po aplikaci byli potkani chováni v DD podmínkách po dobu 10 dní pro odečtení fázového posunu. Záznam lokomoční aktivity byl zpracováván v programu ClockLab.

#### 4.6 Statistická analýza

Statistická hypotéza byla formulována jako tzv. nulová hypotéza, tedy tvrzení, že mezi námi testovanými soubory neexistuje žádný rozdíl (resp. existuje nulový rozdíl). Na základě této hypotézy byla stanovena hladina významnosti  $\alpha$ , která vyjadřuje chybu prvního druhu – tedy zamítnutí nulové hypotézy, pokud platí. Tato hladina významnosti byla určena jako 0,05, čímž je vyjádřena 95% jistota, že jsme nulovou hypotézu zamítli správně (tzn. skutečně neplatila). Pro formulaci výsledků jsme využili označení  $p$ , které vyjadřuje tuto pravděpodobnost. Pokud  $p < 0,05$  ( $p < \alpha$ ), byly rozdíly mezi skupinami určeny jako statisticky významné; signifikantní.

Počty imunoreaktivních buněk a optická denzita protilátky BDNF získané z programu QuPath byly analyzovány testem jednofaktorové analýzy rozptylu (*one-way ANOVA*, zkratka vychází z anglického *ANalysis Of Variance*), který představuje nejvhodnější statistickou metodu pro porovnání rozptylu více souborů dat. ANOVA umožňuje zamítnout nulovou hypotézu, neříká však nic o tom, které konkrétní soubory dat se mezi sebou signifikantně liší. Pro tyto účely byl použit tzv. post-hoc test, který nejen zajistí mnohočetné porovnání (*multiple comparisons*) a určí rozdíly mezi jednotlivými skupinami, ale současně zavede korekci pro pravděpodobnost chyby prvního druhu, která se při mnohačetném porovnávání zvyšuje. Použitý byl Bonferroniho test, který je pro tyto účely nejběžněji užívaný, představující ve své podstatě sérii nepárových t-testů s korekcí pro mnohočetné porovnání.

Data získaná analýzou záznamů lokomoční aktivity v programu ClockLab byla statisticky vyhodnocena Studentovým t-testem, který představuje nejvhodnější statistickou metodu pro porovnání dvou souborů dat. Pro analýzu dat získaných z 1. běhu pokusu byl použit nepárový t-test pro porovnání kontrolní skupiny zvířat a zvířat s aplikovaným ketaminem. Při analýze dat z 2. běhu pokusu byl také použit nepárový t-test pro porovnání kontrolní skupiny zvířat a zvířat s aplikovaným ketaminem, avšak párový t-test pro porovnání jedné skupiny zvířat před a po aplikaci roztoků. Ve takovém případě se totiž jednalo o jeden výběrový soubor (ta stejná zvířata) podrobený dvěma měřeními (před a po) – získané hodnoty tedy při porovnávání tvoří páry.

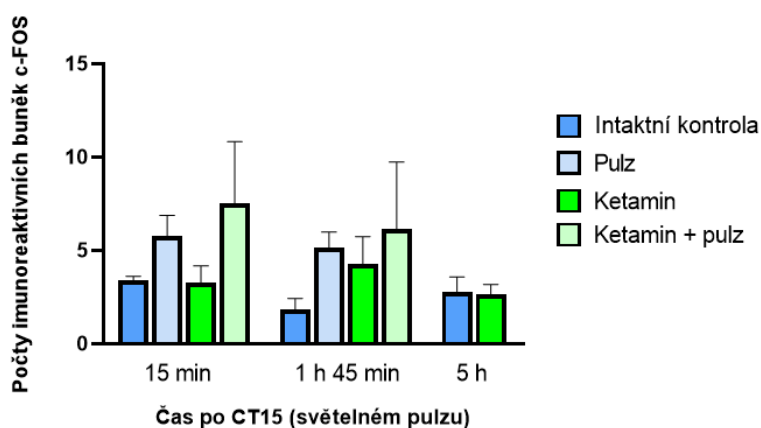
## 5. Výsledky

### 5.1 Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu c-FOS

#### 5.1.1 Indukce c-FOS v SCN

Počty imunoreaktivních buněk c-FOS se v obou částech SCN pohybovaly v řádu nižších desítek.

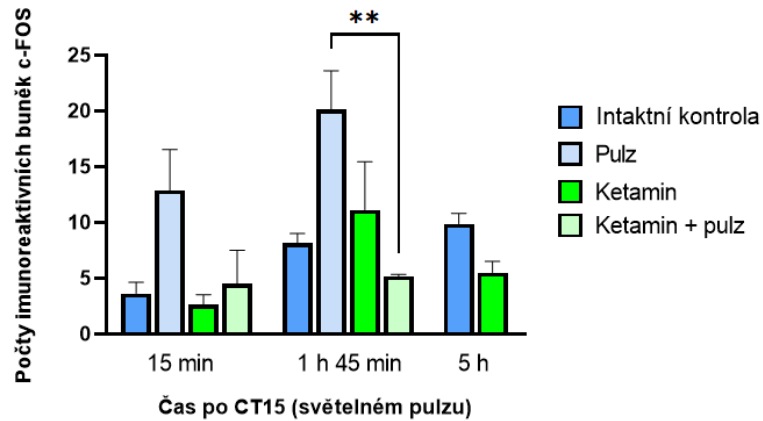
V části DMSCN nebyla testem jednofaktorová ANOVA zamítnuta nulová hypotéza ( $p = 0,4679$ ). Ačkoliv se zdá, že se počet imunoreaktivních buněk v čase 15 min po pulzu u obou pulzovaných skupin zvýšil oproti jejich nepulzovaným protějškům (obr. 10), Bonferroniho test mnohočetného porovnávání neodhalil žádné statisticky významné rozdíly mezi experimentálními skupinami ( $p < 0,9999$  u všech porovnávaných skupin).



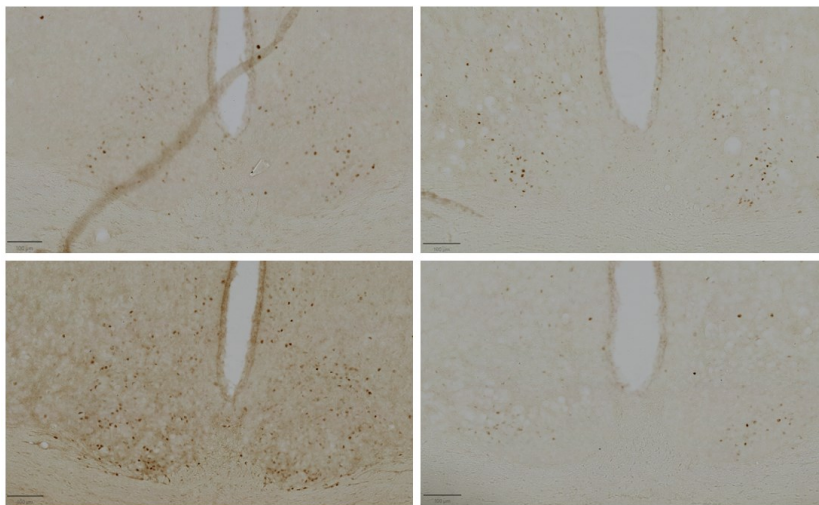
**Obrázek 10. Počty imunoreaktivních buněk c-FOS v DMSCN.** Hladina proteinu c-FOS byla určena v časech 15 min, 1 h 45 min a 5 h po světelném pulzu v CT15, u nepulzovaných zvířat v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3–4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena jednofaktorovou ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem.

V části VLSCN byla situace odlišná. Testem jednofaktorová ANOVA zde byla s vysokou signifikancí zamítnuta nulová hypotéza ( $p = 0,0008$ ). Již v prvním časovém bodě je mezi skupinou intaktních kontrol a pulzovaných kontrol pozorován rozdíl – indukce c-FOS je u pulzovaných kontrol zvýšená, ačkoliv nesignifikantně ( $p = 0,2016$ ; obr. 11). V následujícím časovém bodě (1 h 45 min po CT15) tento rozdíl vzroste téměř na hranici signifikance (zvýšení indukce c-FOS u pulzovaných kontrol oproti nepulzovaným  $p = 0,0552$ ). U pulzovaných zvířat s aplikovaným ketaminem však tento nárůst pozorován není, v tomto čase oproti pulzovaným

kontrolám vykazují statisticky velmi významné snížení indukce c-FOS ( $p = 0,0068$ ). Rozdíly mezi experimentálními skupinami v časovém bodě 1 h 45 min po CT15 dobře ilustrují reprezentativní mikrofotografie na obrázku 12.



**Obrázek 11. Počty imunoreaktivních buněk c-FOS ve VLSCN.** Hladina proteinu c-FOS byla určena v časech 15 min, 1 h 45 min a 5 h světelném pulzu v CT15, u nepulzovaných zvířat v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3–4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena jednofaktorovou ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem; \*\* představuje signifikanci  $p < 0,01$ .

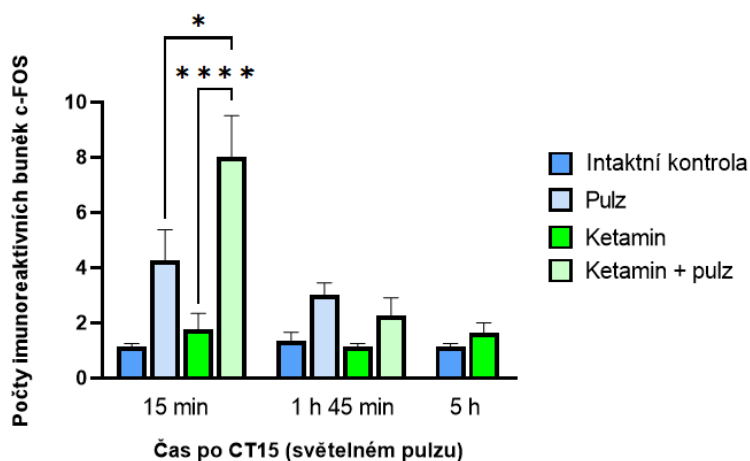


**Obrázek 12. Reprezentativní mikrofotografie imunoreaktivních buněk c-FOS v SCN z časového bodu 1 h 45 min po CT15.** Úsečka v levém dolním rohu každé mikrofotografie reprezentuje 100  $\mu$ m. Levá horní mikrofotografie zobrazuje SCN intaktní kontroly. Pravá horní mikrofotografie zobrazuje SCN zvířete s aplikovaným ketaminem. Levá dolní mikrofotografie zobrazuje SCN pulzované kontroly. Pravá dolní mikrofotografie zobrazuje SCN pulzovaného zvíře s aplikovaným ketaminem.

### 5.1.2 Indukce c-FOS v DG

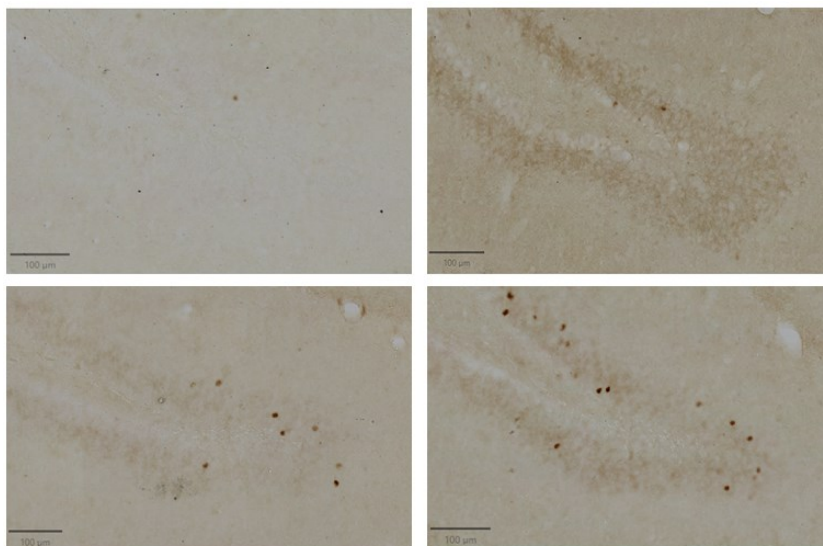
Testem jednofaktorová ANOVA byla u indukce c-FOS v DG s nejvyšší signifikancí ( $p < 0,0001$ ) zamítnuta nulová hypotéza. Podobně, jako tomu bylo ve VLSCN, i zde pulz způsobil výrazný, ač nesignifikantní nárůst počtu imunoreaktivních buněk c-FOS u pulzovaných kontrolních zvířat oproti nepulzovaným kontrolním zvířatům ( $p = 0,0667$  v čase 15 min po CT15; obr. 13). Zvýšení indukce c-FOS u pulzovaných zvířat s aplikovaným ketaminem bylo však ve srovnání s pulzovanými kontrolami signifikantně vyšší ( $p = 0,0130$ ). Co víc, toto zvýšení bylo v prvním časovém bodě extrémně vyšší v porovnání se skupinou nepulzovaných zvířat s aplikovaným ketaminem ( $p < 0,0001$ ). Tyto rozdíly dobře ilustrují také reprezentativní mikrofotografie na obrázku 14.

V následujícím časovém bodě již nebyla zvýšená indukce c-FOS u pulzovaných zvířat s aplikovaným ketaminem zaznamenána (průměrný počet imunoreaktivních buněk c-FOS u skupiny zvířat „ketamin + pulz“ je v čase 1 h 45 min po CT15 výrazně nižší oproti téže skupině v čase 15 min po CT15;  $p < 0,0001$ ).



**Obrázek 13. Počty imunoreaktivních buněk c-FOS v DG.** Hladina proteinu c-FOS byla určena v časech 15 min, 1 h 45 min a 5 h po světelném pulzu v CT15, u nepulzovaných zvířat v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3–4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena jednofaktorovou ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem; \* představuje signifikanci  $p < 0,05$ ; \*\*\*\* představuje signifikanci  $p < 0,0001$ .





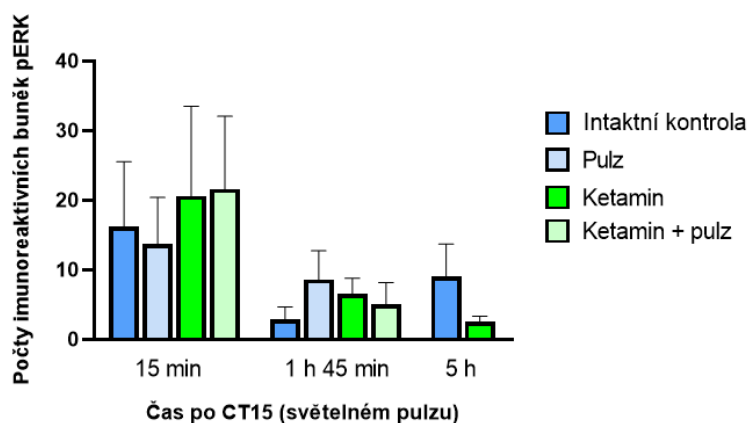
**Obrázek 14. Reprezentativní mikrofotografie imunoreaktivních buněk c-FOSv DG z časového bodu 15 min po CT15.** Úsečka v levém dolním rohu každé mikrofotografie reprezentuje 100 µm. Levá horní mikrofotografie zobrazuje DG intaktní kontroly. Pravá horní mikrofotografie zobrazuje DG zvířete s aplikovaným ketaminem. Levá dolní mikrofotografie zobrazuje DG pulzované kontroly. Pravá dolní mikrofotografie zobrazuje DG pulzovaného zvířete s aplikovaným ketaminem.

## 5.2 Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu pERK

### 5.2.1 Indukce pERK v SCN

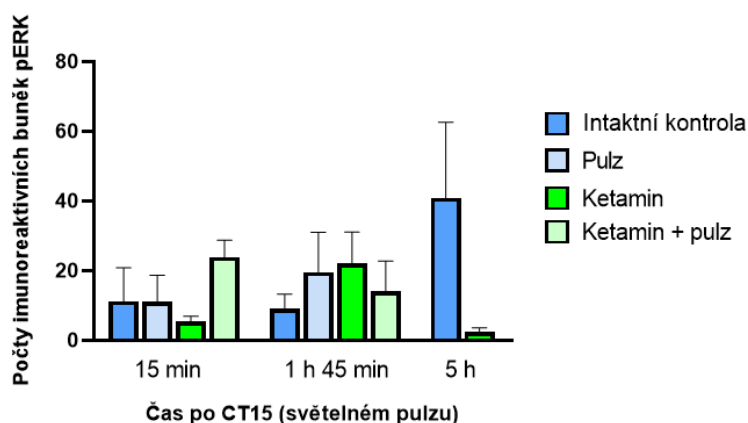
Indukce fosforylované formy kinázy pERK se v obou částech SCN pohybovala v řádu nižších desítek imunoreaktivních buněk.

V části DMSCN nebyla testem jednofaktorové ANOVA zamítnuta nulová hypotéza ( $p = 0,5548$ ). Bonferroniho post-hoc testem nebyly mezi experimentálními skupinami napříč časovými body odhaleny žádné rozdíly ( $p < 0,9999$  u všech porovnávaných skupin; obr. 15).

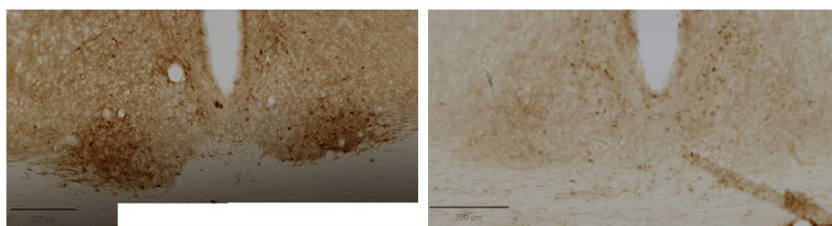


**Obrázek 15. Počty imunoreaktivních buněk pERK v DMSCN.** Hladina fosforylované kinázy pERK byla určena v časech 15 min, 1 h 45 min a 5 h po světelném pulzu v CT15, u nepulzovaných zvířat v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3–4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena jednofaktorovou ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem.

V části VLSCN byla situace velmi podobná. Analýza testem jednofaktorová ANOVA neumožnila zamítnout nulovou hypotézu ( $p = 0,3552$ ). Nejvyšší, ač nesignifikantní rozdíl byl zaznamenán mezi intaktní kontrolou a zvířaty s aplikovaným ketaminem v čase 5 h po CT15 ( $p = 0,279$ ; obr. 16). Tento rozdíl je však způsoben především dvěma vysokými hodnotami (ze čtyř celkových hodnot) v kontrolní skupině tohoto času. Silně obarvené VLSCN v tomto časovém bodě u jedné z intaktních kontrol ve srovnání se zvířetem s aplikovaným ketaminem lépe ilustrují reprezentativní mikrofotografie na obrázku 17.



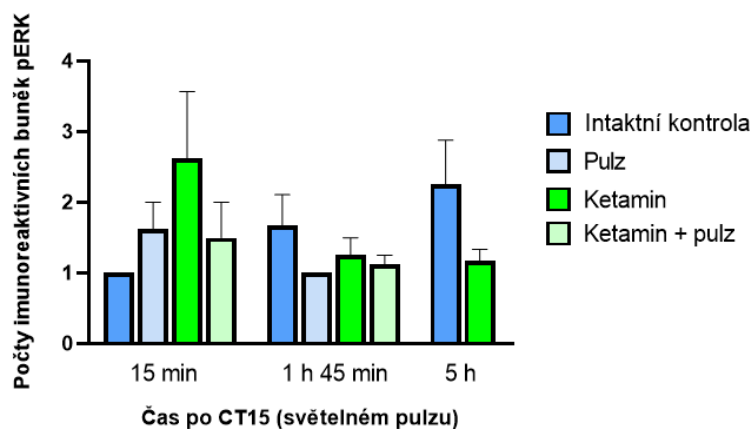
**Obrázek 16. Počty imunoreaktivních buněk pERK ve VLSCN.** Hladina fosforylované kinázy pERK byla určena v časech 15 min, 1 h 45 min a 5 h po světelném pulzu v CT15, u nepulzovaných zvířat v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3–4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena jednofaktorovou ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem.



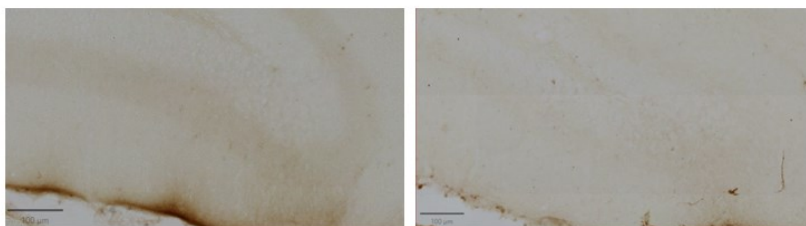
**Obrázek 17. Reprezentativní mikrofotografie imunoreaktivních buněk pERK v SCN z časového bodu 5 h po CT15.** Úsečka v levém dolním rohu každé mikrofotografie reprezentuje 200  $\mu\text{m}$ . Levá mikrofotografie zobrazuje jednu z intaktních kontrol se silně obarveným VLSCN. Pravá mikrofotografie zobrazuje SCN zvířete s aplikovaným ketaminem.

### 5.2.2 Indukce pERK v DG

Počet imunoreaktivních buněk pERK v DG byl oproti oběma částem SCN všeobecně nízký a pohyboval se v nižších jednotkách (obr. 18 a obr. 19). Ani zde nebyly nalezeny žádné významné rozdíly mezi experimentálními skupinami. Nejvyšší rozdíl ( $p = 0,3150$ ) byl pozorován mezi intaktní kontrolou a skupinou zvířat s aplikovaným ketaminem, a to v čase 15 min po světelném pulsu.



**Obrázek 18. Počty imunoreaktivních buněk pERK v DG.** Hladina fosforylované kinázy pERK byla určena v časech 15 min, 1 h 45 min a 5 h po světelném pulsu v CT15, u nepulzovaných zvířat v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3–4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena jednofaktorovou ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem.



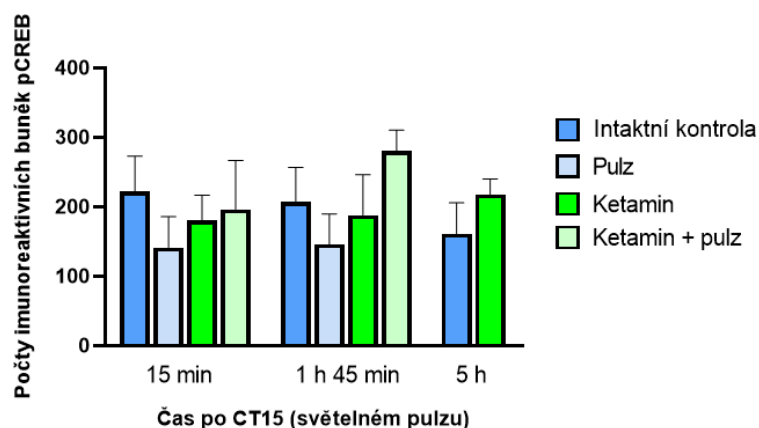
**Obrázek 19. Reprezentativní mikrofotografie indukce pERK v DG z časového bodu 1 h a 45 min po CT15.** Úsečka v levém dolním rohu každé mikrofotografie reprezentuje 100  $\mu\text{m}$ . Levá horní mikrofotografie zobrazuje DG intaktní kontroly. Pravá mikrofotografie zobrazuje DG zvířete s aplikovaným ketaminem. Indukce pERK v DG byla napříč experimentálními skupinami všeobecně nízká.

### 5.3 Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu pCREB

#### 5.3.1 Indukce pCREB v SCN

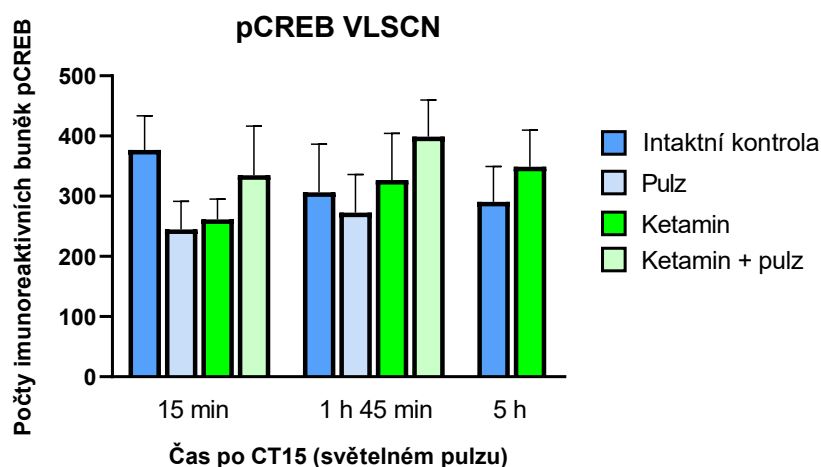
Hladina fosforylované formy proteinu CREB byla v obou částech SCN ve všech časových bodech vysoká – průměrné hodnoty se pohybovaly ve stovkách imunoreaktivních buněk. Obarvení řezů ilustrují reprezentativní fotografie na obrázku 22.

V DMSCN nebylo možné testem ANOVA zamítnout nulovou hypotézu ( $p = 0,6192$ ). Mezi experimentálními skupinami nebyly nalezeny signifikantně významné rozdíly (obr. 20). Největší rozdíl ( $p = 0,8208$ ) byl zaznamenán mezi skupinou kontrolních pulzovaných zvířat vystavených pulzu a skupinou pulzovanou zvířat s aplikovaným ketaminem, a to v časovém bodě 1 h 45 minut po CT15.

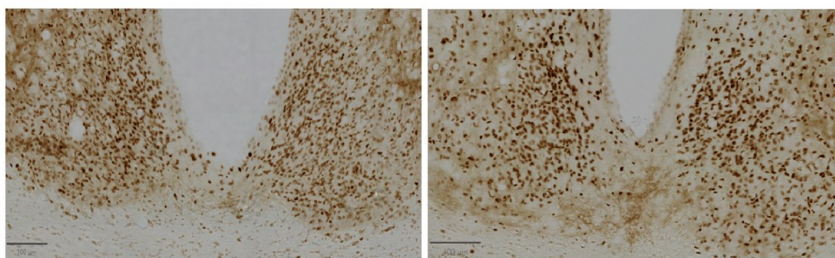


**Obrázek 20. Počty imunoreaktivních buněk pCREB v DMSCN.** Hladina fosforylované formy proteinu CREB byla určena v časech 15 min, 1 h 45 min a 5 h po světelném pulzu v CT15, u nepulzovaných zvířat v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3–4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena jednofaktorovou ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem.

Ve VLSCN byla situace podobná jako v DMSCN. Celková hladina pCREB byla velmi vysoká a nebylo možné zamítnout nulovou hypotézu ( $p = 0,7420$ ). Bonferroniho post-hoc testem nebyly mezi experimentálními skupinami napříč časovými body odhaleny žádné rozdíly ( $p < 0,9999$  u všech porovnávaných skupin; obr. 21).



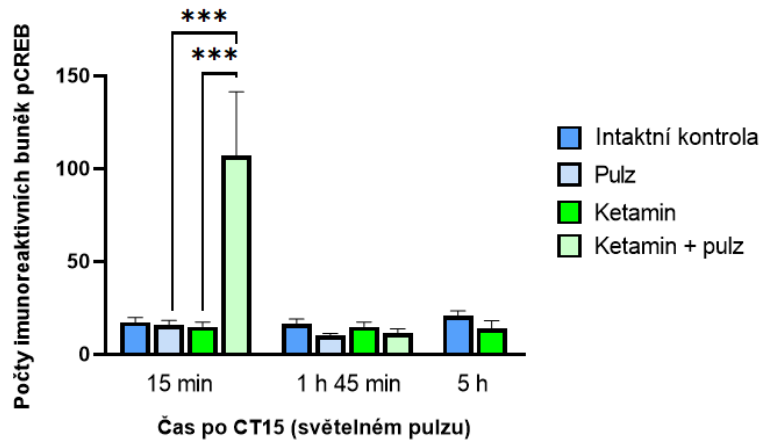
**Obrázek 21. Počty imunoreaktivních buněk pCREB ve VLSCN.** Hladina fosforylované formy proteinu CREB byla určena v časech 15 min, 1 h 45 min a 5 h po světelném pulzu v CT15, u nepulzovaných zvířat v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3–4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena jednofaktorovou ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem.



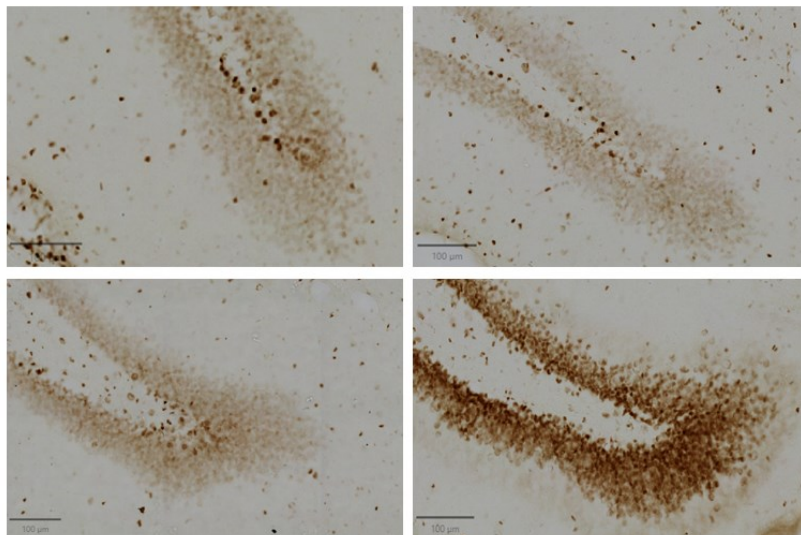
**Obrázek 22. Reprezentativní mikrofotografie imunoreaktivních buněk pCREB v SCN z časového bodu 1 h a 45 min po CT15. Úsečka v levém dolním rohu každé mikrofotografie reprezentuje 100  $\mu$ m. Levá mikrofotografie zobrazuje SCN kontrolního zvířete vystaveného pulzu. Pravá mikrofotografie zobrazuje SCN zvířete s aplikovaným ketaminem a vystaveného pulzu.**

### 5.3.2 Indukce pCREB v DG

V hipokampu byla indukce fosforylované formy proteinu CREB všeobecně nižší než v SCN. Test jednofaktorová ANOVA zde však s vysokou signifikancí zamítnul nulovou hypotézu ( $p = 0,0002$ ). Průměrný počet pCREB indukovaných buněk u pulzovaných zvířat s aplikovaným ketaminem v čase 15 min po pulzu je oproti ostatním experimentálním skupinám velmi vysoký a představuje 107 buněk (průměry ostatních skupin se pohybují v rozpětí přibližně 10–20 buněk; obr. 23 a obr. 24). Nárůst počtu indukovaných buněk u pulzovaných zvířat s aplikovaným ketaminem je signifikantní oproti pulzované kontrole ( $p = 0,0006$ ) i oproti zvířatům, kterým byl aplikován ketamin, ale nebyla vystavena pulzu ( $p = 0,0002$ ). Bonferroniho post-hoc testem nebyly mezi ostatními experimentálními skupinami napříč časovými body odhaleny žádné rozdíly ( $p < 0,9999$  u všech ostatních porovnávaných skupin).



**Obrázek 23. Počty imunoreaktivních buněk pCREB v DG.** Hladina fosforylované formy proteinu CREB byla určena v časech 15 min, 1 h 45 min a 5 h po světelném pulzu v CT15, u nepulzovaných zvířat v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3–4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena jednofaktorovou ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem; \*\*\* představuje signifikanci  $p < 0,001$ .



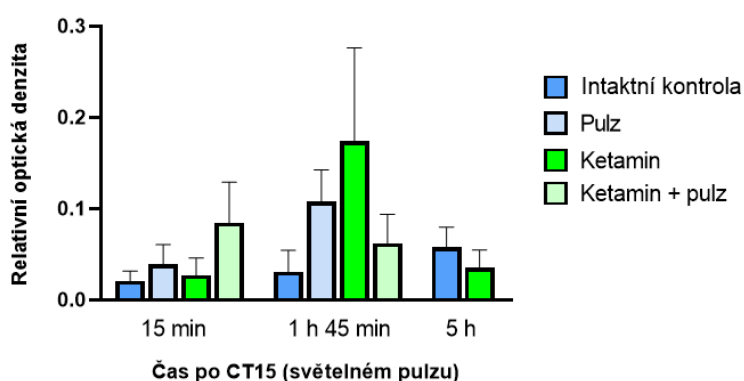
**Obrázek 24. Reprezentativní mikrofotografie imunoreaktivních buněk pCREB v DG z časového bodu 15 min po CT15.** Úsečka v levém dolním rohu každé mikrofotografie reprezentuje 100  $\mu$ m. Levá horní mikrofotografie zobrazuje DG intaktní kontroly. Pravá horní mikrofotografie zobrazuje DG zvířete s aplikovaným ketaminem. Levá dolní mikrofotografie zobrazuje DG pulzované kontroly. Pravá dolní mikrofotografie zobrazuje DG pulzovaného zvíře s aplikovaným ketaminem.

## 5.4 Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu BDNF

U protilátky proti proteinu BDNF nebylo kvůli způsobu obarvení řezů možné počítat jednotlivé imunoreaktivní buňky. Byla proto měřena relativní optická denzita, která nabývá hodnot od 0 (oblast nevykazující žádné známky navázané protilátky, neobarvená) do 1 (protilátka je v maximální míře přítomna v celé oblasti).

### 5.4.1 Indukce BDNF v SCN

Při porovnávání indukce BDNF v DMSCN nebylo testem jednofaktorová ANOVA možné zamítnout nulovou hypotézu ( $p = 0,2876$ ; obr. 25). Největší, avšak stále nesignifikantní ( $p = 0,5436$ ) rozdíl mezi skupinami byl pozorován mezi intaktními kontrolami a nepulzovanými zvířaty s aplikovaným ketaminem v čase 1 h 45 min po CT15 (tato skupina ostatně vykazuje zajímavé zvýšení i oproti stejné experimentální skupině v předchozím časovém bodě,  $p = 0,3122$ ).

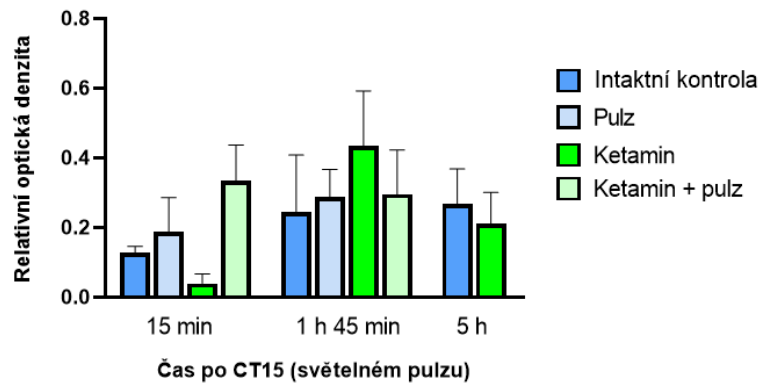


**Obrázek 25. Relativní optická denzita BDNF v DMSCN.** Výše relativní optické denzity BDNF byla určena v časech 15 min, 1 h 45 min a 5 h po světelném pulzu v CT15, u nepulzovaných zvířat v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3–4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena jednofaktorovou ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem.

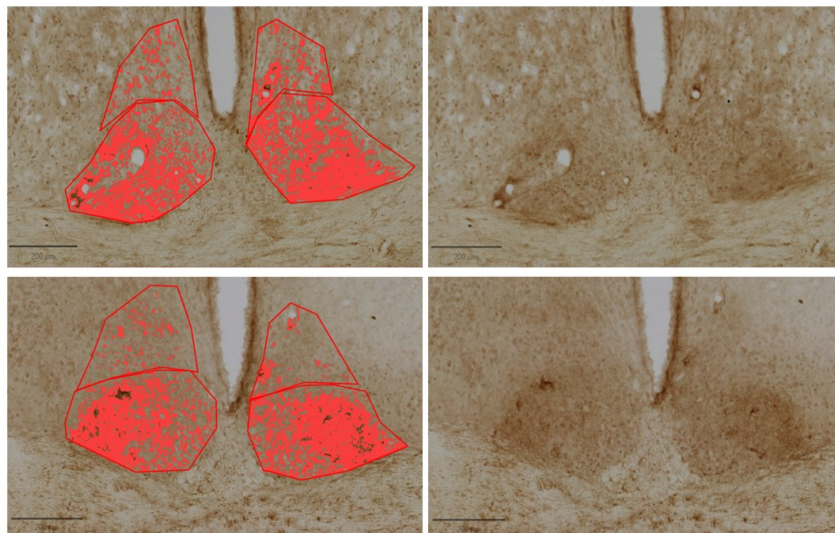
V části VLSCN byla relativní optická denzita BDNF všeobecně vyšší než v DMSCN, jak lépe zobrazují reprezentativní mikrofotografie na obrázku 27. Ani zde však nebylo možné testem jednofaktorová ANOVA zamítnout nulovou hypotézu ( $p = 0,4456$ ; obr. 26). Zajímavé, avšak nesignifikantní ( $p = 0,3156$ ) je zvýšení relativní optické denzity u zvířat s aplikovaným ketaminem v bodě 1 h 45 min po CT15 oproti předchozímu časovému bodu, které koresponduje



se stejnou situací v DMSCN. Bonferroniho post-hoc testem nebyly mezi ostatními experimentálními skupinami napříč časovými body odhaleny žádné rozdíly ( $p < 0,9999$  u všech ostatních skupin).



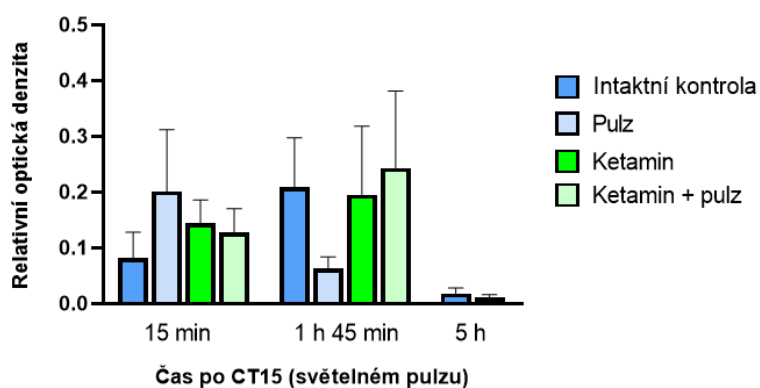
**Obrázek 26. Relativní optická denzita BDNF ve VLSCN.** Výše relativní optické denzity BDNF byla určena v časech 15 min, 1 h 45 min a 5 h po světelném pulzu v CT15, u nepulzovaných zvířat v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3–4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena jednofaktorovou ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem.



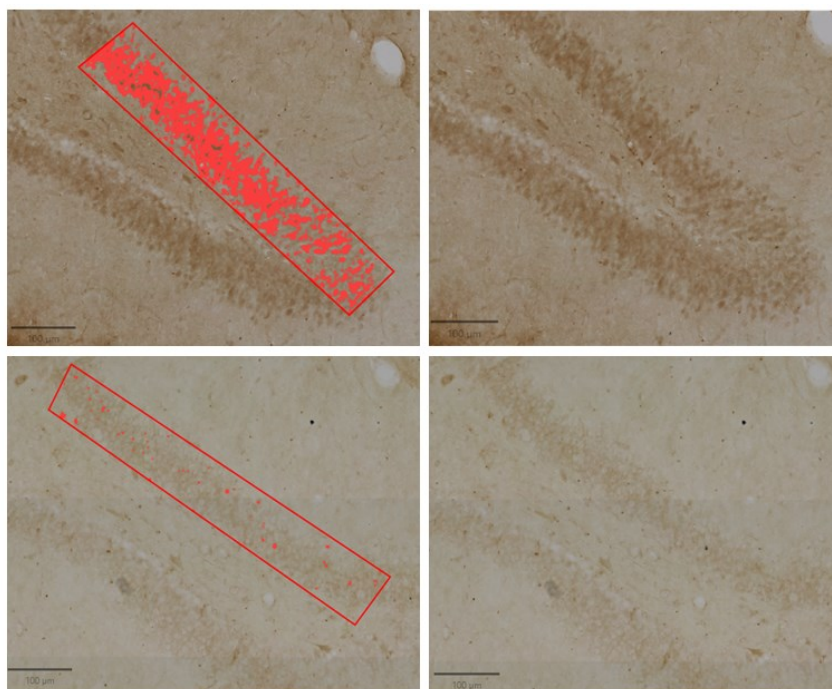
**Obrázek 27. Reprezentativní mikrofotografie optické denzity proteinu BDNF z časového bodu 1 h 45 min po CT15.** Úsečka v levém dolním rohu každé mikrofotografie reprezentuje 200  $\mu$ m. Červené obrysy rozdělují VLSCN a DMSCN. Červeně jsou vyznačeny oblasti, které thresholder určil jako pozitivní. Horní mikrofotografie zobrazují SCN intaktní kontroly, dolní mikrofotografie zobrazují SCN zvířete s aplikovaným ketaminem. Je patrné, že VLSCN všeobecně vykazují nižší relativní optickou denzitu BDNF než DMSCN.

#### 5.4.2 Indukce BDNF v DG

U indukce BDNF v DG nebyla jednofaktorovou ANOVA zamítnuta nulová hypotéza ( $p = 0,5204$ ; obr. 28). Bonferroniho post-hoc testem nebyly mezi experimentálními skupinami napříč časovými body odhaleny statisticky významné rozdíly ( $p < 0,9999$  u všech porovnávaných skupin). Zajímavé je, že průměrná hodnota relativní optické denzity BDNF byla v časovém bodě 5 h po CT15 u obou studovaných skupin řádově nižší (přibližně 0,018 u intaktních kontrol a 0,012 u zvířat s aplikovaným ketaminem) než tomu bylo u odpovídajících experimentálních skupin předchozího časového bodu (přibližně 0,21 u intaktních kontrol a 0,2 u zvířat s aplikovaným ketaminem). Tento výrazný (ač statisticky nevýznamný) rozdíl dobře ilustrují reprezentativní fotografie na obrázku 29.



**Obrázek 28. Relativní optická denzita BDNF v DG.** Výše relativní optické denzity BDNF byla určena v časech 15 min, 1 h 45 min a 5 h po světelném pulzu v CT15, u nepulzovaných zvířat v odpovídajících časech. Každý sloupec představuje průměr 3–4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena jednofaktorovou ANOVA s Bonferroniho post-hoc testem.



**Obrázek 29. Reprezentativní mikrofotografie porovnávající relativní optickou denzitu BDNF v DG u inaktivních kontrol v časovém bodě 1 h 45 min a 5 h po CT15. Úsečka v levém dolním rohu každé mikrofotografie reprezentuje 100 µm. Červený obdélník značí ROI, červeně jsou uvnitř ROI vyznačeny oblasti, které thresholder určil jako pozitivní. Horní mikrofotografie zobrazují DG intaktní kontroly v čase 1 h 45 min po CT15. Dolní mikrofotografie zobrazují DG intaktní kontroly v čase 5 h po CT15.**

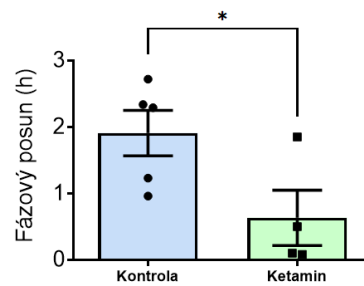
### 5.5 Vliv subanestetické dávky ketaminu na lokomoční aktivitu potkanů v kombinaci se světelným pulzem (1. běh experimentu)

Lokomoční aktivita představuje dobře pozorovatelný behaviorální výstup aktivity cirkadiálního systému. Její dlouhodobé měření proto poskytuje dobré informace o změnách v tomto systému.

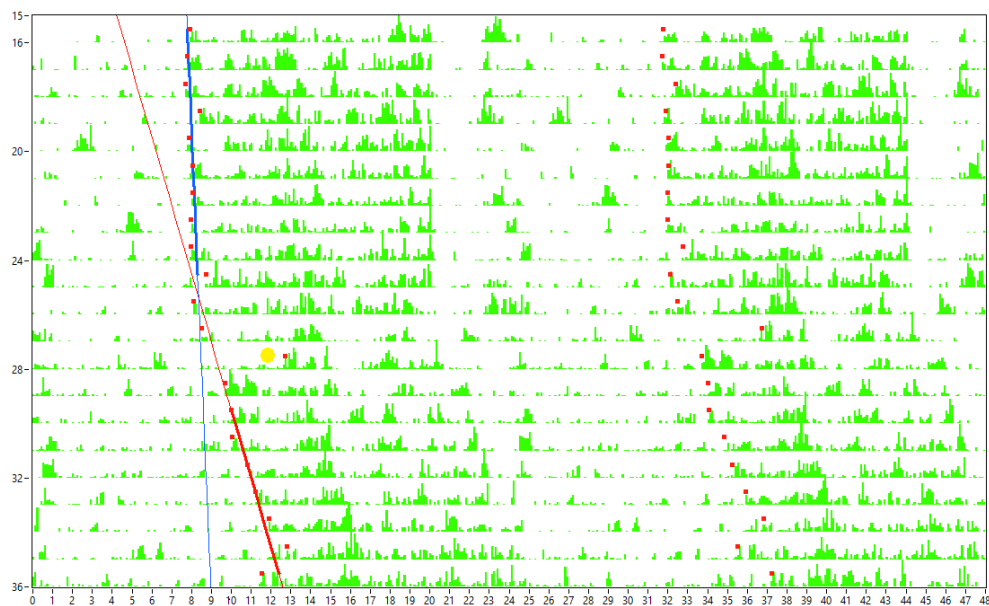
První běh experimentu s měřením lokomoční aktivity probíhal u zvířat, která byla v čase CT15, tedy na počátku subjektivní noci, vystavena 15minutovému světelnému pulzu.

Vystavení světelnému pulzu indukovalo u 5 kontrolních zvířat průměrné fázové zpoždění lokomoční aktivity okolo 1,9 hodiny (obr. 30). U 4 zvířat, kterým byla v CT14 aplikována subanestetická dávka ketaminu (40 mg/kg i.p.), představovalo toto zpoždění průměrně přibližně 0,6 hodiny. Nepárovým t-testem byla zamítnuta nulová hypotéza, fázové zpoždění u zvířat vystavených ketaminu bylo vyhodnoceno jako signifikantně nižší ( $p = 0,0483$ ) oproti kontrolním zvířatům. Rozdíl ve velikosti fázového posunu lokomoční

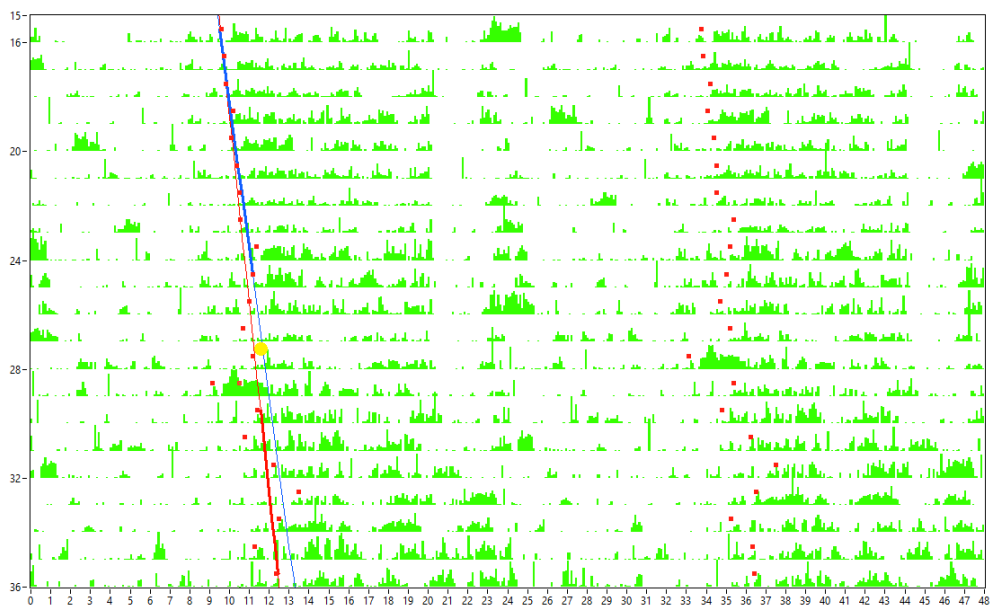
aktivity je dobře ilustrován také reprezentativními aktogramy kontrolního potkana (obr. 31) a potkana s předcházející aplikací ketaminu (obr. 32).



**Obrázek 30. Velikost fázového posunu u potkanů prvního běhu experimentu po vystavení 15minutovému světelnému pulzu v čase CT15.** Sloupec kontrolních zvířat představuje průměr 5 hodnot  $\pm$  SEM, sloupec zvířat s aplikací ketaminu představuje průměr 4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena nepárovým t-testem; \* představuje signifikanci  $p < 0,05$ .

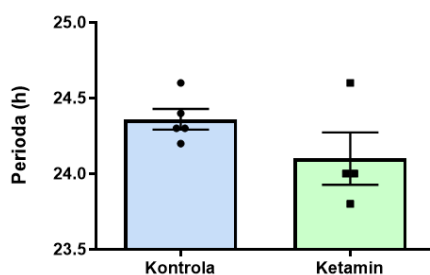


**Obrázek 31. Reprezentativní aktogram kontrolního potkana ukazující fázový posun lokomoční aktivity po vystavení světelnému pulzu.** Každý řádek reprezentuje záznam ze dvou dnů, spodní osa je rozdělená na hodiny. Zelené značení zaznamenává lokomoční aktivitu, červené čtverečky značí počátky aktivní fáze. Modrá linie spojuje začátky aktivní fáze v LD režimu. Žluté kolečko značí světelný pulz v CT15. Červená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu po světelném pulzu. Úhel, který mezi sebou modrá a červená linie svírají, značí fázový posun (h).



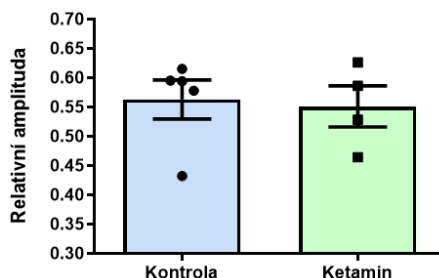
**Obrázek 32. Reprezentativní aktogram potkana s aplikací ketaminu ukazující fázový posun lokomoční aktivity po vystavení světelnému pulzu.** Každý řádek reprezentuje záznam ze dvou dnů, spodní osa je rozdělená na hodiny. Zelené značení zaznamenává lokomoční aktivitu, červené čtverečky značí počátky aktivní fáze. Modrá linie spojuje začátky aktivní fáze v LD režimu. Žluté kolečko značí světelný pulz v CT15, kterému předcházela aplikace ketaminu v CT14. Červená linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu po světelném pulzu. Úhel, který mezi sebou modrá a červená linie svírají, značí fázový posun (h).

Aplikace ketaminu také u zvířat vyvolala snížení délky endogenní periody oproti kontrolním zvířatům (obr. 33), které však nebylo nepárovým t-testem vyhodnoceno jako signifikantní ( $p = 0,1710$ ). Průměrná délka periody kontrolních zvířat byla 24,36 hodin, u zvířat vystavených ketaminu to bylo pouze 24,1 hodin.



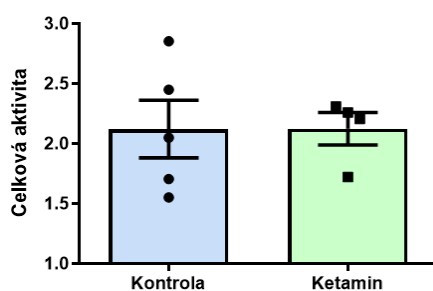
**Obrázek 33. Délka endogenní periody u potkanů prvního běhu experimentu.** Sloupec kontrolních zvířat představuje průměr 5 hodnot  $\pm$  SEM, sloupec zvířat s aplikací ketaminu představuje průměr 4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena nepárovým t-testem.

Dalším ze sledovaných parametrů u dlouhodobého záznamu lokomoční aktivity byla relativní amplituda. Relativní amplituda reprezentuje rozložení celkové aktivity v rámci dne. Nabývá hodnot 0 (kdy je nemožné rozlišit mezi aktivní a klidovou fází dne) až 1 (kdy lze toto období zcela zřetelně oddělit). Hodnoty relativní amplitudy se mezi skupinami zvířat prvního běhu takřka nelišily (obr. 34), nepárovým t-testem nebylo možné zamítnout nulovou hypotézu ( $p = 0,8158$ ). Průměrná hodnota relativní amplitudy byla přibližně 0,56 u kontrolní skupiny zvířat a 0,55 u skupiny zvířat s aplikovaným ketaminem.



**Obrázek 34. Hodnoty relativní amplitudy u potkanů prvního běhu experimentu.** Sloupec kontrolních zvířat představuje průměr 5 hodnot  $\pm$  SEM, sloupec zvířat s aplikací ketaminu představuje průměr 4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena nepárovým t-testem.

Sledována byla také celková aktivita zvířat zaznamenaná lokomočním snímačem, která se udává v relativních jednotkách. Podobně, jako tomu bylo u relativní amplitudy, ani zde nebylo nepárovým t-testem možné zamítnout nulovou hypotézu – celková aktivita se mezi experimentálními skupinami takřka nelišila ( $p = 0,9940$ ; obr. 35).

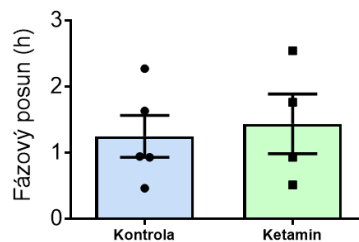


**Obrázek 35. Celková aktivita potkanů prvního běhu experimentu vyjádřená v relativních jednotkách.** Sloupec kontrolních zvířat představuje průměr 5 hodnot  $\pm$  SEM, sloupec zvířat s aplikací ketaminu představuje průměr 4 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena nepárovým t-testem.

## 5.6 Vliv subanestetické dávky ketaminu na lokomoční aktivitu potkanů v režimu DD (2. běh experimentu)

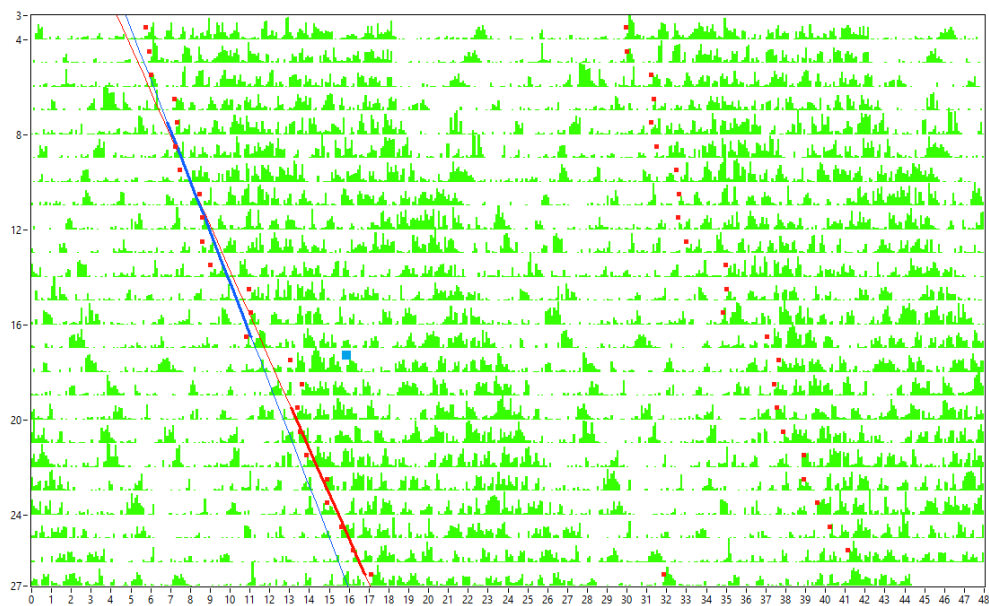
Ve druhém běhu experimentu jsme se zaměřili na samotný vliv ketaminu na rytmus v lokomoční aktivitě potkanů. Zvířata setrvala v DD režimu tak dlouho, aby bylo možné určit jejich subjektivní čas CT15 (tedy první část jejich subjektivní noci). V tomto čase byla následně pěti potkanům aplikována subanestetická dávka ketaminu (40 mg/kg i.p.). Čtyři potkani představovali kontrolní skupinu. Zvířata byla nadále udržována v DD pro záznam jejich volného běhu.

Samotná manipulace se zvířaty v čase CT15 způsobila fázový posun (obr. 36). Tento fázový posun však nebyl nepárovým t-testem vyhodnocen jako statisticky významný ( $p = 0,7360$ ). Průměrný fázový posun u skupiny kontrolních zvířat představoval přibližně 0,94 h, u skupiny zvířat s aplikovaným ketaminem to bylo přibližně 0,80 h. Velikost fázového posunu ilustrují také reprezentativní aktogramy kontrolního potkana (obr. 37) a potkana s aplikovaným ketaminem (obr. 38).

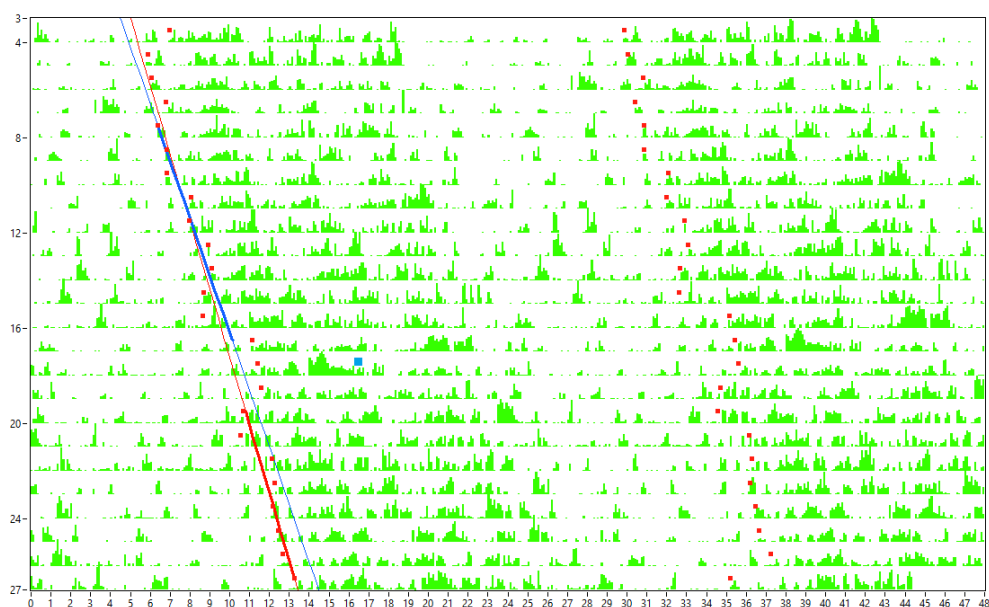


**Obrázek 36. Velikost fázového posunu u potkanů druhého běhu po aplikaci ketaminu v CT15.**

Sloupec kontrolních zvířat představuje průměr 4 hodnot  $\pm$  SEM, sloupec zvířat s aplikací ketaminu představuje průměr 5 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza byla provedena nepárovým t-testem.



**Obrázek 37. Reprezentativní aktogram kontrolního potkana ukazující fázový posun lokomoční aktivity po aplikaci fyziologického roztoku.** Každý řádek reprezentuje záznam ze dvou dnů, spodní osa je rozdělená na hodiny. Zelené značení zaznamenává lokomoční aktivitu, červené čtverečky značí počátky aktivní fáze. Modrá linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu. Modrý čtverec značí aplikaci fyziologického roztoku v CT15. Červená linie spojuje začátky aktivní fáze po aplikaci roztoku. Úhel, který mezi sebou modrá a červená linie svírají, značí fázový posun (h).

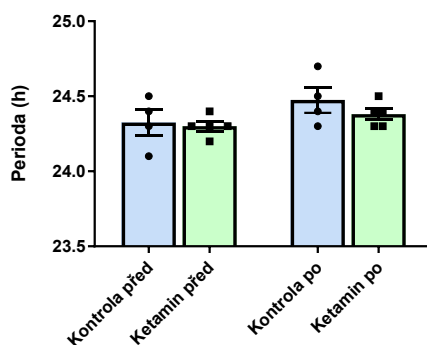


**Obrázek 38. Reprezentativní aktogram potkana ukazující fázový posun lokomoční aktivity po aplikaci ketaminu.** Každý řádek reprezentuje záznam ze dvou dnů, spodní osa je rozdělená na hodiny. Zelené značení zaznamenává lokomoční aktivitu, červené čtverečky značí počátky aktivní fáze. Modrá linie spojuje začátky aktivní fáze v DD režimu. Modrý čtverec značí aplikaci ketaminu v CT15.



Červená linie spojuje začátky aktivní fáze po aplikaci roztoku. Úhel, který mezi sebou modrá a červená linie svírají, značí fázový posun (h).

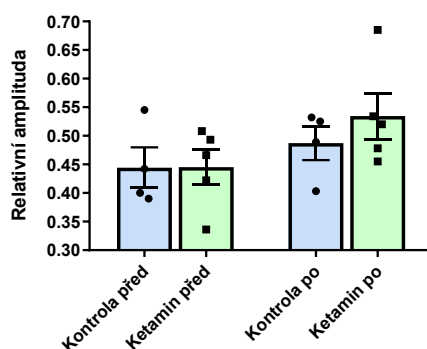
Veškeré další parametry lokomoční aktivity byly zaznamenány před a po aplikaci ketaminu. Neparametrický t-test neodhalil signifikantní rozdíl mezi délkou endogenní periody experimentálních skupin, a to ani před aplikací roztoků ( $p = 0,7724$ ), ani po ní ( $p = 0,3067$ ), jak ukazuje graf na obrázku 39. Zajímavé však je, že zatímco parametrický t-test srovnávající endogenní periodu čtyř kontrolních zvířat před aplikací fyziologického roztoku a po něm prokázal prodloužení této periody takřka na hranici signifikance ( $p = 0,0577$ ), parametrický t-test srovnávající pět zvířat před a po aplikaci ketaminu byl zcela nesignifikantní ( $p = 0,2420$ ). U kontrolních zvířat tedy došlo k nesignifikantně většímu prodloužení periody než u zvířat s aplikovaným ketaminem. Průměrná délka endogenní periody u kontrolních zvířat byla 24,33 h před aplikací fyziologického roztoku a 24,48 h po něm. U zvířat s aplikovaným ketaminem byla perioda dlouhá 24,30 h před jeho aplikací a 24,38 h po aplikaci.



**Obrázek 39. Délka endogenní periody u potkanů druhého běhu experimentu před a po aplikaci roztoků.** Sloupec kontrolních zvířat představuje v obou případech průměr 4 hodnot  $\pm$  SEM, sloupec zvířat s aplikací ketaminu představuje v obou případech průměr 5 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza porovnávací experimentální skupiny mezi sebou byla provedena nepárovým t-testem, a to před i po aplikaci roztoků. Analýza porovnávací rozdíl před a po v rámci jedné experimentální skupiny byla provedena párovým t-testem, a to u obou experimentálních skupin.

Nepárový t-test neodhalil mezi experimentálními skupinami před aplikací roztoků téměř žádný rozdíl v relativní amplitudě ( $p = 0,9877$ ; obr. 40). Relativní amplituda dosahovala průměrné hodnoty 0,44 u skupiny čtyř kontrolních zvířat a přibližně 0,45 u pěti zvířat, kterým měl být aplikován ketamin. Ani po aplikaci roztoků nebylo možné zamítnout nulovou hypotézu

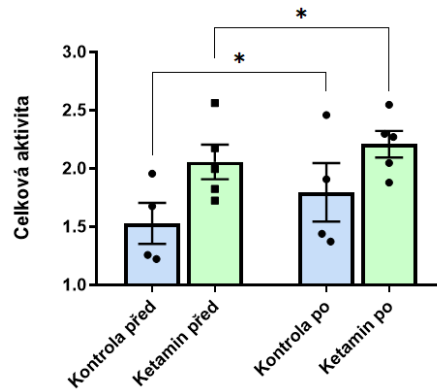
na základě nepárového t-testu ( $p = 0,3991$ ). Zvýšená hodnota relativní amplitudy u kontrolních zvířat byla přibližně 0,48, u zvířat po aplikaci ketaminu 0,53. Prodloužení relativní amplitudy po aplikaci roztoků nebylo na základě párového t-testu ani u jedné skupiny signifikantní ( $p = 0,2858$  pro skupinu kontrolních zvířat,  $p = 0,0734$  pro skupinu zvířat s aplikovaným ketaminem). Nárůst průměrné relativní amplitudy u skupiny zvířat po aplikaci ketaminu je zvyšován především jednou odlehlou (nikoliv však signifikantně odlišnou) hodnotou, jak je vidět na obrázku 40.



**Obrázek 40. Hodnoty relativní amplitudy potkanů druhého běhu experimentu před a po aplikaci ketaminu.** Sloupec kontrolních zvířat představuje v obou případech průměr 4 hodnot  $\pm$  SEM, sloupec zvířat s aplikací ketaminu představuje v obou případech průměr 5 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza porovnávací experimentální skupiny mezi sebou byla provedena nepárovým t-testem, a to před i po aplikaci roztoků. Analýza porovnávací rozdíl před a po v rámci jedné experimentální skupiny byla provedena párovým t-testem, a to u obou experimentálních skupin. Zdánlivé zvýšení relativní amplitudy u skupiny zvířat po aplikaci ketaminu je způsobeno především jednou vysokou hodnotou, která však není od zbylých čtyř signifikantně odlehlá.

Na základě nepárového t-testu se ukázalo, že hodnoty celkové aktivity udávané v relativních jednotkách byly mezi experimentálními skupinami téměř signifikantně odlišné již před aplikací roztoků ( $p = 0,0538$ ; obr. 41). Zatímco u kontrolní skupiny představovala průměrná hodnota přibližně 1,53 relativních jednotek, u skupiny zvířat, kterým měl být aplikován ketamin, to bylo přibližně 2,1. Párový t-test následně ukázal u obou skupin signifikantní nárůst celkové aktivity ( $p = 0,0452$  pro skupinu čtyř kontrolních zvířat,  $p = 0,0372$  pro skupinu pěti zvířat s aplikovaným ketaminem). U kontrolní skupiny se míra celkové aktivity zvýšila na přibližně 1,8 jednotek, u skupiny zvířat po aplikaci ketaminu na 2,21. Ani po aplikaci

roztoků však nepárový t-test nezamítnul nulovou hypotézu, mezi experimentálními skupinami tedy nebyl v celkové aktivitě statisticky významný rozdíl ( $p = 0,1500$ ).



**Obrázek 41. Celková aktivita potkanů druhého běhu experimentu před a po aplikaci ketaminu vyjádřená v relativních jednotkách.** Sloupec kontrolních zvířat představuje v obou případech průměr 4 hodnot  $\pm$  SEM, sloupec zvířat s aplikací ketaminu představuje v obou případech průměr 5 hodnot  $\pm$  SEM. Analýza porovnávající experimentální skupiny mezi sebou byla provedena nepárovým t-testem, a to před i po aplikaci roztoků. Analýza porovnávající rozdíl před a po v rámci jedné experimentální skupiny byla provedena párovým t-testem, a to u obou experimentálních skupin. U obou experimentálních skupin došlo po aplikaci roztoků k signifikantnímu nárůstu celkové aktivity; \* představuje signifikanci  $p < 0,05$ .

## 6. Diskuze

Ketamin je nekompetitivní antagonist NMDA receptorů. Aktivace NMDA receptorů v oblasti SCN, hlavního pacemakeru, má klíčovou roli ve světle indukovaných fázových posunech (Colwell *et al.*, 1991); subanestetické dávky ketaminu navíc působí na několik dalších světloreaktivních markerů, jako je např. protein c-FOS, transkripční faktor pCREB či aktivovaná kináza pERK, které jsou pro fázový posun nezbytné (Kohtala *et al.*, 2021). Současně také aplikace ketaminu zvyšuje hladiny neurotrofinu BDNF v oblasti hipokampu a mPFC (Zhou *et al.*, 2014). Bylo dokonce zjištěno, že ketamin zvyšuje neurogenезi v aktivně proliferčních oblastech mozku, jako je DG (Michaëlsson *et al.*, 2019).

Tato práce se zabývá působením subanestetických dávek ketaminu na světloreaktivní markery c-FOS, pCREB a pERK a také na neurotrofin BDNF v SCN a DG. Naše výsledky ukazují, že aplikace subanestetické dávky ketaminu snižuje indukci proteinu c-FOS v SCN po vystavení světelnému pulzu, s čímž koreluje také snížení fázového posunu lokomoční aktivity. Za stejných podmínek však tato dávka ketaminu zvyšuje indukci c-FOS v DG.

### 6.1 Aplikace subanestetické dávky ketaminu

Ketamin představuje farmakum s velkou šíří účinné dávky a variabilními možnostmi aplikace. Experimenty zabývající se účinkem subanestetických dávek ketaminu nejčastěji volí intraperitoneální či subkutánní aplikaci, přičemž subkutánní způsob je využíván především při aplikaci mláďatům (Liu *et al.*, 2011). Užívá se nicméně i intravenózní aplikace, která představuje nejčastější způsob podání v klinické praxi (Radford *et al.*, 2017), či orální aplikace, vhodná především pro chronické podávání (Lannes *et al.*, 1991). V našem experimentu byla zvolena intraperitoneální injekce. Experimentální paradigma vyžadovalo jednorázovou dávku ketaminu aplikovanou ve tmě, respektive za červeného světla, a za těchto podmínek představovala intraperitoneální aplikace nejvhodnější přístup. Tento typ aplikace ketaminu se u potkanů navíc vyznačuje rychlým nárůstem množství ketaminu a jeho hlavního metabolitu norketaminu v krevním séru, ale i v mozku – maximální hodnoty jsou pozorované 10 až 30 minut po aplikaci, ale vysoké množství přetrvává i 2 hodiny po aplikaci (Páleníček *et al.*, 2011). To představovalo pro náš experiment optimální farmakokinetické parametry. Aplikace ketaminu proběhla na počátku subjektivní noci (CT14), první časový bod odběru tkáně probíhal hodinu a čtvrt poté.

Dávka činila 40 mg/kg roztoku ketaminu. Tato dávka byla před začátkem pokusu experimentálně stanovena. Cílem bylo aplikovat takovou dávku, která by způsobila očekávané

behaviorální projevy – u potkanů jsou po anestetické i subanestetické dávce ketaminu typicky pozorovány ataxie, kývavé pohyby hlavou a stereotypní otáčení se v kruhu (Myslobodsky *et al.*, 1979; Hetzler & Wautlet, 1985) – ale současně u zvířat nezpůsobila sedaci. Míra sedace byla pozorována na základě tzv. *righting reflexu*, neboli reflexu, který u zvířete převráceného na záda zajistí okamžité „srovnání“ do polohy s krytým břichem. Tento test se u zvířat standardně užívá pro určení míry ztráty vědomí (Meyer, 2020). Potkani při dávce 40 mg/kg i.p. nevykazovali žádné narušení *righting reflexu*. Při stanovování dávky byl brán zřetel na předchozí studie, u kterých je však nacházen poměrně velký rozptyl subanestetických dávek, a to od velmi nízkých, od 5 mg/kg po 20 mg/kg i.p. (Imre *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2008; Alijanpour & Rezayof, 2023), které při našem testování neměly žádný behaviorální účinek, až po 50 mg/kg i.p. (Hetzler & Wautlet, 1985), při které však byl ve zmíněné studii naopak účinek až příliš prominentní (ataxie dosáhla takové úrovně, že zvířata padala na stranu, což by mohlo implikovat i narušený *righting reflex*).

## 6.2 Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu světlo-reaktivních markerů v SCN a jejich behaviorální výstup

Podle dostupných informací existuje pouze jediná publikovaná studie zabývající se účinkem jednorázové subanestetické dávky ketaminu na fázové posuny v lokomoční aktivitě, a to Colwell *et al.*, 1990. Tato studie, využívající křečka jako modelové zvíře, zjistila, že subanestetická dávka ketaminu (40 mg/kg i.p.) aplikovaná na počátku subjektivní noci (CT13,5) signifikantně snížila velikost fázového posunu lokomoční aktivity indukovaného světelným pulzem oproti kontrolním zvířatům. Ketamin pro experiment v této studii (Colwell *et al.*, 1990) však nebyl farmakem hlavního zájmu, nýbrž spíše doplňující látkou – experiment se zabýval více antagonisty NMDA receptorů (z nichž ketamin představoval nejméně potentní z testovaných substancí) a jeho výstupem byl důkaz, že NMDA receptory jsou zásadní pro přenos světelné informace retinohypothalamickým traktem do SCN. Dalšími molekulárními mechanismy ketaminu se však tento experiment nijak nezabýval.

Námi provedený experiment potvrzuje zjištění o vlivu ketaminu na fázové posuny u zvířat. Subanestetická dávka ketaminu (40 mg/kg i.p.) aplikovaná na počátku subjektivní noci (CT14) u potkanů signifikantně snížila velikost fázového posunu lokomoční aktivity indukovaného světelným pulzem oproti kontrolám. Sama o sobě však na fázové posuny vliv neměla, což koresponduje se studií Colwell & Menaker, 1992 zabývající se vlivem jiných antagonistů NMDA receptorů. Zjistili jsme navíc, že tento behaviorální výstup aktivity SCN pozitivně koreluje se signifikantním snížením hladiny proteinu c-FOS ve VLSCN po vystavení

světelnému pulzu oproti kontrolním zvířatům, čímž jsme potvrdili výsledky předchozích studií, že indukce c-FOS je pro světlem indukované fázové posuny nezbytná (Wollnik *et al.*, 1995; Trávníčková *et al.*, 1996). Snížení indukce c-FOS po světelném pulzu bylo očekávaně markantní v části VLSCN, neboť právě ta, na rozdíl od DMSCN, přijímá informace o světle vedené RHT (Moore *et al.*, 1995). Světelná informace je do VLSCN přenášena aktivací glutamátových NMDAR – právě aktivace NMDAR je jedna z prokazatelných cest indukce c-FOS (Morgan & Curran, 1988). Rozdíl v indukci c-FOS po světelném pulzu mezi kontrolními zvířaty a zvířaty s aplikovaným ketaminem byl pozorovatelný okamžitě po pulzu, statistická signifikance se nicméně projevila až v časovém bodě 1 h a 45 min po pulzu. Na vině je nejspíš časová prodleva mezi prvotní indukcí genové transkripce a konečným zvýšením hladin příslušného proteinu – přestože je *c-fos* řazen mezi okamžité časné geny a jeho mRNA vykazuje rychlý turnover, maximální hladiny *c-fos* mRNA je dosahováno 30 minut po indukci (Rahmsdorf *et al.*, 1987). U maximálního nárůstu hladin proteinu c-FOS (tzn. i maximálního rozdílu mezi kontrolními zvířaty a zvířaty s aplikovaným ketaminem) je tedy také nutné počítat s určitým zpožděním.

Zjistili jsme, že samotná aplikace ketaminu nevytváří rozdíl v hladinách proteinu c-FOS oproti kontrolním zvířatům ani v jedné části SCN. Předchozí studie ukazují, že vlivem jednorázové subanestetické dávky ketaminu dochází ke zvýšené indukci c-FOS v některých částech mozku, jako je například čichový lalok, mPFC, PVN či amygdala (Yang *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2021), ale u jiných částí, jako je například ventrální tegmentální oblast nebo substantia nigra, nedochází k žádné změně (Yang *et al.*, 2010). Ve většině (ač ne ve všech) hypothalamických oblastech způsobuje subanestetická dávka ketaminu zvýšení hladin c-FOS (Gao *et al.*, 2021). Konkrétně pro SCN tato data dostupná nejsou, naše výsledky však zvýšení nenaznačují.

V hladinách pERK nebyly ani v jedné části SCN nalezeny žádné statisticky významné změny mezi skupinami. To je však v rozporu s předchozími výsledky naší laboratoře i s publikovanými studiemi. Vtok vápenatých iontů způsobený aktivací NMDA receptorů ve VLSCN vlivem světelného pulzu by měl v této části způsobit signifikantní zvýšení fosforylace kinázy ERK u kontrolních zvířat (Obrietan *et al.*, 1998; Červená *et al.*, 2015), patrně již 15 minut po vystavení pulzu (Butcher *et al.*, 2003). Hladiny pERK mezi jednotlivými částmi SCN by navíc měly být v protifázi; v subjektivní noci by hladiny ve VLSCN měly být velmi vysoké, zatímco v DMSCN velmi nízké (Pačesová *et al.*, 2015). Ani to se však v našich výsledcích u kontrolních zvířat neprokázalo. Tento nesoulad mezi výsledky kontrolních skupin

naznačuje, že námi zjištěné hladiny pERK se bohužel nedají brát jako důvěryhodné a nelze učinit spolehlivý závěr o působení ketaminu na světlem-indukované hladiny pERK v SCN.

Podobná je situace u indukce pCREB. V počtech imunoreaktivních buněk SCN nebyly u tohoto proteinu nalezeny žádné změny. I zde by však minimálně u kontrolních skupin měly být patrné signifikantní rozdíly, neboť fosforylace proteinu CREB je nezbytným procesem pro indukci světelných fázových posunů v subjektivní noci (Ginty *et al.*, 1993; Wheaton *et al.*, 2018). Fosforylace pCREB navíc úzce souvisí s indukcí c-FOS, neboť jsou oba tyto procesy ovlivňovány hladinami cAMP (Metz & Ziff, 1991). Zdá se proto být nepravděpodobné, že by docházelo k signifikantním rozdílům v hladinách c-FOS, ale nikoliv k rozdílům v hladinách pCREB. Ani tyto výsledky tedy nelze brát jako směrodatné.

Subanestetická dávka ketaminu na počátku subjektivní noci nezpůsobila signifikantní rozdíl v celkové lokomoční aktivitě zvířat v porovnání s aktivitou kontrolních zvířat, a to ani samostatně, ani v kombinaci se světelným pulzem. Ve druhém běhu experimentu sice došlo po aplikaci ketaminu k signifikantnímu nárůstu celkové aktivity zvířat, tento nárůst však korespondoval s velmi podobným nárůstem aktivity kontrolních zvířat po aplikaci fyziologického roztoku. Výsledky studie Mihara *et al.*, 2012 s anestetickou dávkou ketaminu aplikovanou potkanům v LD režimu uprostřed noci ukazují třídní snížení lokomoční aktivity oproti kontrolním zvířatům – autoři této studie nicméně přiznávají, že na vině je spíše pooperační stav zvířat než aplikace ketaminu, neboť toto snížení bylo stejné i u skupiny, u které bylo použito jiné anestetikum. Studie Wilson *et al.*, 2007 zabývající se vlivem subanestetické dávky ketaminu naopak zjistila, že potkani s aplikovaným ketaminem nevykazují oproti kontrolním zvířatům příliš velký rozdíl v aktivitě ani v rámci akutní pohybové aktivity (měření začalo okamžitě po aplikaci, a probíhalo 2 hodiny). Jiná studie, Bates & Trujillo, 2019, zjistila, že efekt hyperlokomoce po subanestetické dávce ketaminu se u dospělých potkanů do jedné hodiny po aplikaci ztratí. Lze tedy předpokládat, že se u zvířat skutečně neprojevuje rozdíl v celkové lokomoční aktivitě vlivem jednorázové dávky ketaminu, a to ani při dlouhodobém pozorování.

Rozdíly mezi experimentálními skupinami nebyly nalezeny ani v ostatních cirkadiálních parametrech lokomoční aktivity, a to ani u prvního, ani u druhého běhu pokusu. Jednorázová aplikace subanestetické dávky ketaminu tedy nemá vliv na lokomoční aktivitu jakožto behaviorální výstup cirkadiálního systému, pouze ovlivňuje velikost fázových posunů způsobených světelným pulsem.

Ve druhém běhu pokusu byla relativní amplituda obou experimentálních skupin zvířat nižší, než byla u zvířat prvního běhu, což mohl být důsledek delšího pobytu zvířat v DD režimu.

### 6.3 Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu světlo-reaktivních markerů v DG

Informace o světelném pulzu je komunikována nejen do SCN, ale i do hipokampu (von Gall, 2022). Není tedy překvapující, že světelný pulz indukoval zvýšení hladiny c-FOS v DG podobným způsobem, jakým bylo toto zvýšení indukováno v SCN. Zajímavé však je, že v kombinaci s aplikací ketaminu byly hladiny c-FOS po světelném pulzu signifikantně vyšší nejen proti zvířatům s aplikovaným ketaminem nevystaveným pulzu, ale i v porovnání se zvýšením hladin c-FOS po pulzu u kontrolních zvířat. To je velmi odlišné od situace v SCN, kdy aplikace ketaminu naopak snižovala indukci c-FOS u pulzovaných zvířat. Ketamin, jakožto antagonist NMDAR, v neuronech SCN snižuje reaktivitu na světelné pulzy indukovanou právě aktivací NMDAR v této oblasti, v hipokampu však paradoxně zvyšuje glutamátovou signalizaci vlivem inhibice NMDAR inhibičních interneuronů (Widman & McMahon, 2018). Zvýšená glutamátová signalizace pak může indukovat zvýšené hladiny c-FOS (Morgan & Curran, 1988). Potvrzení této teorie vychází i ze studie Nakao *et al.*, 1993, která objevila, že vyšší dávky ketaminu v potkaním hipokampu indukci c-FOS nezpůsobí – nejspíš proto, že dochází i k inhibici NMDA receptorů excitačních pyramidových neuronů v této oblasti. Když však zvířata nebyla vystavená světelnému pulzu, nebyl v hladinách c-FOS v DG rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou s aplikovaným ketaminem. To se shoduje s výsledky studie Zhang *et al.*, 2019, která 2 hodiny po infuzní subanestetické dávce ketaminu u potkanů také nenalezla zvýšení hladin c-FOS v hipokampu. Zvýšení indukce c-FOS v DG po aplikaci ketaminu je tedy zcela závislé na prvotním zvýšení těchto hladin světelným pulzem v subjektivní noci.

Data porovnávající hladiny pERK v DG jsou bohužel, vzhledem k neprůkazným výsledkům v SCN, neprůkazná i zde. Ani v této části mozku nebyly nalezeny statisticky významné změny mezi experimentálními skupinami. Studie Shi *et al.*, 2020 zabývající se hladinou pERK v hipokampu potkanů po subanestetické dávce ketaminu zjistila, že 1 hodinu po aplikaci se hladiny pERK signifikantně snížily, 24 hodin po aplikaci jsou však naopak vyšší než u kontrolních zvířat. Snížení hladin pERK v hipokampu potkanů prokazuje i studie Zhang *et al.*, 2019, avšak zde po infuzní subanestetické dávce ketaminu. Pokud by se tedy experiment zdařil, mohlo pozorování hladin pERK v DG po aplikaci ketaminu přinést zajímavé výsledky.

U fosforylovaného proteinu pCREB bylo v DG pozorováno velmi výrazné zvýšení hladin u pulzovaných zvířat s aplikovaným ketaminem, a to přímo po pulzu. Důvěryhodnost



těchto dat je, vzhledem k neprůkaznosti výsledků hladin pCREB v SCN, malá, avšak zvýšená indukce pCREB v DG v reakci na pulz by byla v kontextu zvýšených hladin c-FOS v téže oblasti logická. Podobně jako u pCREB, i u c-FOS přispívají zvýšené hladiny cAMP ke zvýšené indukci (Metz & Ziff, 1991), a ketamin zvýšené hladiny cAMP prokazatelně vyvolává (Wray *et al.*, 2019). Pokud tedy signifikantně zvýšená hladina c-FOS v DG byla mimo jiné způsobena zvýšeným množstvím cAMP, mělo by dojít i ke zvýšení fosforylace CREB. Bylo dokonce prokázáno, že 20 minut po aplikaci subanestetické dávky ketaminu (20 mg/kg i.p.), skutečně dochází k signifikantnímu zvýšení hladin pCREB v oblasti hipokampu (Shi *et al.*, 2020). Protože náš první časový bod odběru probíhal až 1 hodinu a 15 minut po aplikaci ketaminu, je možné, že jsme změnu způsobenou pouze aplikací ketaminu (bez světelného pulzu) nestačili zaznamenat. Ketamin však (ač nesignifikantně) zvyšuje i samotné množství nefosforylovaného proteinu CREB (Shi *et al.*, 2020), které může přetrvávat, a fosforylace tohoto proteinu vyvolaná světelným pulzem mohla způsobit celkové zvýšení hladiny pCREB, které jsme 15 minut po pulzu v DG pozorovali.

#### 6.4 Vliv subanestetické dávky ketaminu na hladinu BDNF

Ani v jedné části SCN nevykazují hladiny BDNF mezi experimentálními skupinami napříč časovými body žádnou statisticky významnou změnu. Expres BDNF v SCN je nezbytná pro vznik světelných fázových posunů (Kim *et al.*, 2006; Michel *et al.*, 2006), míra exprese BDNF však neovlivňuje velikost fázového posunu po vystavení světelnému pulzu v noci (Liang *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že hladiny proteinu BDNF v SCN potkanů vykazují cirkadiánní rytmicitu s nejvyššími hodnotami v první polovině subjektivní noci (konkrétně mezi CT15 a CT20) (Liang *et al.*, 1998). Jelikož se jedná o stejný časový interval, v jakém probíhaly naše odběrové body, je možné, že ketamin již nebyl schopen vysoké hladiny neurotrofinu příliš zvýšit. Malé rozdíly pro nás mohly být nedetekovatelné vlivem silného nespecifického barvení mozkové tkáně protilátkou proti BDNF, u které jsme použili poměrně nízké ředění (1:100) vycházející z našeho předběžného pokusu jako optimální. U této protilátky dodané stejným výrobcem se v literatuře nicméně objevuje při imunohistochemických analýzách ředění i 1:500 (Singh *et al.*, 2022).

Ani v DG nebylo pozorováno zvýšení hladin BDNF po aplikaci ketaminu. Publikované studie však ukazují, že jednorázová aplikace subanestetické dávky ketaminu u potkanů vede k mírnému, ale signifikantnímu zvýšení hladin BDNF v hipokampu (Garcia *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2013). Podobně jako tomu bylo u SCN, i zde pro nás mohly být mírné rozdíly nepozorovatelné vlivem nízkého ředění protilátky. Pozorovali jsme nicméně zajímavé,

ač nesignifikantní snížení optické denzity BDNF v DG u obou experimentálních skupin v časovém bodě 5 h po vystavení světelnému pulzu. Tento výsledek se shoduje s publikovanými daty (Liang *et al.*, 1998), kdy u potkanů ve stejném čase (CT20) vykazoval protein BDNF v hipokampu nejnižší hladiny z časových bodů odběru rozptýlených v rámci dvouhodinových intervalů po celé délce dne. Efekt snížení hladin BDNF může souviset s účinkem glukokortikoidů na expresi tohoto proteinu – zvýšená hladina kortikosteronu v hipokampu potkanů způsobí i o šest hodin později snížení hladin proteinu BDNF v hipokampu, především právě v části DG (Schaaf *et al.*, 1998). Hladiny kortikosteronu v potkaním hipokampu jsou vysoké na počátku noci a s jejím postupem se snižují (Droste *et al.*, 2008), právě šest hodin před posledním odběrovým bodem byly také obě naše experimentální skupiny potkanů vystaveny stresu (aplikaci roztoků), který zvyšuje hladiny glukokortikoidů a snižuje hladiny BDNF (Smith *et al.*, 1995). Obojí by mohlo námi pozorované snížení hladin vysvětlovat.

## 7. Závěr

Ketamin představuje disociativní anestetikum, jehož subanestetické dávky působí jako antidepressivum s rychlým nástupem účinku. Ačkoliv bylo prokázáno, že nízké dávky ketaminu působí na některé složky cirkadiálního systému, chronofarmakologický vliv této látky dosud nebyl příliš studován. Výsledky naší práce ukazují, že jednorázová aplikace subanestetické dávky ketaminu na počátku subjektivní noci u potkana snižuje světlem indukované zvýšení hladiny c-FOS v SCN, hlavním cirkadiálním pacemakeru. V souvislosti s tím jsme dokázali, že tato aplikace ketaminu způsobuje i snížení velikosti světlem indukovaného fázového posunu lokomoční aktivity potkana. Prokázali jsme tedy, že ketamin celkově snižuje reakci cirkadiálního systému na světelný stimul. Samotná aplikace subanestetické dávky ketaminu však podle našich výsledků nemá na cirkadiální systém vliv. Prokázali jsme také, že nízká dávka ketaminu indukuje zvýšení hladiny c-FOS v gyru dentatu po vystavení světelnému pulzu na začátku subjektivní noci, což může souviset se zvýšením glutamátové transmise v oblasti hipokampu. Vzhledem k neprůkaznosti dalších výsledků vzniklých možným pochybením při procesu imunohistochemie by opakování experimentu mohlo přinést další relevantní informace o působení ketaminu na cirkadiální systém.

## 8. Seznam použité literatury

- Akashi, M., Tsuchiya, Y., Yoshino, T. & Nishida, E. (2002) Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta in cultured cells. *Mol Cell Biol*, **22**, 1693-1703.
- Akiyama, M., Kouzu, Y., Takahashi, S., Wakamatsu, H., Moriya, T., Maetani, M., Watanabe, S., Tei, H., Sakaki, Y. & Shibata, S. (1999) Inhibition of light- or glutamate-induced mPer1 expression represses the phase shifts into the mouse circadian locomotor and suprachiasmatic firing rhythms. *J Neurosci*, **19**, 1115-1121.
- Ali, F., Gerhard, D.M., Sweasy, K., Pothula, S., Pittenger, C., Duman, R.S. & Kwan, A.C. (2020) Ketamine disinhibits dendrites and enhances calcium signals in prefrontal dendritic spines. *Nat Commun*, **11**, 72.
- Alijanpour, S. & Rezayof, A. (2023) Activation of ventral hippocampal CB1 receptors inhibits ketamine-induced anxiogenic-like behavior: Alteration of BDNF/c-Fos levels in the mouse hippocampus. *Brain Res*, **1810**, 148378.
- Allen, R.M. & Young, S.J. (1978) Phencyclidine-induced psychosis. *Am J Psychiatry*, **135**, 1081-1084.
- An, S., Harang, R., Meeker, K., Granados-Fuentes, D., Tsai, C.A., Mazuski, C., Kim, J., Doyle, F.J., Petzold, L.R. & Herzog, E.D. (2013) A neuropeptide speeds circadian entrainment by reducing intercellular synchrony. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, E4355-4361.
- Anis, N.A., Berry, S.C., Burton, N.R. & Lodge, D. (1983) The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol*, **79**, 565-575.
- Anson, L.C., Chen, P.E., Wyllie, D.J., Colquhoun, D. & Schoepfer, R. (1998) Identification of amino acid residues of the NR2A subunit that control glutamate potency in recombinant NR1/NR2A NMDA receptors. *J Neurosci*, **18**, 581-589.
- Aryal, R.P., Kwak, P.B., Tamayo, A.G., Gebert, M., Chiu, P.L., Walz, T. & Weitz, C.J. (2017) Macromolecular Assemblies of the Mammalian Circadian Clock. *Mol Cell*, **67**, 770-782.e776.
- Aton, S.J., Colwell, C.S., Harmar, A.J., Waschek, J. & Herzog, E.D. (2005) Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci*, **8**, 476-483.

- Aung, T.N., Acs, B., Warrell, J., Bai, Y., Gaule, P., Martinez-Morilla, S., Vathiotis, I., Shafi, S., Moutafi, M., Gerstein, M., Freiberg, B., Fulton, R. & Rimm, D.L. (2021) A new tool for technical standardization of the Ki67 immunohistochemical assay. *Mod Pathol*, **34**, 1261-1270.
- Bankhead, P., Loughrey, M.B., Fernández, J.A., Dombrowski, Y., McArt, D.G., Dunne, P.D., McQuaid, S., Gray, R.T., Murray, L.J., Coleman, H.G., James, J.A., Salto-Tellez, M. & Hamilton, P.W. (2017) QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*, **7**, 16878.
- Barrett, W., Buxhoeveden, M. & Dhillon, S. (2020) Ketamine: a versatile tool for anesthesia and analgesia. *Curr Opin Anaesthesiol*, **33**, 633-638.
- Bates, M.L.S. & Trujillo, K.A. (2019) Long-lasting effects of repeated ketamine administration in adult and adolescent rats. *Behav Brain Res*, **369**, 111928.
- Bathina, S. & Das, U.N. (2015) Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch Med Sci*, **11**, 1164-1178.
- Bellet, M.M., Vawter, M.P., Bunney, B.G., Bunney, W.E. & Sassone-Corsi, P. (2011) Ketamine influences CLOCK:BMAL1 function leading to altered circadian gene expression. *PLoS One*, **6**, e23982.
- Bendová, Z., Pačesová, D. & Novotný, J. (2020) The day-night differences in ERK1/2, GSK3 $\beta$  activity and c-Fos levels in the brain, and the responsiveness of various brain structures to morphine. *J Comp Neurol*, **528**, 2471-2495.
- Bendová, Z., Sládek, M. & Svobodová, I. (2012) The expression of NR2B subunit of NMDA receptor in the suprachiasmatic nucleus of Wistar rats and its role in glutamate-induced CREB and ERK1/2 phosphorylation. *Neurochem Int*, **61**, 43-47.
- Bendová, Z., Sumová, A. & Mikkelsen, J.D. (2009) Circadian and developmental regulation of N-methyl-d-aspartate-receptor 1 mRNA splice variants and N-methyl-d-aspartate-receptor 3 subunit expression within the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, **159**, 599-609.
- Berman, R.M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D.A., Heninger, G.R., Charney, D.S. & Krystal, J.H. (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*, **47**, 351-354.
- Berson, D.M., Dunn, F.A. & Takao, M. (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*, **295**, 1070-1073.

- Besing, R.C., Paul, J.R., Hablitz, L.M., Rogers, C.O., Johnson, R.L., Young, M.E. & Gamble, K.L. (2015) Circadian rhythmicity of active GSK3 isoforms modulates molecular clock gene rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms*, **30**, 155-160.
- Beurel, E., Song, L. & Jope, R.S. (2011) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 is necessary for the rapid antidepressant effect of ketamine in mice. *Mol Psychiatry*, **16**, 1068-1070.
- Butcher, G.Q., Lee, B. & Obrietan, K. (2003) Temporal regulation of light-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol*, **90**, 3854-3863.
- Card, J.P., Brecha, N., Karten, H.J. & Moore, R.Y. (1981) Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide-containing cells and processes in the suprachiasmatic nucleus of the rat: light and electron microscopic analysis. *J Neurosci*, **1**, 1289-1303.
- Castel, M., Feinstein, N., Cohen, S. & Harari, N. (1990) Vasopressinergic innervation of the mouse suprachiasmatic nucleus: an immuno-electron microscopic analysis. *J Comp Neurol*, **298**, 172-187.
- Chazot, P.L. & Stephenson, F.A. (1997) Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. *J Neurochem*, **69**, 2138-2144.
- Colwell, C.S. (2001) NMDA-evoked calcium transients and currents in the suprachiasmatic nucleus: gating by the circadian system. *Eur J Neurosci*, **13**, 1420-1428.
- Colwell, C.S., Foster, R.G. & Menaker, M. (1991) NMDA receptor antagonists block the effects of light on circadian behavior in the mouse. *Brain Res*, **554**, 105-110.
- Colwell, C.S. & Menaker, M. (1992) NMDA as well as non-NMDA receptor antagonists can prevent the phase-shifting effects of light on the circadian system of the golden hamster. *J Biol Rhythms*, **7**, 125-136.
- Colwell, C.S., Ralph, M.R. & Menaker, M. (1990) Do NMDA receptors mediate the effects of light on circadian behavior? *Brain Res*, **523**, 117-120.
- Cuddapah, V.A., Zhang, S.L. & Sehgal, A. (2019) Regulation of the Blood-Brain Barrier by Circadian Rhythms and Sleep. *Trends Neurosci*, **42**, 500-510.
- Czeisler, C.A., Shanahan, T.L., Klerman, E.B., Martens, H., Brotman, D.J., Emens, J.S., Klein, T. & Rizzo, J.F. (1995) Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light. *N Engl J Med*, **332**, 6-11.

- Červená, K., Pačesová, D., Spišská, V. & Bendová, Z. (2015) Delayed Effect of the Light Pulse on Phosphorylated ERK1/2 and GSK3 $\beta$  Kinases in the Ventrolateral Suprachiasmatic Nucleus of Rat. *J Mol Neurosci*, **56**, 371-376.
- DeBruyne, J.P., Weaver, D.R. & Dallmann, R. (2014) The hepatic circadian clock modulates xenobiotic metabolism in mice. *J Biol Rhythms*, **29**, 277-287.
- Denomme, N. (2018) The Domino Effect: Ed Domino's early studies of Psychoactive Drugs. *J Psychoactive Drugs*, **50**, 298-305.
- Droste, S.K., de Groote, L., Atkinson, H.C., Lightman, S.L., Reul, J.M. & Linthorst, A.C. (2008) Corticosterone levels in the brain show a distinct ultradian rhythm but a delayed response to forced swim stress. *Endocrinology*, **149**, 3244-3253.
- Duncan, W.C., Slonena, E., Hejazi, N.S., Brutsche, N., Yu, K.C., Park, L., Ballard, E.D. & Zarate, C.A. (2017) Motor-Activity Markers of Circadian Timekeeping Are Related to Ketamine's Rapid Antidepressant Properties. *Biol Psychiatry*, **82**, 361-369.
- Dwivedi, Y. & Pandey, G.N. (2008) Adenylyl cyclase-cyclicAMP signaling in mood disorders: role of the crucial phosphorylating enzyme protein kinase A. *Neuropsychiatr Dis Treat*, **4**, 161-176.
- Etchegaray, J.P., Lee, C., Wade, P.A. & Reppert, S.M. (2003) Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature*, **421**, 177-182.
- Etchegaray, J.P., Machida, K.K., Noton, E., Constance, C.M., Dallmann, R., Di Napoli, M.N., DeBruyne, J.P., Lambert, C.M., Yu, E.A., Reppert, S.M. & Weaver, D.R. (2009) Casein kinase 1 delta regulates the pace of the mammalian circadian clock. *Mol Cell Biol*, **29**, 3853-3866.
- Finger, A.M. & Kramer, A. (2021) Mammalian circadian systems: Organization and modern life challenges. *Acta Physiol (Oxf)*, **231**, e13548.
- Foster, R.G., Hughes, S. & Peirson, S.N. (2020) Circadian Photoentrainment in Mice and Humans. *Biology (Basel)*, **9**.
- Frohlich, J. & Van Horn, J.D. (2014) Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *J Psychopharmacol*, **28**, 287-302.
- Gao, T.H., Ni, R.J., Liu, S., Tian, Y., Wei, J., Zhao, L., Wang, Q., Ni, P., Ma, X. & Li, T. (2021) Chronic lithium exposure attenuates ketamine-induced mania-like behavior and c-Fos expression in the forebrain of mice. *Pharmacol Biochem Behav*, **202**, 173108.
- Garcia, L.S., Comim, C.M., Valvassori, S.S., Réus, G.Z., Barbosa, L.M., Andreazza, A.C., Stertz, L., Fries, G.R., Gavioli, E.C., Kapczinski, F. & Quevedo, J. (2008) Acute

- administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **32**, 140-144.
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S. & Weitz, C.J. (1998) Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*, **280**, 1564-1569.
- Gerhard, D.M., Pothula, S., Liu, R.J., Wu, M., Li, X.Y., Girgenti, M.J., Taylor, S.R., Duman, C.H., Delpire, E., Picciotto, M., Wohleb, E.S. & Duman, R.S. (2020) GABA interneurons are the cellular trigger for ketamine's rapid antidepressant actions. *J Clin Invest*, **130**, 1336-1349.
- Ginty, D.D., Kornhauser, J.M., Thompson, M.A., Bading, H., Mayo, K.E., Takahashi, J.S. & Greenberg, M.E. (1993) Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science*, **260**, 238-241.
- Hannibal, J., Ding, J.M., Chen, D., Fahrenkrug, J., Larsen, P.J., Gillette, M.U. & Mikkelsen, J.D. (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci*, **17**, 2637-2644.
- Harmar, A.J., Marston, H.M., Shen, S., Spratt, C., West, K.M., Sheward, W.J., Morrison, C.F., Dorin, J.R., Piggins, H.D., Reubi, J.C., Kelly, J.S., Maywood, E.S. & Hastings, M.H. (2002) The VPAC(2) receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell*, **109**, 497-508.
- Harris, E.W., Ganong, A.H. & Cotman, C.W. (1984) Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res*, **323**, 132-137.
- Hetzler, B.E. & Wautlet, B.S. (1985) Ketamine-induced locomotion in rats in an open-field. *Pharmacol Biochem Behav*, **22**, 653-655.
- Highland, J.N., Farmer, C.A., Zanos, P., Lovett, J., Zarate, C.A., Moaddel, R. & Gould, T.D. (2022) Sex-dependent metabolism of ketamine and ( *J Psychopharmacol*, **36**, 170-182.
- Homayoun, H. & Moghaddam, B. (2007) NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci*, **27**, 11496-11500.
- Hornsby, A.K.E., Buntwal, L., Carisi, M.C., Santos, V.V., Johnston, F., Roberts, L.D., Sassi, M., Mequinion, M., Stark, R., Reichenbach, A., Lockie, S.H., Siervo, M., Howell, O., Morgan, A.H., Wells, T., Andrews, Z.B., Burn, D.J. & Davies, J.S. (2020) Unacylated-Ghrelin Impairs Hippocampal Neurogenesis and Memory in Mice and Is Altered in Parkinson's Dementia in Humans. *Cell Rep Med*, **1**, 100120.



- Imre, G., Fokkema, D.S., Den Boer, J.A. & Ter Horst, G.J. (2006) Dose-response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain Res Bull*, **69**, 338-345.
- Inouye, S.T. & Kawamura, H. (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 5962-5966.
- Kharasch, E.D. & Labroo, R. (1992) Metabolism of ketamine stereoisomers by human liver microsomes. *Anesthesiology*, **77**, 1201-1207.
- Kim, Y.I., Choi, H.J. & Colwell, C.S. (2006) Brain-derived neurotrophic factor regulation of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic currents in suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci Res*, **84**, 1512-1520.
- Kleckner, N.W. & Dingledine, R. (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science*, **241**, 835-837.
- Klein, D.C., Smoot, R., Weller, J.L., Higa, S., Markey, S.P., Creed, G.J. & Jacobowitz, D.M. (1983) Lesions of the paraventricular nucleus area of the hypothalamus disrupt the suprachiasmatic leads to spinal cord circuit in the melatonin rhythm generating system. *Brain Res Bull*, **10**, 647-652.
- Ko, C.H. & Takahashi, J.S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet*, **15 Spec No 2**, R271-277.
- Kohtala, S. (2021) Ketamine-50 years in use: from anesthesia to rapid antidepressant effects and neurobiological mechanisms. *Pharmacol Rep*, **73**, 323-345.
- Kohtala, S., Alitalo, O., Rosenholm, M., Rozov, S. & Rantamäki, T. (2021) Time is of the essence: Coupling sleep-wake and circadian neurobiology to the antidepressant effects of ketamine. *Pharmacol Ther*, **221**, 107741.
- Koike, H., Iijima, M. & Chaki, S. (2011) Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. *Behav Brain Res*, **224**, 107-111.
- Kokane, S.S., Armant, R.J., Bolaños-Guzmán, C.A. & Perrotti, L.I. (2020) Overlap in the neural circuitry and molecular mechanisms underlying ketamine abuse and its use as an antidepressant. *Behav Brain Res*, **384**, 112548.
- Krystal, J.H., Abdallah, C.G., Sanacora, G., Charney, D.S. & Duman, R.S. (2019) Ketamine: A Paradigm Shift for Depression Research and Treatment. *Neuron*, **101**, 774-778.

- Kume, K., Zylka, M.J., Sriram, S., Shearman, L.P., Weaver, D.R., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H. & Reppert, S.M. (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, **98**, 193-205.
- Kuryatov, A., Laube, B., Betz, H. & Kuhse, J. (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron*, **12**, 1291-1300.
- Lahti, A.C., Holcomb, H.H., Medoff, D.R. & Tamminga, C.A. (1995) Ketamine activates psychosis and alters limbic blood flow in schizophrenia. *Neuroreport*, **6**, 869-872.
- Lam, R.W. (2008) Addressing circadian rhythm disturbances in depressed patients. *J Psychopharmacol*, **22**, 13-18.
- Lannes, B., Micheletti, G., Warter, J.M., Kempf, E. & Di Scala, G. (1991) Behavioural, pharmacological and biochemical effects of acute and chronic administration of ketamine in the rat. *Neurosci Lett*, **128**, 177-181.
- Lauterborn, J.C., Lynch, G., Vanderklish, P., Arai, A. & Gall, C.M. (2000) Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons. *J Neurosci*, **20**, 8-21.
- Leak, R.K., Card, J.P. & Moore, R.Y. (1999) Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Res*, **819**, 23-32.
- Lee, H.K., Takamiya, K., He, K., Song, L. & Huganir, R.L. (2010) Specific roles of AMPA receptor subunit GluR1 (GluA1) phosphorylation sites in regulating synaptic plasticity in the CA1 region of hippocampus. *J Neurophysiol*, **103**, 479-489.
- Lepack, A.E., Bang, E., Lee, B., Dwyer, J.M. & Duman, R.S. (2016) Fast-acting antidepressants rapidly stimulate ERK signaling and BDNF release in primary neuronal cultures. *Neuropharmacology*, **111**, 242-252.
- Li, N., Lee, B., Liu, R.J., Banasr, M., Dwyer, J.M., Iwata, M., Li, X.Y., Aghajanian, G. & Duman, R.S. (2010) mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, **329**, 959-964.
- Li, X. & Jope, R.S. (2010) Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? *Neuropsychopharmacology*, **35**, 2143-2154.
- Liang, F.Q., Allen, G. & Earnest, D. (2000) Role of brain-derived neurotrophic factor in the circadian regulation of the suprachiasmatic pacemaker by light. *J Neurosci*, **20**, 2978-2987.

- Liang, F.Q., Walline, R. & Earnest, D.J. (1998) Circadian rhythm of brain-derived neurotrophic factor in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*, **242**, 89-92.
- Liou, S.Y., Shibata, S., Iwasaki, K. & Ueki, S. (1986) Optic nerve stimulation-induced increase of release of 3H-glutamate and 3H-aspartate but not 3H-GABA from the suprachiasmatic nucleus in slices of rat hypothalamus. *Brain Res Bull*, **16**, 527-531.
- Liu, C. & Reppert, S.M. (2000) GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron*, **25**, 123-128.
- Liu, F., Paule, M.G., Ali, S. & Wang, C. (2011) Ketamine-induced neurotoxicity and changes in gene expression in the developing rat brain. *Curr Neuropharmacol*, **9**, 256-261.
- Lumsden, E.W., Troppoli, T.A., Myers, S.J., Zanos, P., Aracava, Y., Kehr, J., Lovett, J., Kim, S., Wang, F.H., Schmidt, S., Jenne, C.E., Yuan, P., Morris, P.J., Thomas, C.J., Zarate, C.A., Moaddel, R., Traynelis, S.F., Pereira, E.F.R., Thompson, S.M., Albuquerque, E.X. & Gould, T.D. (2019) Antidepressant-relevant concentrations of the ketamine metabolite (2). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **116**, 5160-5169.
- MacDonald, J.F., Bartlett, M.C., Mody, I., Pahapill, P., Reynolds, J.N., Salter, M.W., Schneiderman, J.H. & Pennefather, P.S. (1991) Actions of ketamine, phencyclidine and MK-801 on NMDA receptor currents in cultured mouse hippocampal neurones. *J Physiol*, **432**, 483-508.
- Maeng, S., Zarate, C.A., Du, J., Schloesser, R.J., McCammon, J., Chen, G. & Manji, H.K. (2008) Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry*, **63**, 349-352.
- Marland, S., Ellerton, J., Andolfatto, G., Strapazzon, G., Thomassen, O., Brandner, B., Weatherall, A. & Paal, P. (2013) Ketamine: use in anesthesia. *CNS Neurosci Ther*, **19**, 381-389.
- Martinez-Lozano Sinues, P., Kohler, M., Brown, S.A., Zenobi, R. & Dallmann, R. (2017) Gauging circadian variation in ketamine metabolism by real-time breath analysis. *Chem Commun (Camb)*, **53**, 2264-2267.
- Mathisen, L.C., Skjelbred, P., Skoglund, L.A. & Øye, I. (1995) Effect of ketamine, an NMDA receptor inhibitor, in acute and chronic orofacial pain. *Pain*, **61**, 215-220.
- Mauvoisin, D. (2019) Circadian rhythms and proteomics: It's all about posttranslational modifications! *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, **11**, e1450.
- Mayer, M.L., Westbrook, G.L. & Guthrie, P.B. (1984) Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, **309**, 261-263.

- Menet, J.S., Rodriguez, J., Abruzzi, K.C. & Rosbash, M. (2012) Nascent-Seq reveals novel features of mouse circadian transcriptional regulation. *Elife*, **1**, e00011.
- Metz, R. & Ziff, E. (1991) cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription. *Genes Dev*, **5**, 1754-1766.
- Meyer, R.E. (2020) The Science of Transitional States of Consciousness and Euthanasia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, **50**, 503-511.
- Michaëlsson, H., Andersson, M., Svensson, J., Karlsson, L., Ehn, J., Culley, G., Engström, A., Bergström, N., Savvidi, P., Kuhn, H.G., Hanse, E. & Seth, H. (2019) The novel antidepressant ketamine enhances dentate gyrus proliferation with no effects on synaptic plasticity or hippocampal function in depressive-like rats. *Acta Physiol (Oxf)*, **225**, e13211.
- Michel, S., Clark, J.P., Ding, J.M. & Colwell, C.S. (2006) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin receptors modulate glutamate-induced phase shifts of the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, **24**, 1109-1116.
- Mihara, T., Kikuchi, T., Kamiya, Y., Koga, M., Uchimoto, K., Kurahashi, K. & Goto, T. (2012) Day or night administration of ketamine and pentobarbital differentially affect circadian rhythms of pineal melatonin secretion and locomotor activity in rats. *Anesth Analg*, **115**, 805-813.
- Mikkelsen, J.D., Larsen, P.J., O'Hare, M.M. & Wiegand, S.J. (1991) Gastrin releasing peptide in the rat suprachiasmatic nucleus: an immunohistochemical, chromatographic and radioimmunological study. *Neuroscience*, **40**, 55-66.
- Miller, O.H., Yang, L., Wang, C.C., Hargroder, E.A., Zhang, Y., Delpire, E. & Hall, B.J. (2014) GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine. *Elife*, **3**, e03581.
- Moaddel, R., Venkata, S.L., Tanga, M.J., Bupp, J.E., Green, C.E., Iyer, L., Furimsky, A., Goldberg, M.E., Torjman, M.C. & Wainer, I.W. (2010) A parallel chiral-achiral liquid chromatographic method for the determination of the stereoisomers of ketamine and ketamine metabolites in the plasma and urine of patients with complex regional pain syndrome. *Talanta*, **82**, 1892-1904.
- Moghaddam, B., Adams, B., Verma, A. & Daly, D. (1997) Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci*, **17**, 2921-2927.
- Monaghan, D.T. & Cotman, C.W. (1985) Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci*, **5**, 2909-2919.

- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, N., Sakmann, B. & Seeburg, P.H. (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*, **256**, 1217-1221.
- Moore, R.Y. & Eichler, V.B. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*, **42**, 201-206.
- Moore, R.Y. & Speh, J.C. (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neurosci Lett*, **150**, 112-116.
- Moore, R.Y., Speh, J.C. & Card, J.P. (1995) The retinohypothalamic tract originates from a distinct subset of retinal ganglion cells. *J Comp Neurol*, **352**, 351-366.
- Moore, R.Y., Speh, J.C. & Leak, R.K. (2002) Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res*, **309**, 89-98.
- Morgan, J.I. & Curran, T. (1988) Calcium as a modulator of the immediate-early gene cascade in neurons. *Cell Calcium*, **9**, 303-311.
- Morris, M.E., Viswanathan, N., Kuhlman, S., Davis, F.C. & Weitz, C.J. (1998) A screen for genes induced in the suprachiasmatic nucleus by light. *Science*, **279**, 1544-1547.
- Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S. & Baudry, M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, **319**, 774-776.
- Murrough, J.W., Perez, A.M., Pillemer, S., Stern, J., Parides, M.K., van der Rot, M., Collins, K.A., Mathew, S.J., Charney, D.S. & Iosifescu, D.V. (2013) Rapid and longer-term antidepressant effects of repeated ketamine infusions in treatment-resistant major depression. *Biol Psychiatry*, **74**, 250-256.
- Myslobodsky, M., Ackermann, R.F., Mansour, R. & Golovchinsky, V. (1979) Ketamine-induced rotation and its interaction with naloxone in rats. *Brain Res*, **172**, 191-195.
- Mäkinen, E., Lensu, S., Honkanen, M., Laitinen, P., Wikgren, J., Koch, L.G., Britton, S.L., Kainulainen, H., Pekkala, S. & Nokia, M.S. (2021) Rats bred for low intrinsic aerobic exercise capacity link obesity with brain inflammation and reduced structural plasticity of the hippocampus. *Brain Behav Immun*, **97**, 250-259.
- Míková, H., Kuchtiak, V., Svobodová, I., Spišská, V., Pačesová, D., Balík, A. & Bendová, Z. (2021) Circadian Regulation of GluA2 mRNA Processing in the Rat Suprachiasmatic Nucleus and Other Brain Structures. *Mol Neurobiol*, **58**, 439-449.

- Nakao, S., Arai, T., Mori, K., Yasuhara, O., Tooyama, I. & Kimura, H. (1993) High-dose ketamine does not induce c-Fos protein expression in rat hippocampus. *Neurosci Lett*, **151**, 33-36.
- Newman, L.A., Walker, M.T., Brown, R.L., Cronin, T.W. & Robinson, P.R. (2003) Melanopsin forms a functional short-wavelength photopigment. *Biochemistry*, **42**, 12734-12738.
- Nibuya, M., Nestler, E.J. & Duman, R.S. (1996) Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci*, **16**, 2365-2372.
- Noya, S.B., Colameo, D., Brüning, F., Spinnler, A., Mircsof, D., Opitz, L., Mann, M., Tyagarajan, S.K., Robles, M.S. & Brown, S.A. (2019) The forebrain synaptic transcriptome is organized by clocks but its proteome is driven by sleep. *Science*, **366**.
- Obrietan, K., Impey, S. & Storm, D.R. (1998) Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat Neurosci*, **1**, 693-700.
- Orozco-Solis, R., Montellier, E., Aguilar-Arnal, L., Sato, S., Vawter, M.P., Bunney, B.G., Bunney, W.E. & Sassone-Corsi, P. (2017) A Circadian Genomic Signature Common to Ketamine and Sleep Deprivation in the Anterior Cingulate Cortex. *Biol Psychiatry*, **82**, 351-360.
- Paul, J.R., McKeown, A.S., Davis, J.A., Totsch, S.K., Mintz, E.M., Kraft, T.W., Cowell, R.M. & Gamble, K.L. (2017) Glycogen synthase kinase 3 regulates photic signaling in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci*, **45**, 1102-1110.
- Paul, R.K., Singh, N.S., Khadeer, M., Moaddel, R., Sanghvi, M., Green, C.E., O'Loughlin, K., Torjman, M.C., Bernier, M. & Wainer, I.W. (2014) (R,S)-Ketamine metabolites (R,S)-norketamine and (2S,6S)-hydroxynorketamine increase the mammalian target of rapamycin function. *Anesthesiology*, **121**, 149-159.
- Pačesová, D., Volfová, B., Červená, K., Hejnová, L., Novotný, J. & Bendová, Z. (2015) Acute morphine affects the rat circadian clock via rhythms of phosphorylated ERK1/2 and GSK3 $\beta$  kinases and Per1 expression in the rat suprachiasmatic nucleus. *Br J Pharmacol*, **172**, 3638-3649.
- Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U. & Schibler, U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, **110**, 251-260.
- Páleníček, T., Fujáková, M., Brunovský, M., Balíková, M., Horáček, J., Gorman, I., Tylš, F., Tišlerová, B., Soš, P., Bubeníková-Valešová, V., Höschl, C. & Krajča, V. (2011) Electroencephalographic spectral and coherence analysis of ketamine in rats:

- correlation with behavioral effects and pharmacokinetics. *Neuropsychobiology*, **63**, 202-218.
- Radford, K.D., Park, T.Y., Lee, B.H., Moran, S., Osborne, L.A. & Choi, K.H. (2017) Dose-response characteristics of intravenous ketamine on dissociative stereotypy, locomotion, sensorimotor gating, and nociception in male Sprague-Dawley rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **153**, 130-140.
- Rahmsdorf, H.J., Schönthal, A., Angel, P., Litfin, M., Rütther, U. & Herrlich, P. (1987) Posttranscriptional regulation of c-fos mRNA expression. *Nucleic Acids Res*, **15**, 1643-1659.
- Ralph, M.R., Foster, R.G., Davis, F.C. & Menaker, M. (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, **247**, 975-978.
- Richards, J. & Gumz, M.L. (2013) Mechanism of the circadian clock in physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **304**, R1053-1064.
- Rothman, S.M., Thurston, J.H., Hauhart, R.E., Clark, G.D. & Solomon, J.S. (1987) Ketamine protects hippocampal neurons from anoxia in vitro. *Neuroscience*, **21**, 673-678.
- Réus, G.Z., Vieira, F.G., Abelaira, H.M., Michels, M., Tomaz, D.B., dos Santos, M.A., Carlessi, A.S., Neotti, M.V., Matias, B.I., Luz, J.R., Dal-Pizzol, F. & Quevedo, J. (2014) MAPK signaling correlates with the antidepressant effects of ketamine. *J Psychiatr Res*, **55**, 15-21.
- Sato, T.K., Panda, S., Miraglia, L.J., Reyes, T.M., Rudic, R.D., McNamara, P., Naik, K.A., FitzGerald, G.A., Kay, S.A. & Hogenesch, J.B. (2004) A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, **43**, 527-537.
- Schaaf, M.J., de Jong, J., de Kloet, E.R. & Vreugdenhil, E. (1998) Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone. *Brain Res*, **813**, 112-120.
- Shi, M., Ding, J., Li, L., Bai, H., Li, X., Lan, L., Fan, H. & Gao, L. (2020) Effects of Ketamine on Learning and Memory in the Hippocampus of Rats through ERK, CREB, and Arc. *Brain Sci*, **11**.
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C. & Okamura, H. (1997) Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell*, **91**, 1043-1053.
- Shimoyama, M., Shimoyama, N., Gorman, A.L., Elliott, K.J. & Inturrisi, C.E. (1999) Oral ketamine is antinociceptive in the rat formalin test: role of the metabolite, norketamine. *Pain*, **81**, 85-93.

- Singh, A., Singh, J. & Rattan, S. (2022) Evidence for the presence and release of BDNF in the neuronal and non-neuronal structures of the internal anal sphincter. *Neurogastroenterol Motil*, **34**, e14099.
- Smith, M.A., Makino, S., Kvetnansky, R. & Post, R.M. (1995) Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*, **15**, 1768-1777.
- Stephan, F.K. & Zucker, I. (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **69**, 1583-1586.
- Tahara, Y. & Shibata, S. (2016) Circadian rhythms of liver physiology and disease: experimental and clinical evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **13**, 217-226.
- Tischkau, S.A., Mitchell, J.W., Tyan, S.H., Buchanan, G.F. & Gillette, M.U. (2003) Ca<sup>2+</sup>/cAMP response element-binding protein (CREB)-dependent activation of Per1 is required for light-induced signaling in the suprachiasmatic nucleus circadian clock. *J Biol Chem*, **278**, 718-723.
- Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S.M. & Sassone-Corsi, P. (2002) Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7728-7733.
- Trullas, R. & Skolnick, P. (1990) Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol*, **185**, 1-10.
- Trávníčková, Z., Sumová, A., Peters, R., Schwartz, W.J. & Illnerová, H. (1996) Photoperiod-dependent correlation between light-induced SCN c-fos expression and resetting of circadian phase. *Am J Physiol*, **271**, R825-831.
- van der Horst, G.T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A.P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H. & Yasui, A. (1999) Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*, **398**, 627-630.
- Vollenweider, F.X., Leenders, K.L., Oye, I., Hell, D. & Angst, J. (1997) Differential psychopathology and patterns of cerebral glucose utilisation produced by (S)- and (R)-ketamine in healthy volunteers using positron emission tomography (PET). *Eur Neuropsychopharmacol*, **7**, 25-38.
- von Gall, C. (2022) The Effects of Light and the Circadian System on Rhythmic Brain Function. *Int J Mol Sci*, **23**.



- Vyklicky, V., Korinek, M., Smejkalova, T., Balik, A., Krausova, B., Kaniakova, M., Lichnerova, K., Cerny, J., Krusek, J., Dittert, I., Horak, M. & Vyklicky, L. (2014) Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res*, **63**, S191-203.
- Wang, M., Zhang, B., Zhou, Y., Wang, C., Zheng, W., Liu, W., Zhan, Y., Lan, X. & Ning, Y. (2021) Sleep improvement is associated with the antidepressant efficacy of repeated-dose ketamine and serum BDNF levels: a post-hoc analysis. *Pharmacol Rep*, **73**, 594-603.
- Welz, P.S., Zinna, V.M., Symeonidi, A., Koronowski, K.B., Kinouchi, K., Smith, J.G., Guillén, I.M., Castellanos, A., Furrow, S., Aragón, F., Crainiciuc, G., Prats, N., Caballero, J.M., Hidalgo, A., Sassone-Corsi, P. & Benitah, S.A. (2019) BMAL1-Driven Tissue Clocks Respond Independently to Light to Maintain Homeostasis. *Cell*, **177**, 1436-1447.e1412.
- Wheaton, K.L., Hansen, K.F., Aten, S., Sullivan, K.A., Yoon, H., Hoyt, K.R. & Obrietan, K. (2018) The Phosphorylation of CREB at Serine 133 Is a Key Event for Circadian Clock Timing and Entrainment in the Suprachiasmatic Nucleus. *J Biol Rhythms*, **33**, 497-514.
- White, P.F., Ham, J., Way, W.L. & Trevor, A.J. (1980) Pharmacology of ketamine isomers in surgical patients. *Anesthesiology*, **52**, 231-239.
- White, P.F., Schüttler, J., Shafer, A., Stanski, D.R., Horai, Y. & Trevor, A.J. (1985) Comparative pharmacology of the ketamine isomers. Studies in volunteers. *Br J Anaesth*, **57**, 197-203.
- Widman, A.J. & McMahon, L.L. (2018) Disinhibition of CA1 pyramidal cells by low-dose ketamine and other antagonists with rapid antidepressant efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **115**, E3007-E3016.
- Wilson, C., Kercher, M., Quinn, B., Murphy, A., Fiegel, C. & McLaurin, A. (2007) Effects of age and sex on ketamine-induced hyperactivity in rats. *Physiol Behav*, **91**, 202-207.
- Wollnik, F., Brysch, W., Uhlmann, E., Gillardon, F., Bravo, R., Zimmermann, M., Schlingensiepen, K.H. & Herdegen, T. (1995) Block of c-Fos and JunB expression by antisense oligonucleotides inhibits light-induced phase shifts of the mammalian circadian clock. *Eur J Neurosci*, **7**, 388-393.
- Wray, N.H., Schappi, J.M., Singh, H., Senese, N.B. & Rasenick, M.M. (2019) NMDAR-independent, cAMP-dependent antidepressant actions of ketamine. *Mol Psychiatry*, **24**, 1833-1843.
- Xu, S., Akioma, M. & Yuan, Z. (2021) Relationship between circadian rhythm and brain cognitive functions. *Front Optoelectron*, **14**, 278-287.

- Xu, S.X., Zhou, Z.Q., Li, X.M., Ji, M.H., Zhang, G.F. & Yang, J.J. (2013) The activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase in rat hippocampus contributes to the rapid antidepressant effect of ketamine. *Behav Brain Res*, **253**, 305-309.
- Yang, C., Kobayashi, S., Nakao, K., Dong, C., Han, M., Qu, Y., Ren, Q., Zhang, J.C., Ma, M., Toki, H., Yamaguchi, J.I., Chaki, S., Shirayama, Y., Nakazawa, K., Manabe, T. & Hashimoto, K. (2018) AMPA Receptor Activation-Independent Antidepressant Actions of Ketamine Metabolite (S)-Norketamine. *Biol Psychiatry*, **84**, 591-600.
- Yang, C., Shirayama, Y., Zhang, J.C., Ren, Q., Yao, W., Ma, M., Dong, C. & Hashimoto, K. (2015) R-ketamine: a rapid-onset and sustained antidepressant without psychotomimetic side effects. *Transl Psychiatry*, **5**, e632.
- Yang, S.Y., Hong, C.J., Huang, Y.H. & Tsai, S.J. (2010) The effects of glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), on ketamine-induced alterations in sensorimotor gating and regional brain c-Fos expression in rats. *Neurosci Lett*, **469**, 127-130.
- Ye, R., Selby, C.P., Chiou, Y.Y., Ozkan-Dagliyan, I., Gaddameedhi, S. & Sancar, A. (2014) Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian clock. *Genes Dev*, **28**, 1989-1998.
- Yi, L.T., Luo, L., Wu, Y.J., Liu, B.B., Liu, X.L., Geng, D. & Liu, Q. (2015) Circadian variations in behaviors, BDNF and cell proliferation in depressive mice. *Metab Brain Dis*, **30**, 1495-1503.
- Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P.J., Georgiou, P., Fischell, J., Elmer, G.I., Alkondon, M., Yuan, P., Pribut, H.J., Singh, N.S., Dossou, K.S., Fang, Y., Huang, X.P., Mayo, C.L., Wainer, I.W., Albuquerque, E.X., Thompson, S.M., Thomas, C.J., Zarate, C.A. & Gould, T.D. (2016) NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*, **533**, 481-486.
- Zeilhofer, H.U., Swandulla, D., Geisslinger, G. & Brune, K. (1992) Differential effects of ketamine enantiomers on NMDA receptor currents in cultured neurons. *Eur J Pharmacol*, **213**, 155-158.
- Zhang, J.C., Li, S.X. & Hashimoto, K. (2014a) R (-)-ketamine shows greater potency and longer lasting antidepressant effects than S (+)-ketamine. *Pharmacol Biochem Behav*, **116**, 137-141.
- Zhang, M., Radford, K.D., Driscoll, M., Purnomo, S., Kim, J. & Choi, K.H. (2019) Effects of subanesthetic intravenous ketamine infusion on neuroplasticity-related proteins in the prefrontal cortex, amygdala, and hippocampus of Sprague-Dawley rats. *IBRO Rep*, **6**, 87-94.

Zhang, R., Lahens, N.F., Ballance, H.I., Hughes, M.E. & Hogenesch, J.B. (2014b) A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 16219-16224.

Zheng, B., Albrecht, U., Kaasik, K., Sage, M., Lu, W., Vaishnav, S., Li, Q., Sun, Z.S., Eichele, G., Bradley, A. & Lee, C.C. (2001) Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. *Cell*, **105**, 683-694.

Zhou, W., Wang, N., Yang, C., Li, X.M., Zhou, Z.Q. & Yang, J.J. (2014) Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. *Eur Psychiatry*, **29**, 419-423.